



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

INDÍCIOS DE INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA NA MUCOSA DO ÍLEO DE RATOS *Wistar* DURANTE A INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Anne Caroline Santa Rosa¹, Joquebede Caroline Pessoa do Nascimento², Débora de Mello
Gonçales Sant'Ana³, Nilza Cristina Buttow⁴, Larissa Carla Lauer Schneider⁵

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá - UEM. Bolsista PIBIC/CNPq-UEM. santarosa.annecarol@gmail.com

²Aluna de mestrado da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. joquebede1893@gmail.com

³Professora, Doutora, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM. dmgsantana@gmail.com

⁴Professora, Doutora, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM. ncbuttow@gmail.com

⁵Orientadora, Doutora, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM. lari_uem@yahoo.com.br

RESUMO

A mucosa intestinal tem um papel importante no mecanismo de barreira contra a penetração de microorganismos. No entanto, *Toxoplasma gondii* invade as células epiteliais do intestino delgado, iniciando uma resposta imune local. Esta resposta promove um desbalanço nos neurotransmissores, na qual envolve o plexo submucoso, resultando em mudanças na integridade do epitélio e no papel secretor. No presente trabalho foi avaliado o comportamento das células da mucosa e dos neurônios submucosos do íleo durante diferentes tempos de infecção aguda pelo *T. gondii*. Quarenta ratos (60 dias de idade) foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos (n=5): não infectado (GC) e, infectados: 6 (GI6h), 12 (GI12h), 24 (GI24h), 48 (GI48h) e 72 horas (GI72h) e 7 (GI7d) e 10 dias (GI10d) de infecção com a inoculação de 5000 oocistos de *T. gondii* esporulados (cepa Me-49, genótipo II). Segmentos do íleo foram separados para o processamento histológico e, para as técnicas da histoquímica e imunofluorescência para quantificação das células epiteliais e células imunes da mucosa do íleo e dos neurônios submucosos HuC/D-IR e VIP-IR. Nossos resultados demonstraram uma perda neuronal gradativa ao longo da infecção e também mudanças fenotípicas dos neurônios VIPérgicos. Estas mudanças podem estar relacionadas com a redução das células calciformes e o crescimento dos linfócitos intraepiteliais e das células imunes da lamina própria. A infecção aguda pelo *T. gondii* no íleo de ratos *Wistar* promove mudanças dos neurônios VIPérgicos ao longo da infecção, que pode estar relacionadas com as alterações das células epiteliais e de defesa da mucosa intestinal.

PALAVRAS-CHAVE: Neurônios submucosos, VIP, intestino delgado, toxoplasmose intestinal, fase aguda.

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório agente etiológico da toxoplasmose, zoonose que possui uma imensa distribuição mundial (DUBEY et al., 2012). Nesta patologia ocorrem diarreias acompanhadas de ulcerações intestinais que podem evoluir para ileíte fatal em camundongos susceptíveis (LIESENFELD et al., 1996; MENNECHET et al., 2002). Os ratos são usualmente resistentes à infecção pelo *T. gondii* (DUBEY, 1998), mas ainda assim pode ser gerada uma inflamação durante o processo de infecção do parasito (SCHREINER; LIESENFELD, 2009).

Quando a infecção ocorre por via oral, o parasito encontra a superfície da mucosa intestinal, constituída de células epiteliais, que incluem os enterócitos e as células calciformes (CCs) que desempenham um importante papel na função de barreira mecânica às agressões do meio externo e a penetração de microorganismos (PELASEYED et al., 2014). Esta barreira ocorre devido a presença de junções de oclusão (GOTO; IVANOV, 2013) e do muco produzido pelas CCs (JOHANSSON, 2013). Apesar da existência desta barreira o *T. gondii* tem a capacidade de invadir as células epiteliais iniciando uma resposta imune local (HEIMESAAT et al., 2007).

Os neurônios também são alvos da replicação do *T. gondii* e sofrem alterações induzidas por este protozoário. O *T. gondii* possui habilidade para induzir modificações diretas ou indiretamente via neuroinflamação, desregulando o balanço de neurotransmissores e induzindo a neuroplasticidade (PARLOG et al., 2015).

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é organizado em plexos, dos quais os principais são o plexo submucoso e o plexo mioentérico (FURNESS, 2006). O plexo mioentérico controla a



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

motilidade e o submucoso controla o fluxo sanguíneo e a secreção epitelial (FURNESS et al., 2003). No plexo submucoso os neurônios VIPérgicos(VIP) estão relacionados com o controle da secreção do epitélio intestinal (CHANDRASEKHARAN et al., 2013). O neuropeptídeo VIP além de controlar o fluxo sanguíneo, as vias secretomotoras e a permeabilidade do epitélio, também possui propriedades anti-inflamatórias ativando ou inibindo diretamente as células de defesa. Quando esta resposta é análoga a um processo inflamatório, passa a ser chamada de inflamação neurogênica (CHANDRASEKHARAN et al., 2013).

Estudos já evidenciam que a infecção aguda e crônica com diferentes cepas de *T. gondii* causam mudanças morfológicas nas subpopulações neuronais encontradas na parede de diferentes segmentos do trato gastrointestinal (SANT'ANA et al., 2012; VICENTINO-VIEIRA et al., 2015; GÓIS et al., 2016). No entanto, faltam ainda estudos que relacionem o plexo submucoso com a mucosa intestinal do íleo de ratos infectados na fase aguda. No presente trabalho foi avaliado o comportamento de diferentes tipos de células epiteliais, de células de defesa da mucosa e dos neurônios submucosos durante diferentes tempos de infecção aguda pelo *T. gondii*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (protocolo nº 013/2013).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus Wistar* machos, com 60 dias de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais (n=5): um grupo controle (grupo GC) e sete grupos infectados com 5000 oocistos de *T. gondii* (cepa Me - 49) e submetidos à eutanásia após 6 (GI6h), 12 (GI12h), 24 (GI24h), 48 (GI48h) e 72 horas (GI72h), 7 (GI7d) e 10 dias (GI10d).

Os animais dos grupos infectados receberam pela via oral 1,0 mL de suspensão contendo 5000 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa ME-49, genótipo tipo II) (VICENTINO-VIEIRA et al., 2015). O GC recebeu o mesmo volume de solução salina estéril.

Após os tempos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano (GÓIS et al., 2016). Os segmentos do íleo de cada animal foram separados em três partes, todas foram fixadas em paraformaldeído 4%, pH 7,4. Uma parte foi usada para processamento histológico, outra foi usada para a técnica de histoquímica da peroxidase e a última usada para obtenção de preparados totais da tela submucosa a partir da remoção da túnica muscular e da túnica mucosa para análise do plexo submucoso.

2.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Segmentos do íleo de todos os animais foram desidratados em séries ascendentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para obtenção de cortes transversais semi-seriados de quatro μm , que foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A coloração de HE foi utilizada para contagem de linfócitos intra-epiteliais (LIEs). A coloração de Alcian-Blue (AB) pH 2,5 foram utilizados para quantificar as células calciformes (CCs). Os resultados foram expressos como número de células por mm^2 .



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

2.4 HISTOQUÍMICA DA PEROXIDASE

Segmentos do íleo de cada animal foi colocado em uma solução de PBS contendo 10% de sacarose por 24 hs. Após este período, todos os segmentos foram emblocados em OCT e mantidos no freezer -20°C . Os segmentos emblocados foram cortados no criostato na espessura de $10\ \mu\text{m}$. As seções do criostato foram submetidas para histoquímica da peroxidase (células imunes que expressam peroxidase serão marcadas - CIs), assim foram lavadas em PBS, seguida pela incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, no mesmo tampão acrescido do DAB ($50\text{mg}/100\text{mL}$) e H_2O_2 ($100\ \mu\text{L}/100\text{mL}$). As lâminas foram lavadas em PBS e montadas em glicerol. Seguida pela contagem do número das CIs presentes na parede do íleo em 24 imagens aleatórias em objetiva de 40X em quatro cortes por animal.

2.5 PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE DO PLEXO SUBMUCOSO

Depois de três horas de fixação as amostras foram abertas ao longo da borda mesentérica e lavadas em PBS para remoção do excesso de fixador. O intestino foi dissecado com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio, para obtenção de preparados totais do plexo submucoso através da retirada das túnicas muscular e mucosa. Para realização das técnicas de imunofluorescência da proteína HuC/D (população geral neuronal, HuC/D-IR) e VIP (subpopulação VIPérgica, VIP-IR). Foi utilizado um preparado total da túnica submucosa do íleo de cada animal para a realização da marcação HuC/D-VIP. A técnica de imunofluorescência foi realizada de acordo com Sant'Ana e colaboradores (2012).

A quantificação dos neurônios foi realizada por meio de imagens capturadas das lâminas montadas, no microscópio com filtros para imunofluorescência e câmera de alta resolução, acoplado ao microcomputador. Tanto a área quanto a quantificação dos neurônios foram analisadas com o auxílio do Software de análise de imagem Image Pro Plus 3.0.1. Para as análises quantitativas, foram capturadas 30 imagens aleatórias em objetiva de 16X e os resultados foram expressos como número de células por cm^2 .

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas pelo programa Graph Pad Prism 5.0, sendo expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado análise de variância One-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os ratos infectados tiveram uma perda gradual de neurônios submucosos imunomarcados com HuC/D-IR, onde com 6 horas de infecção já se pode evidenciar uma perda neuronal significativa de 12% em relação ao controle, com 12 horas a perda foi de 21%, com 24 horas de 24%, com 48 horas de 32%, 72 horas de 39%, 7 dias de 43% e 10 dias de 46% (Figura 1A, C e D).

Nos neurônios VIP-IR observou-se uma redução da sua densidade nos grupos infectados, com exceção do GI24h, que permaneceu igual ao GC e diferente de todos os demais grupos, tendo em seguida uma nova redução (Figura 1B, C e D). Quando analisamos a proporção de neurônios VIPérgicos em relação ao HuC/D-IR observa-se uma diminuição significativa nos grupos GI6h, GI72h e GI7d e um aumento no GI24h enquanto que os demais permaneceram semelhantes ao controle (Figura 1E).

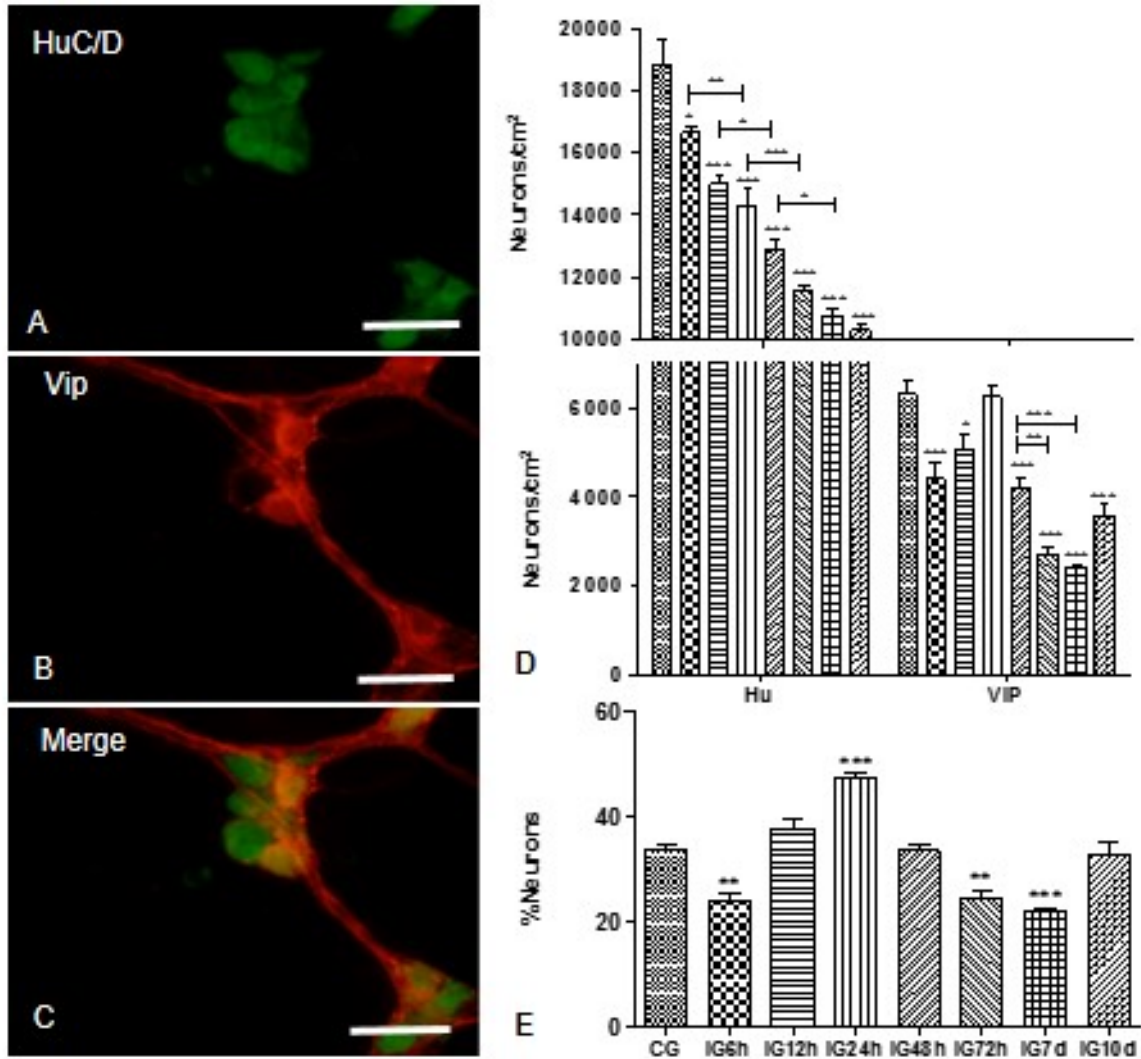


Figura 1: Micrografia dos neurônios submucosos no microscópio de fluorescência. A) HuC/D, B) VIP, C) dupla marcação, D) número, E) percentual do plexo submucoso do íleo de ratos infectados com 5000 oocistos de *Toxoplasma gondii* (cepa ME-49-genótipo II) para diferentes tempos de infecção e, o grupo controle e visualizados por imunofluorescência para HuC/D-IR, nNOS-IR e VIP-IR. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para cada técnica foi comparada todos os grupos pelo teste de variância One-way ANOVA).

Fonte: Dados da pesquisa

No tempo de 6 horas de infecção foi verificada a ruptura do epitélio intestinal e uma redução das CCs AB 2.5+, sendo que estas permaneceram assim até os 10 dias de infecção (Tabela 1, Figura 2B e C). Estas alterações podem ser resultantes da entrada do parasita quebrando a barreira epitelial no íleo de ratos (Figura 2D).

Neste mesmo período ocorreu uma perda significativa de 12% dos neurônios do plexo submucoso da população geral e uma diminuição de 29% dos neurônios VIPérgicos (Figura 1B, E). Estes últimos auxiliam regulando a função da barreira por aumentar a expressão das proteínas da zônula de oclusão (CHANDRASEKHARAN et al., 2013). Portanto, sua diminuição pode ter favorecido o rompimento da barreira epitelial, facilitando a entrada do *T. gondii* e também de outros microrganismos, até mesmo as bactérias presentes na microbiota (COHEN E DENKERS, 2015). Os neurônios VIPérgicos são considerados secretomeres e atuam no controle das células caliciformes,



Encontro Internacional de Produção Científica

24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

sendo que também no período de 6 horas de infecção ocorreu uma redução destes neurônios e das CCs.

No período de 24 horas de infecção foi observada a presença de taquizoítos na lâmina própria e no interior dos vasos sanguíneos (Figura 2A) e, também um aumento de 28% dos neurônios VIPérgicos (Figura 1D). Ocorreu ainda um aumento de 63% dos linfócitos intraepiteliais (LIEs) que permaneceram aumentados até os 10 dias de infecção (Tabela 1). Resultados similares foram demonstrados para mesma cepa de *T. gondii* no plexo submucoso do cólon de ratos na fase crônica onde o número dos neurônios submucosos imunomarcados com VIP-IR aumentou juntamente com as LIEs (GÓIS et al., 2016). Sendo que no plexo submucoso do jejuno também na fase crônica houve uma redução do número destes neurônios e as LIEs permaneceram semelhantes ao controle (SANT'ANA et al., 2012).

Tabela 1: Densidade de linfócitos intraepiteliais (LIEs), células caliciformes (CCs) e células imunes (CIs) encontradas na mucosa do íleo de ratos controle (GC) e ratos infectados com inóculo de 5000 oocistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 (genótipo II) com diferentes tempos de infecção (n=5)

Célula	Técnica	GC	GI6h	GI12h	GI24h	GI48h	GI72h	GI7d	GI10d
LIEs	HE	260±12 ^a	379±16 ^{ab}	431±33,0 ^{ab}	651±40 ^{bc}	680±33 ^{bc}	788±51 ^c	798±53 ^c	941±157 ^c
CIs	DAB	904,7± 44 ^a	1139±119 ^a	862 ± 2,5 ^a	1163 ± 93 ^{ab}	951±74 ^a	1091 ± 29 ^a	1158 ± 36 ^a	1508 ± 89 ^b
CCs	AB 2,5+	1038±76 ^a	672±54 ^b	744±54 ^b	488±62 ^b	670±42 ^b	541±45 ^b	708±56 ^b	510±66 ^b

Média±erro padrão seguida por letras diferentes na mesma linha para a mesma técnica indica diferenças significativa (p<0,05) pelo teste de variância One-Way ANOVA.

O VIP, além de atuar no controle das CCs e na regulação da barreira epitelial, também é considerado um neuropeptídeo anti-inflamatório (EKBLAD; BAUER, 2011). Chandrasekharan et al. (2013) afirmaram que o VIP ativa a liberação de TGF-β pelos linfócitos T, assim este neuropeptídeo mantém a tolerância imunológica e a homeostase intestinal regulando a resposta imunológica por células T. Os LIEs atuam no controle do *T. gondii* (GIGLEY et al., 2011), secretando TGF-β para reduzir a inflamação (KASPER et al., 2004) e também IFN-γ para eliminar as células infectadas pelo parasita (COHEN; DENKERS, 2015). Como neste estudo os neurônios que expressam VIP aumentaram concomitantemente com os LIEs é provável que estes últimos estejam secretando TGF-β por ativação direta pelo VIP, podendo estar ocorrendo uma inflamação neurogênica (CHANDRASEKHARAN et al., 2013).

No tempo de 72 horas os neurônios VIP-IR continuaram diminuindo, sendo encontrado uma redução significativa que permaneceu até 7 dias de infecção, sendo que após 10 dias de infecção estes neurônios voltaram a ser semelhantes ao controle (Figura 2D) e, também as células imunes que expressam peroxidase (CIs) sofreram um aumento (Tabela 1, Figura 2E e F). As CIs provavelmente vem do gradiente quimiotático gerado pela produção de quimiocinas pelos enterócitos (KASPER et al., 2004).



X
EPCC

Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

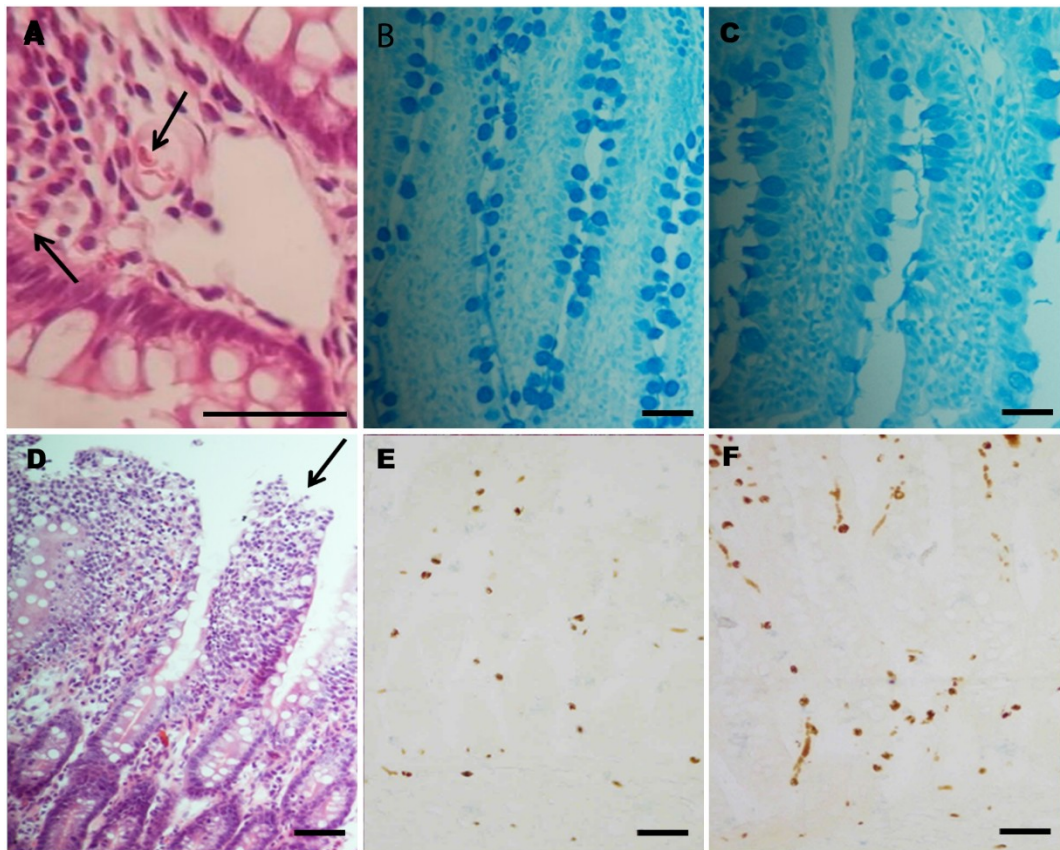


Figura 2: Micrografia de cortes transversais do íleo de ratos infectados com 5000 oocistos de *Toxoplasma gondii* (cepa Me-49, genótipo II). A) Presença de taquizoítos na lâmina própria e no interior de vasos sanguíneos no período de 24 horas de infecção (setas). B) Células caliciformes AB 2,5+ (sialomucinas), grupo controle. C) Células caliciformes AB 2,5+ (sialomucinas) no íleo de ratos com 6 horas de infecção. D) Ruptura no epitélio intestinal a partir de 6 horas de infecção (setas). (CCs) AB 1,0+ (sulfomucinas). E) Células imunes marcadas com peroxidase (CIs), histoquímica da peroxidase, grupo controle. F) Células imunes marcadas com peroxidase (CIs), histoquímica da peroxidase no íleo de ratos com 10 dias de infecção.

Fonte: Dados da pesquisa

Os ratos, diferentemente dos camundongos (C57BL/6), são usualmente resistentes à infecção pelo *T. gondii* (DUBEY, 1998). Esta resistência dos ratos talvez ocorra por estes liberarem maior quantidade de citocinas que são consideradas regulatórias como IL-10 e TGB- β essenciais para a homeostase do intestino após a infecção oral com o *T. gondii* (BUZONI-GATEL et al. 2001). Neste estudo foi demonstrado a ativação das LIEs provavelmente pelos neurônios VIPérgicos no tempo de 24 horas e, apesar destes neurônios reduziram sua densidade talvez devido à resposta inflamatória durante a invasão, replicação e disseminação do *T. gondii*, os LIEs permaneceram em número aumentado até os 10 dias da infecção mantendo a homeostase intestinal.

Neste trabalho foi observado que os neurônios VIPérgicos do plexo submucoso possuem relação tanto com as células epiteliais que participam da função de barreira quanto com as células de defesa, parecendo estar inibindo-as ou ativando-as, sugerindo assim uma inflamação neurogênica.



4 CONCLUSÃO

A infecção aguda pelo *T. gondii* no íleo de ratos *Wistar* promove perda gradual da população geral dos neurônios submucosos e mudanças dos neurônios VIPérgicos ao longo da infecção, que pode estar relacionadas com as alterações das células epiteliais e de defesa da mucosa intestinal. Estudos adicionais são necessários para conhecer o tipo da resposta imunológica que culmina nas alterações encontradas.

REFERÊNCIAS

BUZONI-GATEL D, DEBBABI H, MENNECHET FJET AL. . Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes *Gastroenterology*. 2001;120:914-924.

CHANDRASEKHARAN B, NEZAMI BG, SRINIVASAN S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304:G949-957.

COHEN SB, DENKERS EY. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii* *Parasite Immunol*. 2015;37:108-117

DUBEY JP. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice *J Parasitol*. 1998;84:1279-1282.

DUBEY JP, LAGO EG, LM, GENNARI, C. SU, JONES, JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence high burden of disease, and epidemiology *Parasitol*. 2012;139:1375-1424.

EKBLAD E, BAUER AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16 Suppl 1:123-128.

FURNESS JB, ROBBINS HL, SELMER ISET AL. . Expression of intermediate conductance potassium channel immunoreactivity in neurons and epithelial cells of the rat gastrointestinal tract *Cell Tissue Res*. 2003;314:179-189.]

FURNESS JB. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections *Auton Neurosci*. 2006;130:1-5; Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q et al. . Fundamentals of neurogastroenterology: basic science *Gastroenterology*. 2006;130:1391-1411.

GIGLEY JP, BHADRA R, KHAN IA. CD8 T Cells and *Toxoplasma gondii*: A New Paradigm *J Parasitol Res*. 2011;2011:243796.

GÓIS MB, HERMES-ULIANA C, BARRETO ZAGO MCET AL. . Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats *Exp Parasitol*. 2016;164:56-63.

GOTO Y, IVANOV II. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk *Immunol Cell Biol*. 2013;91:204-214.

HEIMESAAT MM, FISCHER A, JAHN HKET AL. . Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli* *Gut*. 2007;56:941-948.

JOHANSSON ME, HANSSON GC. Mucus and the goblet cell *Dig Dis*. 2013;31:305-309.

KASPER L, COURRET N, DARCHE SET AL. . *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity *Int J Parasitol*. 2004;34:401-409.

LIESENFELD O, KOSEK J, REMINGTON JS, SUZUKI Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii* *J Exp Med*. 1996;184:597-607.

MENNECHET FJ, KASPER LH, RACHINEL N, LI W, VANDEWALLE A, BUZONI-GATEL D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen *J Immunol*. 2002;168:2988-2996.

PARLOG A, SCHLÜTER D, DUNAY IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations *Parasite Immunol*. 2015;37:159-170.

PELASEYED T, BERGSTRÖM JH, GUSTAFSSON JK ET AL. . The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system *Immunol Rev*. 2014;260:8-20.

SANT'ANA DM, GÓIS MB, ZANONI JN, DA SILVA AV, DA SILVA CJ, ARAÚJO EJ. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii* *Int J Exp Pathol*. 2012;93:279-286

SCHREINER M, LIESENFELD O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:221-233.

VICENTINO-VIEIRA SL, NOGUEIRA DE MELO GA, BIONDARO GÓIS M ET AL. . Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes *Exp Parasitol*. 2015;156:12-18.