



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DO PLEXO MIOENTÉRICO E
HISTOPATOLÓGICA DA PAREDE DO CÓLON DE RATOS
INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII***

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DO PLEXO MIOENTÉRICO E
HISTOPATOLÓGICA DA PAREDE DO CÓLON DE RATOS
INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Co-orientador: Profa. Dra. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana

Londrina
2018

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DO PLEXO MIOENTÉRICO E
HISTOPATOLÓGICA DA PAREDE DO CÓLON DE RATOS
INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 16 de abril de 2018

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objecto singular, um amigo,- é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda."

(Antoine de Saint-Exupery)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo e pelas vezes que me carregou em Seus braços.

Aos meus pais, que nunca colocaram limites nos meus sonhos e estiveram presentes em cada etapa do caminho até aqui.

Ao Professor Eduardo Araújo, primeiramente por ter me aceito e por ter acreditado em mim. Obrigada Professor! Pelas revisões, sugestões e correções. Suas palavras de incentivo, seus conselhos e também suas críticas me fizeram uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Daiane e Leandro por sempre acreditarem em mim independente das circunstâncias.

As duas pessoinhas que eu mais amo, minhas sobrinhas. A alegria de vocês me motiva a cada dia.

As amigas maravilhosas que a biomedicina me deu. Isabela e Joana, obrigada pelo abraço amigo, pela palavra de conforto, pela motivação e por estarem sempre comigo!

A todas as pessoas que o mestrado me proporcionou conhecer. Aos colegas do Laboratório de Neurociência Entérica.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

“O agradecimento nada mais é que um reconhecimento pelas coisas boas que os outros fazem e pelas oportunidades que a vida oferece a nós, além de ser uma demonstração de humildade e também um incentivo para que as pessoas que nos amam nunca desistam de nós.” (Rodrigo Venino).

MACHADO, Camila Cristina Alves. **Análise morfofuncional do plexo mioentérico e histopatológica da parede do cólon de ratos infectados com *Toxoplasma gondii***. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). No Brasil, dados obtidos nos últimos 30 anos indicam que a soropositividade para o *T. gondii* na população humana é uma das mais altas do mundo. Devido ao fato de o trato gastrointestinal (TGI) ser a principal via de entrada do *T. gondii* no hospedeiro, vários estudos têm sido publicados evidenciando alterações na organização da parede intestinal e sobre sistema nervoso entérico (SNE). Entretanto, não há informações sobre as consequências da infecção pelo *T. gondii* sobre os padrões de motilidade intestinal. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar se os movimentos colônicos coordenados estão comprometidos pela infecção toxoplásmica e sua associação com alterações morfológicas. Para tanto, ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos controle e infectados. Os animais do grupo infectado foram inoculados oralmente com 1mL de salina estéril contendo 5×10^3 oocistos esporulados da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii*. Os animais foram submetidos à eutanásia 6, 12, 48, 72 horas e 30 dias após a infecção, visando a coleta de amostras do cólon proximal e distal. Para análise histológica, cortes de amostras do cólon foram corados com hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff, Alcian Blue pH 2.5 e pH 1.0 e Picro Sirius red. Para análise do plexo mioentérico, amostras dos cólons proximal e distal foram microdissecados para a obtenção de preparados totais contendo o plexo mioentérico. Neurônios foram evidenciados pela técnica de imunofluorescência para visualização da população total (anti-HuC/D), subpopulação nitrérgica (nNOS) e subpopulação colinérgica (anti-ChAT). A motilidade colônica foi analisada nos animais controle e infectados por 30 dias utilizando-se um manômetro convencional. Histologicamente, observou-se hipertrofia da mucosa e edema na muscular da mucosa durante a fase aguda da infecção (até 72 horas). Linfócitos intraepiteliais e células calciformes aumentaram progressivamente nesse mesmo período. Ademais, observou-se aumento da proporção colágeno tipo I / tipo III durante o curso da infecção. Aos 30 dias, parte dos parâmetros histológicos estava reestabelecidos, exceto a muscular da mucosa que estava atrofiada e o número de células calciformes que continuava aumentado. Quanto à motilidade intestinal, contrações mais vigorosas e duradoras foram observadas no cólon distal dos ratos infectados. No entanto, perda de neurônios mioentéricos (todos os tipos) só foi observada no cólon proximal desses animais, o que indica perda de interneurônios descendentes. Conclui-se que uma alta dose (5×10^3) de oocistos da cepa ME-49 de *T. gondii* causa alterações histológicas na mucosa e no plexo mioentérico do cólon de ratos. Além disso, a infecção causa alterações nos padrões de motilidade do cólon distal desses animais.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Intestino grosso. Sistema nervoso entérico e motilidade intestinal.

MACHADO, Camila Cristina Alves. **Functional and anatomic analysis of the myenteric plexus and histopathologic of the colonic wall of rats infected with *Toxoplasma gondii***. 2018. Thesis (Master's degree in Experimental Pathology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). In Brazil, seropositivity for *T. gondii* in the human population is one of the highest in the world according to data obtained in the last 30 years. Due to the fact that the gastrointestinal tract (GIT) is the main route of entry of *T. gondii* in the host, several studies have been published evidencing alterations in the organization of the intestinal wall and enteric nervous system (SNE). However, there is no information on the consequences of *T. gondii* infection on intestinal motility patterns. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether coordinated colonic movements are compromised by toxoplasmic infection and its association with morphological alterations. Male Wistar rats were distributed in control and infected groups. Animals from the infected group were orally inoculated with 1 mL of sterile saline containing 5×10^3 sporulated oocytes from the *T. gondii* strain ME-49 (genotype II). The animals were euthanized at 6, 12, 48, 72 hours and 30 days post infection, aiming the collection of the proximal and distal colon. For histological analysis, colonic sections were stained with hematoxylin and eosin, Periodic Acid-Schiff, alcian blu e pH 2.5 and pH 1.0 and picro sirius red. For analysis of the myenteric plexus, samples of the proximal and distal colon were microdissected to obtain whole mounts containing the myenteric plexus. Neurons were evidenced by the immunofluorescence technique for visualization of the total population (anti-HuC/D), nitrergic subpopulation (nNOS) and cholinergic subpopulation (anti-ChAT). Colonic motility was analysed in the control and thirty-days-infected animals using a conventional manometer. Histologically, it was observed mucosal hypertrophy and mucosal muscular swelling during the acute phase of infection (up to 72 hours). Intraepithelial lymphocytes and goblet cells increased progressively over the same period. In addition, there was an increase in the proportion of type I / type III collagen during the course of infection. At 30 days post infection, part of the histological parameters were recovered except for the mucosal muscular atrophy and the kept increase in number of goblet cells. Regarding the colonic motility, the contractions were stronger and longer in the distal colon of infected rats. On the other hand, loss of myenteric neurons (all types) was found only in the proximal colon of the same animals, which indicates loss of integrative descending interneurons. It is concluded that high dose (5×10^3) of oocysts from the *T. gondii* ME-49 strain cause histological changes in the colonic mucosa and myenteric plexus of rats. Besides, the infection provoked distal colonic dysmotility in infected rats.

Keywords: Toxoplasmosis. Large intestine. Enteric nervous system and intestinal motility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Desenho esquemático de oocistos de *T. gondii*. (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos (seta preta) e com quatro esporozoítos em cada (seta vermelha)11
- Figura 2** – Desenho esquemático do *T. gondii* e suas principais estruturas. (A) Representação de um taquizoítos. (B) Representação de um bradzoíto13
- Figure 3** – Diagrama representando o ciclo biológico do *T. gondii*. (A) Ciclo biológico em hospedeiros definitivos. (B) Esporulação dos oocistos no meio ambiente. (C) Ciclo biológico em hospedeiros intermediários.....15
- Figura 4** – Diagrama representando a parede do TGI.....21
- Figura 5** – Organização do sistema nervoso entérico24
- Figura 6** – Distribuição dos gânglios ao longo do TGI.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
CD	Células Dendríticas
GRAS	Proteínas de Granulo Denso
INF γ	Interferon amma
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF γ	Interferon gamma
K	Potássio
LIE	Linfócitos Intraepiteliais
LT	Linfócitos T
MEC	Matriz Extracelular
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
NK	Células Natural Killer
ON	Óxido Nítrico
PR	Paraná
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
<i>T. gondii</i>	Toxoplasma gondii
TGF β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
VP	Vacúolo Parasitóforo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
	REFERÊNCIAS	30
	ORIGINAL PAPER	37
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	ANEXOS	58
	ANEXO A – Aprovação de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá protocolo 013/2013, processo nº 032/2006-CE	59
	ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo 50/2017, processo nº 5617.2017.35	60
	ANEXO C - Author Guidelines	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Quando descoberto em 1908 na Tunísia por Nicolle e Manceaux (1908), este parasito inicialmente foi confundido com formas de *Leishmania*. Paralelamente à descoberta na Tunísia, no Brasil, Splendore (1908) encontrou um protozoário semelhante em um coelho e também o confundiu com *Leishmania*. Mais tarde, Nicolle e Manceaux (1909) perceberam que haviam encontrado um novo parasito e o nomearam de acordo com sua morfologia (toxó= arco e plasma= vida) e com o nome do animal em que o parasito foi identificado inicialmente, o *Ctenodactylus gundi*.

A partir dessa descoberta, investigações buscaram encontrar o *T. gondii* em diferentes animais, como cães (CAMPBELL, MARTIN, E GORDON, 1955), ovelhas (HARTLEY E MARSHALL, 1957), mamíferos marinhos (COLE *et al.*, 2000), aves (DUBEY, 2002), entre outros. O primeiro isolado de *T. gondii* em humanos foi obtido no ano de 1939, a partir de uma amostra de líquido cefalorraquidiano e sua associação com a sintomatologia apresentada pelo paciente culminou na descrição do primeiro caso de toxoplasmose humana (WOLF *et al.*, 1939).

Hoje, mais de 100 anos desde a descoberta do *T. gondii*, os estudos continuam e novas informações sobre o parasito são adquiridas todos os anos. Estima-se que atualmente aproximadamente um terço da população mundial apresente anticorpos IgG – anti *T.gondii* (WEISS e DUBEY, 2009). No Brasil, dados coletados nos últimos 30 anos mostram que em certas regiões, aproximadamente 50% das pré-adolescentes já foram expostas ao parasito e que de 36 a 92% das mulheres grávidas apresentam anticorpos reagentes para *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2012). Essa alta prevalência de toxoplasmose em algumas regiões pode estar associada com surtos de infecção que ocorrem normalmente pela ingestão de carne crua ou mal cozida em festas ou reuniões familiares (BONAMETTI, PASSOS E DA SILVA, 1997).

Um estudo realizado em 2007 em um frigorífico de Palmas (PR) correlacionou a soroprevalência de *T. gondii* com a exposição dos trabalhadores a

carcaças de suínos. Foi demonstrado que dos 133 trabalhadores, 58,6% apresentavam anticorpos IgG - anti *T. gondii*. Os resultados observados não foram significativos, porém não descartam que a manipulação de carcaças é um fator de risco que possa contribuir para a transmissão do parasito (MILLAR *et al.*, 2007). De acordo com Dubey *et al* (2012), os fatores de risco mais relevantes para a infecção humana com o parasito são: menor nível socioeconômico, menor nível de educação, maior idade, manejo de solo e contato com gatos.

1.1.1 *Toxoplasma gondii*

Para se entender melhor a toxoplasmose, faz-se necessário conhecer o parasito responsável pela doença: o *T. gondii*. Esse protozoário normalmente parasita seus hospedeiros sem trazer grandes prejuízos (MONTROYA E LIESENFELD, 2004), porém alguns fatores podem estar relacionados com as formas mais graves da toxoplasmose, como por exemplo, a cepa do parasito (HILL, CHIRUKANDOTH, DUBEY, 2005).

Um estudo molecular inicial demonstrou que as estrutura clonal das cepas de *T. gondii* apresetam três linhagens principais, denominadas tipo I, II e III. Essa classificação foi baseada nos antígenos de superfície do parasito relacionados ao gene SAG 2. (SIBLEY E BOOTHROYD, 1992; HOWE E SIBLEY, 1995). Entretanto, este estudo parece ter sido muito restritivo, uma vez que o número de cepas era limitado e elas vinham basicamente de apenas dois países: França e Estados Unidos. Ao ampliar a área geográfica de pesquisa, observou-se que a estrutura clonal do parasita era bem mais diversificada, e assim genótipos exóticos, atípicos e recombinantes foram descritos (DARDÉ, 2008). Ao analisar cepas da América Central e do Sul foi observado que a maioria dos genótipos eram dos tipos I e III, mas que algumas cepas apresentam alelos formados a partir de recombinações das linhagens clonais clássicas, e outras ainda apresentavam alelos únicos (DARDÉ, 2008; SHAWAB *et al.*, 2010).

Quanto à virulência dessas cepas, baseando-se em modelos de camundongos inoculados intraperitonalmente com taquizóitos, sabe-se que cepas do tipo I são altamente virulentas enquanto que as dos tipos II e III são chamadas de

avirulentas, pois não levam o animal à morte (SIBLEY E BOOTHROYD, 1992). Em humanos, os fatores parasitários que determinam a virulência das diferentes cepas não são muito bem compreendidos. A expressão de moléculas de adesão, o micronema, a expressão de TgLCAT e outras enzimas que controlam o metabolismo lipídico da célula a favor do parasita, são essenciais para o desenvolvimento da toxoplasmose humana (FERNÁNDEZ *et al*, 2016).

Outro aspecto importante sobre o *T. gondii* que deve ser compreendido são as suas formas de vida. Dependendo do momento, dentro de seu ciclo biológico, o parasito pode ser encontrado de três formas distintas: esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos (DUBEY, 2004). A primeira delas, contida em oocistos, é conhecida como a forma de resistência do parasito. Os oocistos são liberados no meio ambiente através das fezes dos felídeos e contaminam solo, água e alimentos. Inicialmente, os oocistos liberados não estão esporulados, ou seja, não são infectantes, porém quando expostos às condições ideais de temperatura e aeração eles esporulam tornando-se infectantes. As formas infectantes apresentam em seu interior dois esporocistos elipsoidais com 4 esporozoítos cada (Figura 1) (DUBEY, MILLER E FRENKEL, 1970).

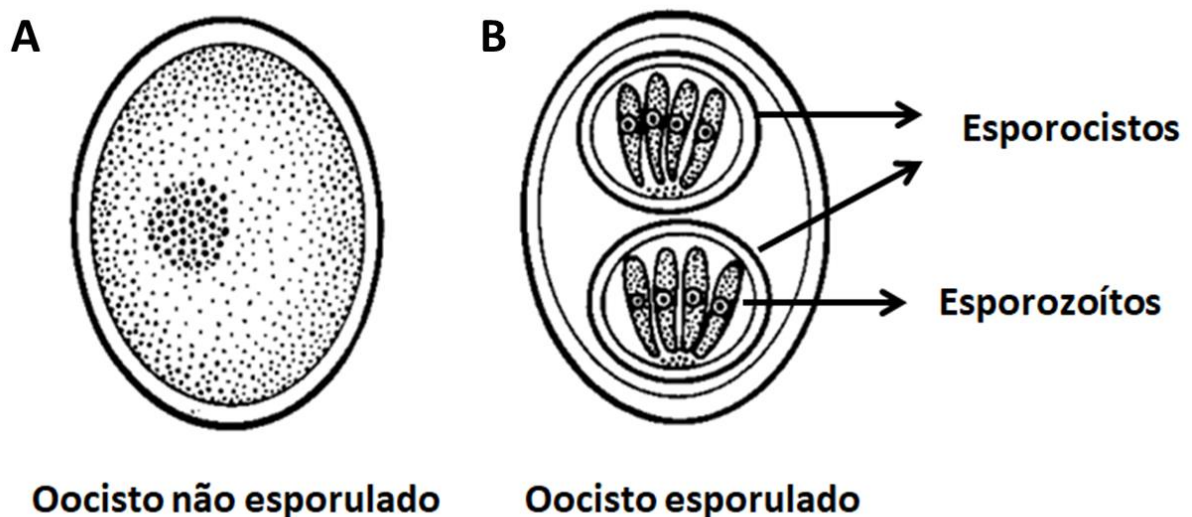


Figura 1: Desenho esquemático de oocistos de *T. gondii*. (A) Oocisto não esporulado. (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos e com quatro esporozoítos em cada. **Fonte:** Adaptado de Dubey, 2004.

Para resistirem às variações ambientais e se manterem viáveis na natureza, os oocistos apresentam uma resistente parede formada por três camadas. A camada mais externa é densa em elétrons, a intermediária é chamada elétron clara e a mais interna é moderadamente elétron-densa. Juntas, as três camadas fornecem proteção e ao mesmo tempo permitem as trocas gasosas entre o meio interno e externo, garantindo a esporulação e sobrevivência do parasito (DUBEY, LINDSAY E SPEER, 1998). Dumètre *et al.* (2013), utilizando a microscopia de força atômica, demonstraram que a rigidez da parede do oocisto assemelha-se a de materiais plásticos e que produtos à base de cloro presentes em desinfetantes e na água potável são ineficazes para inviabilizar esta forma do parasito.

A segunda forma, os taquizoítos, é encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo a responsável pela sintomatologia inespecífica da toxoplasmose (DUBEY, 2004). Os taquizoítos apresentam forma alongada com uma extremidade anterior pontiaguda e outra posterior arredondada (Figura 2A). Eles penetram ativamente nas células do hospedeiro através de um conjunto de estruturas presente em sua extremidade anterior, o complexo apical (SOUZA *et al.*, 2010; DUBEY, LINDSAY E SPEER, 1998). Além do processo de penetração ativa, os taquizoítos podem adentrar a célula hospedeira explorando o mecanismo de fagocitose que algumas células apresentam. Entretanto, quando levado em consideração tempo e evasão do sistema imune, o processo de penetração ativa se mostra mais rápido e eficaz (MORIZAKI, HEUSER E SIBLEY, 1995).

A última forma de *T. gondii*, os bradizoítos, é encontrada durante a fase crônica da infecção dentro de cistos teciduais de parede elástica e fina. Esses cistos são formados dentro do citoplasma das células hospedeiras e seu tamanho pode variar de acordo com a quantidade de bradizoítos em seu interior (DUBEY, LINDSAY E SPEER, 1998). Morfologicamente, os bradizoítos diferem dos taquizoítos somente em relação à posição do núcleo, enquanto que o primeiro apresenta o núcleo situado em direção à parte posterior de seu corpo, o núcleo do segundo encontram-se localizado mais centralmente no parasito (Figura 2B) (DUBEY, 2004).

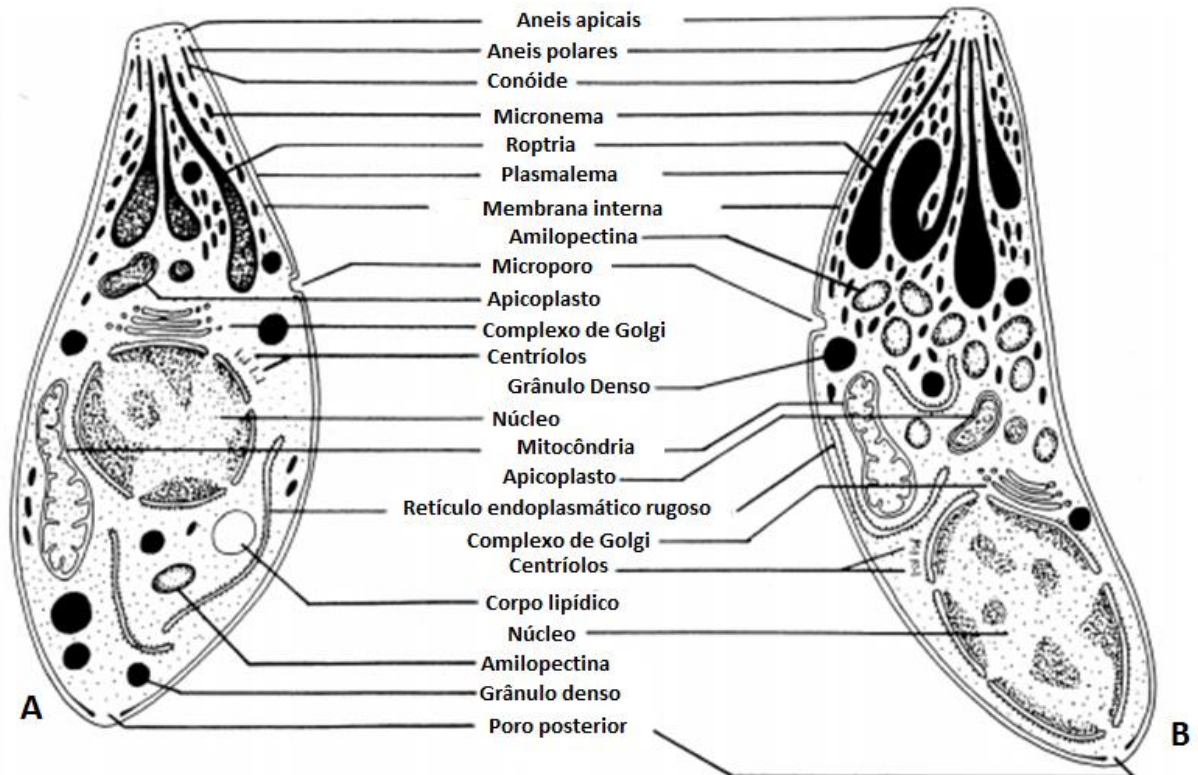


Figura 2: Desenho esquemático do *T. gondii* e suas principais estruturas. (A) Representação de um taquizoíta. (B) Representação de um bradizoíta. **Fonte:** Adaptado de Dubey *et al* , 1998b.

1.1.2 CICLO BIOLÓGICO

O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida heterógeno com a participação de felídeos como hospedeiros definitivos e demais animais de sangue quente, incluindo o homem, como hospedeiros intermediários (DUBEY, 1998a). Felídeos, tanto selvagens quanto domésticos, normalmente adquirem a infecção pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de suas presas. Após deglutição, os cistos chegam ao estômago onde são rompidos pelas enzimas proteolíticas liberando bradizoítos que vão para o intestino delgado. No epitélio intestinal, os bradizoítos se diferenciam em taquizoítos e adentram a lâmina própria onde por endodiogenia se reproduzem e se disseminam pelo corpo. Alguns taquizoítos que permaneceram nas células epiteliais intestinais iniciam o desenvolvimento de cinco formas assexuadas distintas chamadas esquizontes (A-E). Dentro dos esquizontes serão desenvolvidos os merozoítos, que posteriormente serão liberados formando os macro e microgametas (Figura 3A) (DUBEY, J. P., 2004).

Depois da fecundação, inicia-se a formação dos oocistos, quando prontos, estes são liberados para o lúmen intestinal para posterior eliminação através das fezes. Gatos e demais felídeos normalmente só liberam oocistos durante um curto período de tempo (1-2 semanas), uma única vez durante sua vida, porém esses animais são os responsáveis pela contaminação do ambiente e pela perpetuação do ciclo (Figura 3B) (DUBEY, 1998a).

Em hospedeiros intermediários, que incluem quase todos os mamíferos e aves, acontece somente a reprodução assexuada do *T. gondii*. Normalmente a transmissão do parasito para esses animais ocorre via ingestão de água ou alimento contaminados por oocistos. Depois de ingeridos, os oocistos se rompem no estômago e liberam esporozoítos. No intestino, os esporozoítos invadem inicialmente os enterócitos e, dentro de um período de 6 horas, o parasito já pode ser encontrado também na lamina própria, células musculares intestinais, fibroblastos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos intestinais (DUBEY, 1998). Após um período de 12-18 horas, os esporozoítos começam a se diferenciar em taquizoítos. Essa forma do parasito se reproduz rapidamente por endodiogenia, invadindo células, multiplicando-se em seu interior e rompendo-as para a liberação de mais taquizoítos. Neste momento, o parasito consegue alcançar a circulação sistêmica e se disseminar pelo corpo. Esta etapa de intensa parasitemia, rompimento celular e disseminação do parasita caracteriza a fase aguda da infecção (SOUZA *et al.*, 2010; DUBEY, 2004).

Devido à resposta imunológica do hospedeiro, após sucessivas divisões, os taquizoítos saem da corrente sanguínea e vão para os tecidos. Ali, eles se diferenciam em bradizoítos e continuam a se dividir por endogenia de uma forma mais lenta até formarem os cistos teciduais, determinando a fase crônica da infecção. De acordo com Tenter *et al* (2000), o *T. gondii* apresenta uma grande afinidade por tecido muscular e nervoso e a grande maioria dos cistos teciduais em humanos encontra-se alocados no sistema nervoso central (SNC), olhos, músculos esqueléticos e cardíaco (Figura 3C).

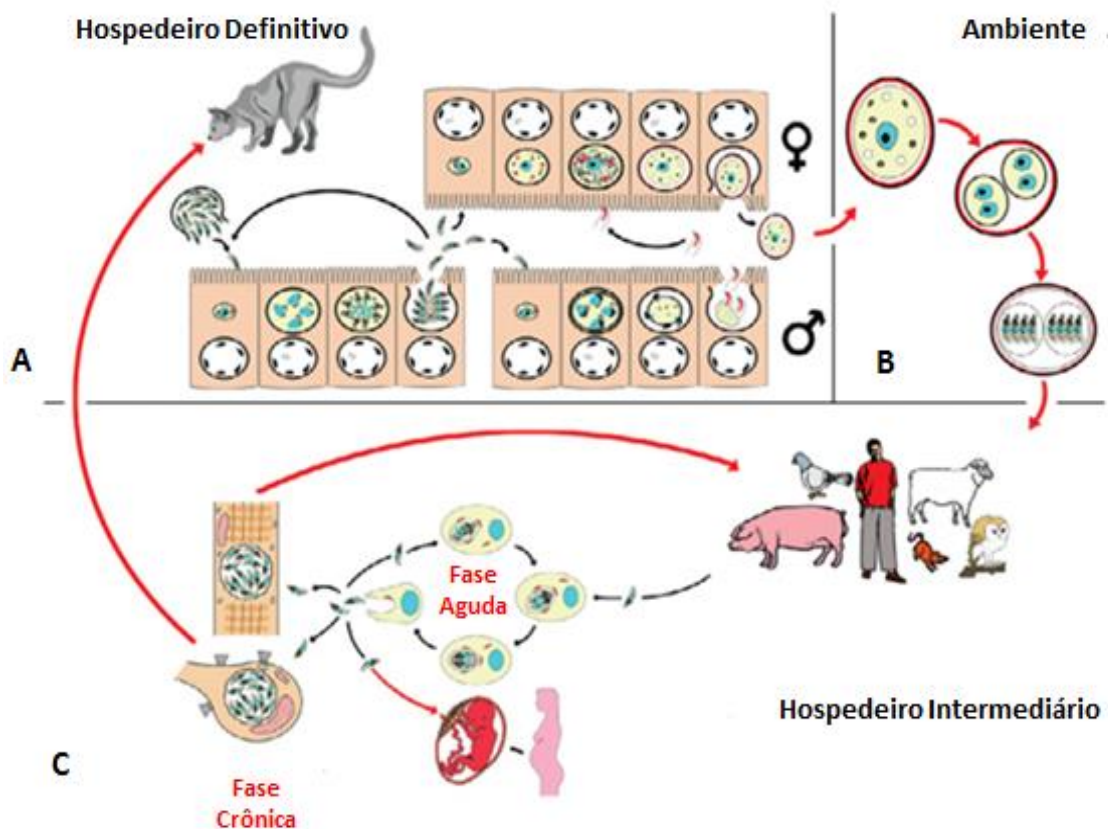


Figura 3: Diagrama representando o ciclo biológico do *T. gondii*. (A) Ciclo biológico em hospedeiros definitivos. (B) Esporulação dos oocistos no meio ambiente. (C) Ciclo biológico em hospedeiros intermediários. **Fonte:** Adaptado de Ferguson, 2009.

1.1.3 TRANSMISSÃO

Apesar das diferenças existentes entre as formas de *T. gondii* e a diversidade de hospedeiros definitivos e intermediários que o parasito possui, a transmissão da toxoplasmose acontece por três formas principais: ingestão de oocistos presentes em alimentos e água contaminada (JONES E DUBEY, 2012), consumo de cistos teciduais presentes na carne mal passada ou crua (HILL E DUBEY, 2002; JONES E DUBEY, 2012) e passagem de taquizoítos presentes em secreções como, por exemplo, sangue e leite materno.

A transmissão congênita da toxoplasmose pode acontecer em ambos hospedeiros, definitivos e intermediários, e é caracterizada pela passagem ativa de taquizoítos pela barreira placentária. Em humanos, este tipo de infecção ocorre quando a mulher adquire a infecção toxoplásmica durante a gestação, ou ainda,

quando a mulher grávida que já estava em fase crônica da doença tem uma reagudização da infecção devido a alterações no seu sistema imune. A gravidade da infecção para o feto vai depender do estágio da gravidez. Ela pode incluir desde uma leve redução da acuidade visual até sintomas mais graves como a Tétrade de Sabin, caracterizada por três sinais clássicos: retinocoroidite, hidrocefalia e retardo mental (DUBEY, 2004). A relação entre gravidade e tempo de gestação é inversamente proporcional, ou seja, quanto mais precoce, mais graves serão as manifestações clínicas diante de uma infecção toxoplásmica (HILL E DUBEY, 2002).

1.1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *T. gondii*

A resposta imunológica contra o *T. gondii* apresenta como objetivo principal limitar a proliferação parasitária. Essa resposta é mediada principalmente por macrófagos, células “*natural killer*” (NK), linfócitos T (LT) e citocinas (FELISETTI E CANDOLFI, 2004). A chegada de células imunes nos sítios inflamatórios é dependente da presença de quimiocinas e da expressão de seus receptores. Estudos demonstram o importante papel do receptor de quimiocinas CCR5 no tráfego de células NK e células dendríticas (CD) no fígado e baço de animais infectados (KHAN *et al.*, 2006; ALIBERTI E SHER, 2002).

Após o primeiro contato do parasito com hospedeiro inicia-se a resposta imune não específica. Neste momento, os macrófagos ativados por interferon gamma (INF γ) combatem o parasito através de mecanismos oxidativos (HUGHES, 1988), produção de monóxido de nitrogênio e de processos não oxidativos como, por exemplo, a degradação de triptofano intracelular (PFEFFERKORN, REBHUN E ECKEL, 1986). Além disso, os macrófagos iniciam a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 12 (IL-12), que são necessários para a ativação de células NK. Juntos, macrófagos, CD e células NK exercem papel crucial para resistência inicial do hospedeiro ao *T. gondii* (HUNTER *et al.*, 1994). Além deles, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos contribuem produzindo IL-12. Os LT iniciam a resposta adquirida e específica contra o parasito, eles apresentam atividade citotóxica contra células infectadas e produzem mediadores químicos essenciais para o desenvolvimento da resposta do tipo Th1 (ARAUJO, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1993; FILISETTI E CANDOLFI, 2004; MUNOZ, LIESENFELD E HEIMESAAT, 2011).

A resposta do tipo Th1 classificada como protetora é essencial para a resistência do hospedeiro. Esse padrão de resposta é mediado principalmente por INF γ e IL-12 que atuam na ativação de células imunes na fase aguda da infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1993; SUZUKI *et al.*, 1988; HUNTER *et al.*, 1995). Além disso, INF γ é quem induz a conversão de taquizoítos em bradizoítos (JONES, BIENZ E ERB, 1986) e a IL-12 mantém a resposta de longo prazo contra o *T. gondii* durante a fase crônica da infecção (YAP, PESIN E SHER, 2000). Para que se tenha uma resposta imune adequada contra o parasito, deve-se existir um balanço entre as respostas Th1 e Th2. Essa segunda resposta, chamada de regulatória, apresenta um perfil de citocinas que inibem a produção de mediadores da resposta do tipo Th1. Se a resposta se direcionar acentuadamente para um padrão Th1 o hospedeiro pode desenvolver doenças imunes, enquanto que a exacerbação da resposta do tipo Th2 pode levar ao desenvolvimento de imunossupressão acompanhada de aumento da carga parasitária (GAZZINELLI *et al.*, 1993).

Em relação à resposta humoral, anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos durante a infecção toxoplásmica. Essa classe de imunoglobulinas são ótimos ativadores do sistema complemento. Os anticorpos IgG anti *T. gondii* são a segunda classe a aparecer durante a infecção, eles atuam sobre taquizoítos extracelulares por meio da opsonização e de lise via complexo de ataque à membrana (MAC) (FILISSETTI E CANDOLFI, 2004). A persistência da memória imunológica contra o *T. gondii* se dá pela ruptura de cistos teciduais e ainda pela recorrente reinfecção através da alimentação. Esse mecanismo de memória é assegurado por vias de sinalização intracelulares como o fator nuclear kappa B (NF κ B) (CAAMANO J. *et al.*, 2000).

Quando se fala de resposta imunológica contra o *T. gondii*, deve-se levar em consideração que a susceptibilidade imunológica do hospedeiro pode determinar a gravidade da infecção toxoplásmica. Em pacientes imunocompetentes, a infecção normalmente é assintomática e quando acompanhada de sintomas esses são similares aos de um resfriado, como por exemplo, linfadenopatia, fadiga, dor muscular, entre outros (HILL e DUBEY, 2002). Já em pacientes imunocomprometidos, a infecção por *T. gondii* é mais severa e traz sintomas como dor de cabeça, desorientação, hemiparesia e convulsão, sendo até fatal se não

tratada. A encefalite toxoplásmica e a disseminação do parasita para vários órgãos são frequentemente observadas em pacientes HIV positivos (TENTER *et al.*, 2000).

Muitos pesquisadores procuram entender como o perfil de resposta imunológica relaciona-se à resistência ou susceptibilidade ao *T. gondii*, e para alcançar esse objetivo eles usam utilizados modelos murinos distintos. Os ratos são considerados um excelente modelo de resistência ao *T. gondii*. Nesses animais, a infecção pelo parasito segue um curso parecido ao observado em humanos com características clínicas semelhantes (DUBEY e FRENKEL, 1998c). Os camundongos C57BL/6 são considerados o modelo de susceptibilidade ao parasito, pois esses animais tendem a morrer dentro de um curto período após a infecção (SUZUKY *et al.*, 2001) , enquanto que os camundongos BALB/C apresentam resistência a infecção sobrevivendo por mais tempo após o inóculo (SUZUKY *et al.*,2000).

1.1.5 MECANISMOS DE EVASÃO DO *T. gondii*

Com o objetivo de permanecer vivo, o *T. gondii* apresenta diversos mecanismos de evasão que possibilitam que o parasito escape da vigilância imunológica e se estabeleça no organismo de hospedeiros invertebrados. Um desses mecanismos se estabelece durante o processo de invasão celular e consiste na formação do vacúolo parasitóforo (VP) (CLOUGH e FRICKEL, 2017).

Resultado de uma invaginação formada na membrana da célula hospedeira durante o processo de penetração de taquizoítos, o VP é recoberto por uma membrana que contém proteínas e lipídios próprios do hospedeiro (SUSS-TOBY, ZIMMERBERG e WARD, 1996). A presença dessas proteínas próprias determina a característica não fusogênica do VP, ou seja, não ocorre sua fusão à enzimas lisossomais e conseqüente acidificação do meio, um mecanismo que seria necessário para destruição do parasito durante as fases iniciais da infecção (SIBLEY , 2011; HUNTER e SIBLEY, 2012). Associado a esse mecanismo, o VP irá atrair mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira para sua superfície com objetivo de adquirir energia e ao mesmo tempo formar uma barreira física que dificulta a sua fusão com os lisossomos. No interior do VP, o *T. gondii* irá modular a atividade metabólica celular a seu favor através da produção e liberação de diversos

fatores proteicos, como por exemplo, as proteínas de granulo denso (GRAS). (BOUGDOUR *et al.*, 2013; ANGELONI, 2009).

Alterações na transcrição de genes envolvidos nos mecanismos de sinalização e resposta imune também são observadas durante a infecção toxoplásmica. Nas fases iniciais, o parasito consegue inibir parte da produção de óxido nítrico por macrófagos. Durante o curso da infecção são observadas alterações em vias essenciais da resposta imune, como STAT 1 e NFkB , e ainda mudanças na liberação de INF γ . Deste modo, o parasito consegue modular a resposta imune a seu favor, auxiliando no equilíbrio parasito-hospedeiro, com objetivo de garantir a sobrevivência do hospedeiro e conseqüentemente a sua também (LUDER *et al.*, 2003; SEABRA, SOUZA e DAMATTA, 2002; SHAPIRA *et al.*, 2002).

1.1.6 A INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA E O TRATO GASTROINTESTINAL

Devido ao fato de o trato gastrointestinal (TGI) ser a principal via de entrada do *T. gondii* no organismo, nos últimos anos vários estudos foram publicados tendo como objetivo identificar as alterações provocadas por esta infecção. Análises foram realizadas em diferentes espécies de animais, como gatos (DA SILVA *et al.*, 2010a), porcos (DA SILVA *et al.*, 2010b), frangos (BONAPAZ *et al.*, 2010; BRAGA *et al.*, 2011) e ratos (GÓIS *et al.*, 2016), avaliando-se as lesões decorrentes da infecção com cepas distintas (SHRAISHI *et al.*, 2009,) e em diferentes segmentos intestinais.

Anatomicamente, o tubo digestório encontra-se dividido em superior e inferior, sendo a primeira parte composta pela boca, faringe, esôfago e estômago; e a segunda é composta pelo intestino delgado e intestino grosso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Levando-se em consideração que para alcançar a circulação sistêmica do hospedeiro o *T. gondii* necessita atravessar a parede intestinal (DUBEY, 1998), as descrições histológicas e as principais alterações citadas a seguir terão como foco principal o intestino delgado e grosso.

1.1.6.1 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO TRATO GASTROINTESTINAL

A parede do TGI é formada por quatro camadas básicas: túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa. A túnica mucosa é a camada mais interna e apresenta contato direto com o lúmen. Ela é formada por um revestimento epitelial, uma lamina própria de tecido conjuntivo frouxo e uma fina camada muscular que a separa da camada adjacente e lhe propicia movimentos próprios (Figura 4) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). A mucosa é revestida principalmente por células colunares denominadas de enterócitos e por células caliciformes produtoras de mucinas (BRAGA *et al.*, 2011).

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que podem ser classificadas de acordo com sua composição química em neutras ou ácidas. As ácidas são divididas em: não sulfatadas (sialomucinas) e sulfatadas (sulfomucinas) (MYERS *et al.*, 2008). Por apresentarem oligômeros de cisteína em sua porção amino e carboxiterminal, elas permanecem ligadas ao epitélio intestinal após sua secreção, e podem interagir uma com as outras formando o muco (PELASEYED *et al.*, 2014; JOHANSSON e HANSSON, 2016). Além das mucinas, o muco contém outras substâncias, como moléculas de IgA, lisoenzimas e defensinas, que auxiliarão na formação de uma barreira protetora contra patógenos externos (BEVINS e SALZMAN, 2011; MEYER-HOFFERT *et al.*, 2007; WERSHIL e FURUTA, 2008).

Participando da proteção da parede intestinal, encontram-se também na mucosa os linfócitos intraepiteliais (LIE). Essas células desempenham um importante papel na manutenção da homeostase local, regulando a atividade imune (WERSHIL e FURUTA, 2008). Ao longo do intestino, os LIE são constituídos principalmente por células T que expressam dois tipos de receptores: (a) $\gamma\delta$ TCRs e (b) CD8 $\alpha\alpha$ (KUNISAWA, TAKAHASHI e KIYONO, 2007; CHEN *et al.*, 2002). A proporção de LIE naives e células de memória/ativadas diferem nas duas porções do TGI. Enquanto que no intestino delgado a população é predominantemente de células de memória/ativadas, no grosso elas encontram-se em menores quantidades quando comparada às naives (KUNISAWA, TAKAHASHI e KIYONO, 2007).

Mais internamente em relação à mucosa, encontra-se a tela submucosa. Ela é uma camada composta por um tecido conjuntivo altamente vascularizado que pode conter glândulas e tecido linfoide. Um pouco mais externamente, observa-se a túnica muscular, formada por células musculares lisas que se dispõem em

orientações diferentes, resultando em duas subcamadas: a muscular circular ou helicoidal de passo curto e a muscular longitudinal ou helicoidal de passo longo (Figura 4) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Por último, na parede do TGI encontra-se a camada serosa (Figura 4). Formada por uma fina camada de tecido epitelial sobre tecido conjuntivo frouxo, ela é responsável por delimitar o órgão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

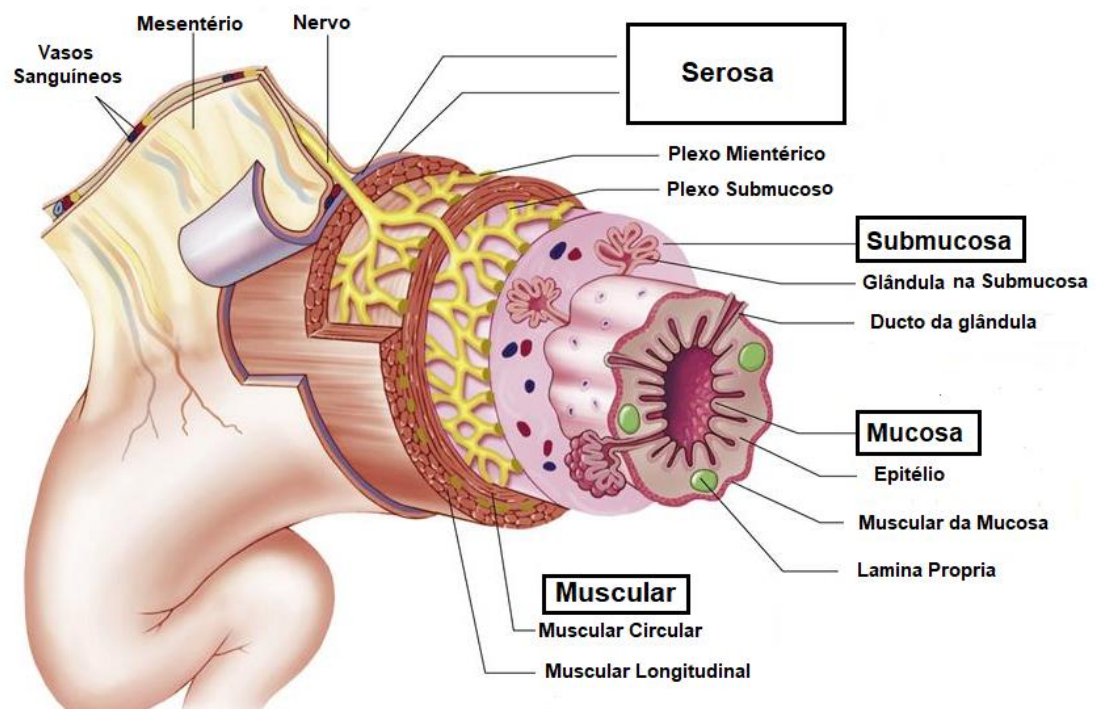


Figura 4: Diagrama representando a parede do TGI. **Fonte:** Adaptado de Patton e Thibodeau, 2013.

Auxiliando na manutenção estrutural do TGI encontra-se a matriz extracelular (MEC) composta por um conjunto de diferentes proteínas fibrosas e macromoléculas que se dispõem em rede, conectando as células uma com as outras. As fibras encontradas na MEC são predominantemente compostas por colágeno, uma proteína que apresenta diferentes graus de rigidez, elasticidade e força de tensão. Por este motivo, o colágeno hoje pode ser classificado em mais de 20 tipos de acordo com suas características e funções (RICARD-BLUM, 2011). Os do tipo I e III são conhecidos por sua resistência à tensão e por estarem associados a manutenção de órgãos expansíveis, como por exemplo o intestino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

1.1.6.2 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO TGI DECORRENTES DA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA

Durante o processo de invasão pelo *T. gondii* e ruptura das células epiteliais da mucosa intestinal, observa-se um processo inflamatório local que desencadeia danos ao longo de toda a parede do TGI. Os enterócitos invadidos começam a liberar grandes quantidades de citocinas e quimiocinas, enquanto que os LIE presentes na mucosa passam a produzir IFN- γ com o objetivo de reduzir a multiplicação parasitária (BOUT *et al.*, 1999; KUNISAWA *et al.*, 2007; COHEN; DENKERS, 2014). Alterações na produção e constituição do muco liberado pelas células caliciformes também são observadas (SHIRAISHI *et al.*, 2009; SANT'ANA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Em decorrência de lesões, a proporção de colágeno do tipo I e III pode ser alterada para formação do tecido cicatrizante (CHENG *et al.*, 2011). Múltiplos fatores liberados durante o processo inflamatório podem contribuir para a geração de uma resposta exagerada com consequente formação de uma MEC rica em colágeno. Entre eles estão liberação de moléculas fibrogênicas como o TGF- β , activinas, endotelinas, interleucinas e outras quimiocinas (RIEDER, FIOCCHI e ROGLER, 2017; GRASSL *et al.*, 2008).

As características histológicas da parede intestinal já foram alvo de vários trabalhos que buscavam descrever as alterações causadas pelo *T. gondii* no TGI. No duodeno de gatos, a infecção por oocisto da cepa ME-49 gera atrofia da túnica mucosa e da túnica muscular com consequente redução da parede total. Observa-se também aumento na altura dos enterócitos, na secreção de sulfomucinas e na porcentagem de fibras colágenas durante a fase crônica da infecção (DA SILVA *et al.*, 2010a). No duodeno de frangos, a infecção pela cepa M774 desencadeou alterações semelhantes (BONAPAZ *et al.*, 2010).

Trevizan *et al* (2016) investigaram as alterações causada pelo *T. gondii* durante o curso da infecção. Neste estudo, o duodeno de ratos foi analisado em diferentes períodos após a inoculação de oocistos da cepa ME-49. Os resultados obtidos mostraram atrofia da parede total do órgão em todos os grupos, aumento no número de células caliciformes produtoras de mucinas neutras após 6, 12 horas e 7 dias de infecção, aumento no número de células caliciformes produtoras de mucinas

ácidas durante o período de 7 e 10 dias e queda no número de LIE 48 horas após a inoculação.

Dois estudos foram realizados no jejuno de animais infectados. O primeiro realizado em porcos, com cepas do genótipo III (M7741) e durante a fase crônica da infecção, mostrou hipertrofia da parede total, aumento na altura dos enterócitos e queda no número de LIE (DA SILVA *et al.*, 2010b). O segundo estudo descreve que a infecção em ratos com oocistos da cepa ME-49 causou atrofia da parede total do órgão com hipertrofia da camada muscular e aumento no número de LIE durante a fase crônica (VICENTINO-VIEIRA *et al.*, 2016).

Shiraishi *et al.* (2009) avaliaram frangos infectados com cepas ME-49 (genótipo II) e M7741 (genótipo III), analisando o íleo durante a fase crônica da infecção. Os autores descrevem aumento da parede total e da secreção de mucinas neutras nos animais infectados com cepas do genótipo II. A atrofia da parede do órgão e o aumento da secreção de mucinas neutras foram constatados no grupo infectado com a cepa do genótipo III.

No cólon, a infecção durante a fase crônica desencadeou hipertrofia da parede total, sem alterações no número de células caliciformes e de enterócitos, em modelos experimentais com inóculos de ambas as cepas, ME-49 e M7741 (BRAGA, *et al.*, 2011). Em ratos, observaram queda no número de LIE, células caliciformes produtoras de sulfomucinas e aumento na profundidade das criptas durante a fase crônica da infecção causada por oocistos da cepa ME-49 (GÓIS *et al.*, 2016).

1.1.6.3 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

Uma das principais características que diferem o TGI dos demais órgãos periféricos é a presença de uma rede intrínseca de neurônios e feixes nervosos, denominada de sistema nervoso entérico (SNE) (LYTE e CRYAN, 2014). Esses neurônios e fibras nervosas encontram-se distribuídos na parede de todo o tubo digestório, desde o esôfago até o ânus, e são responsáveis pelo controle das principais funções desse sistema (FURNESS, 2006). Embora possa atuar de forma independente do sistema nervoso central, o SNE é controlado por uma rede integrada que envolve interações entre reflexos locais e reflexos externos advindos

do sistema nervoso simpático, parassimpático e de neurônios sensoriais (LYTE e CRYAN, 2014; FURNESS, 2006).

O SNE encontra-se organizado em dois tipos principais de plexos: os ganglionados e os aganglionados. Os plexos são nomeados de acordo com sua localização dentro da parede intestinal e apresentam funções distintas. Entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular, encontra-se o plexo mioentérico ou de Auerbach. Mais internamente logo abaixo da mucosa e da sua muscular, situa-se o plexo submucoso ou de Meissner. Funcionalmente, o plexo mioentérico é responsável pelo controle da motilidade intestinal, enquanto que o submucoso regula a fluxo de água entre lúmen e parede intestinal através da secreção de cloreto. Os plexos aganglionados encontram-se também entre as camadas da parede do TGI e sua principal característica é a ausência de corpos celulares de neurônios (Figura 5) (FURNESS, 2012; FURNESS, 2006).

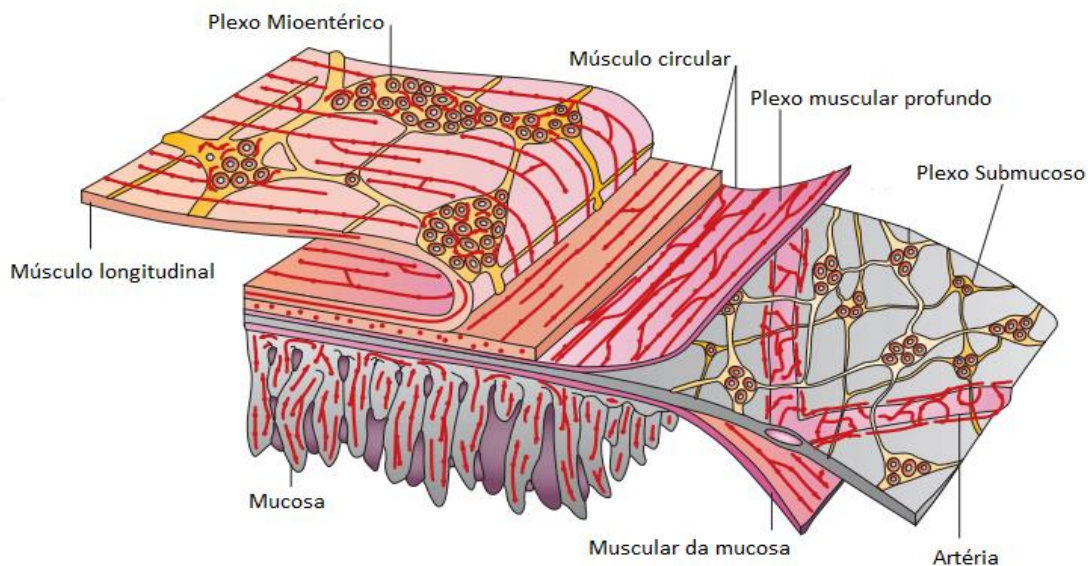


Figura 5: Organização do sistema nervoso entérico. **Fonte:** Adaptado de Furness, 2012.

Além das diferenças na localização e função, os plexos mioentérico e submucoso diferem quanto à sua distribuição ao longo do tubo digestório e da disposição de seus gânglios. Enquanto o plexo mioentérico encontra-se bem estabelecido por todo o tubo digestório, o plexo submucoso é mais proeminente somente nos intestinos delgado e grosso (Figura 6) (FURNESS, 2006). Em ambos os plexos, os neurônios podem ser encontrados de forma isolada ou em conjunto

formando os gânglios. Devido às suas particularidades essas células encontram-se divididas em grupos distintos de acordo com suas características morfológicas, eletrofisiológicas, químicas e sua função (FURNESS, 2000).

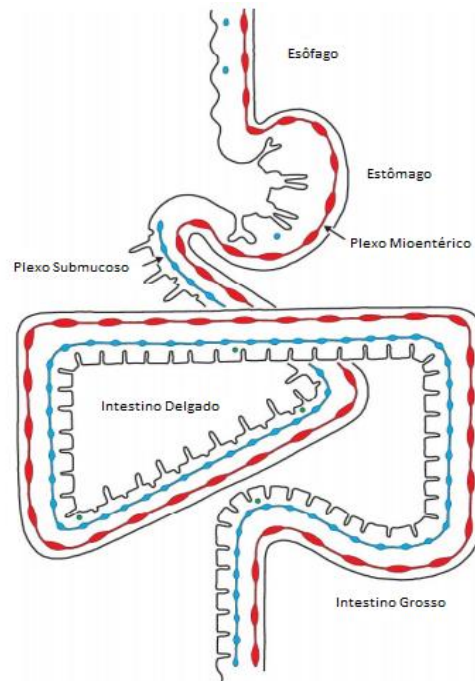


Figura 6: Distribuição dos gânglios ao longo do TGI. Plexo submucoso em azul. Plexo mioentérico em vermelho. **Fonte:** Adaptado de Furness, 2000.

1.1.6.4 MOTILIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL

A motilidade intestinal consiste na capacidade de contração e relaxamento da musculatura lisa do TGI (OLSSON e HOLMGREN, 2011). Como dito anteriormente, seu controle é mediado por neurônios entéricos, mais especificamente por aqueles presentes no plexo mioentérico. Existem vários fatores envolvidos na regulação desse processo e entre eles encontram-se o tipo de neurotransmissor liberado e a presença de receptores nas células-alvo (SMITH, 1970; LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002). Hoje, mais de 20 tipos de neurotransmissores já foram identificados no SNE e muitos neurônios podem expressar mais de um deles (FURNESS, 2006).

A acetilcolina (ACh), juntamente com as taquicininas, formam a classe dos principais neurotransmissores excitatórios do plexo mioentérico (FURNESS, 2006, SANDERS et al, 2012;). Existem dois tipos de receptores que medeiam a

interação da ACh com as células: (a) os receptores nicotínicos e (b) muscarínicos. Os primeiros são requerido para uma transmissão mais ágil, com o objetivo de propagar os reflexos mais rapidamente e produzir grandes respostas (HARRINGTON, HUTSON, SOULHWELL, 2010). Os segundos apresentam 5 subtipos de receptores (M_1 a M_5), sendo mais predominantemente expressos na musculatura lisa os tipos M_2 e M_3 (SANDERS et al, 2012). Estudos já demonstraram que os receptores M_3 estão mais envolvidos na contração intestinal do que os do tipo M_2 . Sua ativação induz a atividade de fosfolipases, a liberação de Ca^{2+} dos depósitos intracelulares e ativação de proteínas quinases. Já os receptores M_2 utilizam mecanismos de inibição da atividade da adenilato ciclase para desligar os sinais relaxatórios (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002, HARRINGTON, HUTSON, SOULHWELL, 2010).

A outra classe de neurotransmissores que auxilia no controle da motilidade intestinal é a dos inibitórios. Eles apresentam importante papel, pois promovem os reflexos de relaxamento na região distal da parede muscular visando facilitar propulsão do quimo em direção ao ânus (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002). O óxido nítrico (ON) é o neurotransmissor inibitório mais proeminente e atua através da ativação de canais de potássio (K) e da diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} . Dentro dessa classe de neurotransmissores encontra-se também o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) que assim como o ON reduz a excitabilidade e contração da musculatura lisa, modulando os canais de K^+ e diminuindo a sensibilidade ao cálcio (SANDERS *et al*, 2012).

1.1.6.5 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO SNE DECORRENTES DA INFECÇÃO TOXOPLASMICA

Para manter a homeostase no TGI, o SNE e seus constituintes necessitam interagir com o sistema imune e o sistema endócrino para criar um ambiente onde neuropeptídios, citocinas e hormônios estejam em níveis ideais. Qualquer alteração em um desses sistemas, seja imune ou endócrina, pode desencadear alterações no SNE e uma disfunção no TGI. Dentre os fatores que podem contribuir para a perda da homeostase estão as infecções parasitárias

(HALLIEZ e BURET, 2015). Dentre as alterações que essas infecções podem causar, encontra-se modificações na distribuição nervosa, nos níveis neuroquímicos e na função dos neurônios (STEAD *et al.*, 1991; LOURENSSEN *et al.*, 2010).

As alterações causadas pelo *T. gondii* sobre o SNE variam de acordo com as fases da infecção (aguda ou crônica) e com o genótipo da cepa utilizada (I, II ou III). Ratos inoculados intraperitonealmente com cepas do genótipo I apresentam, durante a fase crônica da infecção, morte de neurônios mioentéricos no jejuno acompanhada de alterações morfométricas neuronais em todos os segmentos do intestino delgado (SILVA *et al.*, 2011). As cepas de genótipo II não causam morte de neurônios mioentéricos do íleo, porém geram hipertrofia do corpo celular durante a fase aguda da infecção (SUGAUARA *et al.*, 2009.). Na fase crônica, observa-se no jejuno de ratos hipertrofia de neurônios mioentéricos totais, seguida de hiperplasia da subpopulação nitrérgica (ARAÚJO, *et al.*, 2015).

A análise do jejuno de ratos infectados com diferentes inóculos da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii* demonstrou que as principais alterações ocorrem com inóculos contendo maiores quantidades do parasito. Os animais apresentam redução no número de neurônios mioentéricos metabolicamente ativos e atrofia do corpo celular (VINCENTINO-VIEIRA *et al.*, 2015). Em relação ao plexo submucoso, a infecção pela cepa ME-49 causou uma redução no número de neurônios VIPérgicos jejunais durante a fase crônica (SANT'ANA *et al.*, 2012).

As principais alterações encontradas no intestino delgado de ratos inoculados com cepa de genótipo III durante a fase aguda são atrofia de neurônios mioentéricos totais no duodeno e íleo (SUGAUARA *et al.*, 2008). Já na fase crônica esta cepa desencadeia hipertrofia de neurônios mioentéricos totais no duodeno (PAPAZIAN-CABANAS *et al.*, 2012) e atrofia de neurônios nitrérgicos no jejuno (HERMES-ULIANA *et al.*, 2011.).

Quanto ao intestino grosso, ratos inoculados com cepas de genótipo I (BTU IV) apresentam, na fase crônica da infecção, aumento na densidade de neurônios mioentéricos totais do ceco (ZANIOLO *et al.*, 2012.). No cólon descendente, a infecção pela mesma cepa não desencadeou alterações no número de neurônios mioentéricos, mas as células encontravam-se hipertrofiadas (SOARES *et al.*, 2009). A infecção por cepas do genótipo II (ME-49) também desencadeia alterações no cólon de ratos. Os animais infectados apresentam redução no número de neurônios mioentéricos totais e aumento de neurônios nitrérgicos. Foi observado

também que as alterações mais significativas ocorreram em doses maiores de inóculo do parasito (FEREZIN *et al.*, 2017).

No plexo submucoso, infecções por esta mesma cepa gerou redução no número de neurônios totais, hipertrofia e aumento na expressão de neurônios VIPérgicos (GÓIS *et al.*, 2016). As alterações verificadas durante a infecção em ratos por cepas de genótipo III são atrofia de neurônios mioentéricos no cólon descendente durante a fase aguda, seguida de hipertrofia na crônica (SUGAUARA *et al.*, 2008).

Embora o *T. gondii* seja um parasito com ampla distribuição mundial e a toxoplasmose represente hoje um dos principais problemas de saúde pública, a grande maioria dos trabalhos publicados sobre esse tema se limitam a consequências da infecção sobre o sistema nervoso central e retina. Como este parasito apresenta tropismo pelo sistema nervoso (TENTER *et al.*, 2000), um aumento crescente de estudos tem demonstrado as alterações que essa infecção traz ao SNE (SUGAUARA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2015; TREVIZAN *et al.*, 2016). Porém, a maioria das análises são realizadas somente durante uma fase da infecção e não correlacionem as modificações encontradas com as possíveis alterações funcionais intestinais.

Desta forma, estudos avaliando as alterações durante o curso da infecção toxoplásmica se fazem necessário para se identificar em que momento as alterações sobre a parede intestinal e SNE se inciam e intensificam-se, e como essas modificações podem alterar os padrões de motilidade intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da infecção toxoplásmica aguda e crônica causada pela cepa ME-49 de *T. gondii* sobre os parâmetros morfofisiológicos do plexo mioentérico e histológicos da parede do colon de ratos Wistar.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar a parede do colón de ratos infectados com oocisto da cepa ME-49 de *T. gondii* buscando identificar, durante o curso da infecção (6 horas – 30 dias), quais são as principais alterações histológicas.
- Avaliar a densidade populacional e a morfometria do corpo celular da população total e subpopulações de neurônios nitrérgicos e colinérgicos visando investigar os efeitos da infecção toxoplásmica sobre o plexo mioentérico.
- Verificar os parâmetros de motilidade colônica de ratos após 30 dias de infecção com oocistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*, visando identificar se as alterações numéricas/morfométrica encontradas no plexo mioentérico podem desencadear mudanças nos padrões de motilidade.

REFERENCIAS

- ALIBERTI, J.; SHER, A.. Role of G-protein-coupled signaling in the induction and regulation of dendritic cell function by *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.** v.4, p.991-997, 2002.
- ANGELONI, M.B.; et al. Apoptosis and S phase of the cell cycle in Bewo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta.** v.30, p.785-791, 2009.
- ARAÚJO, E.J.A.; ZANIOLO, L.M.; VICENTINO, S.L.; GOIS, M.B.; ZANONI, J.N.; DA SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21 (16), p. 4829-4839, 2015.
- ARAUJO, F. G.. Depletion of L3T4⁺ (CD4⁺) T Lymphocytes Prevents Development of Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Infection and Immunity.** v.59, n.5, p.1614-1619, 1991.
- BEVINS, Charles L. e SALZMAN, Nita H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Reviews.** v.9, p.356-368, 2011.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; DA SILVA, E. M. K.. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.30, p.21-25, 1997.
- BONAPAZ, R.S.; HERMES-ULIANA, C.; SANTOS, F.N.; DA SILVA, A.V.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30(9), p. 787-792, 2010.
- BOUGDOUR, Alexandre *et al.* Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. **Cell Host & Microbe.** v.13, p.489-500, 2013.
- BOUT, D.; MORETTO, M.; DIMIER-POISSON, I.; GATEL, D.B. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, v. 201, n. 2, p. 225-228, 1999
- BRAGA, C.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, E.J.A. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 340-347, 2011.
- CAAMANO J. *et al.* Identification of a role for NF-kappa B2 in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** v.165, p.5720-5728, 2000.
- CAMPBELL, R. S. F.; MARTIN, W. B.; GORDON, E. D.. Toxoplasmosis as a complication of canine distemper. **Vet. Rec.** v.67, p.708-716, 1955.
- CHEN, Yaping *et al.* Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial T cells. **PNAS.** v.99, n.22, p. 14338 -14343, 2007.
- CHENG, W. *et al.* The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. **African Journal of Biotechnology.** v.10, p.2524-2529, 2011.

- CLOUGH, Barbara; FRICKEL, Eva-Maria. The *Toxoplasma* parasitophorous vacuole: an evolving host-parasite frontier. **Trends in Parasitology**. v. 33, n.6, p.473-488, 2017.
- COLE, R. A. *et al.*. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **J. Parasitol.** v.86, p.526–530, 2000.
- COHEN, S.B.; DENKERS, E.Y. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. **Mucosal Immunology**, v. 7, p. 744-752, 2014.
- DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**. v.15, p. 366-371, 2008.
- DA SILVA, J.M.; DA SILVA, A.V.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT’ANA, D.M.G. Efeitos da infecção toxoplásmica crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de garos domésticos. *Revista brasileira da Parasitologia Veterinária*. v.19, n.1, p.55-61, 2010a.
- DA SILVA, P.C.; SHIRAISHI, C.S.; DA SILVA, A.V.; GONÇALVES, G.F.; SANT’ANA, D.M.G.; ARAÚJO, E.J.A. *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental Parasitology*, v. 125, p. 380–383, 2010b.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, M. D.. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J. Exp. Med.** v.132, p.636-662, 1970.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v.28, p.1019-1024, 1998a.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER C. A.. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, n.2, p. 267-299, 1998b.
- DUBEY, J. P and FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**. v.77, p.1-32, 1998c.
- DUBEY, J. P.. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Vet. Parasitol.**, v.106, p.121–153, 2002.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**. v.126, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v.139, p.1375-1424, 2012
- DUMÈTRE, A. *et al.*. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **PNAS**. v.110, n.28, p.11535-11540, 2013.
- FEREZIN, R. I. *et al.*. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. **Braz. J. Vet. Parasitol.** v.26, n.1, p.47-53, 2017.

FERNÁNDEZ, Carolina *et al.* Host and *Toxoplasma gondii* genetic and non-genetic factors influencing the development of ocular toxoplasmosis: A systematic review. **Infection, Genetics and Evolution**. v.44, p.199-209, 2016.

FILISSETTI, Denis; CANDOLFI, Ermanno. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann. Ist. Super Sanità**. v.40, n.1, p.71-80, 2004.

FURNES, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v.81, p.87-96, 2000.

FURNES, J.B. **The Enteric Nervous System**. Nova York, Blackwell publishing. 2006. 288p.

FURNES, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Gastroenterology e Hepatology**. v.9, p.286-204, May 2012

GAZZINELLI, R. T. *et al.*. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.90, p.6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**. v.151, n.7, p.3672-3681, 1993

GÓIS, M.B.; HERMES-ULIANA, C.; ZAGO, M.C.B.; ZANONI, J.N.; DA SILVA, A.V.; MIRANDA-NETO, M.H.M.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. 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.

GRASSL, G. A. *et al.* Chronic EntericSalmonellaInfection in Mice Leads to Severe and Persistent Intestinal Fibrosis. **Gastroenterology**. v.134, p.768-780, 2008.

HALLIEZ, Marie C. M.; BURET, André G. Gastrointestinal Parasites and the Neural Control of Gut Functions. **Frontiers in Cellular Neuroscience**., v.9, article,452, Nov. 2015.

HARTLEY, W. J.; MARSHALL, S. C.. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality **N.Z. Vet. J.** v.5, p.119–124, 1957.

HARRINGTON, Andrea M.; HUTSON, John M.; SOULTHWELL, Bridget R.. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptorsin the enteric nervous system. *Science Dierct*. v.44, p.173-202, 2010.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**. v.8, p.634-640, 2002.

HERMES-ULIANA, C. *et al.* Chronic infection with*Toxoplasma gondii*causes myenteric neuroplasticity of the jejunum in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v.160, p.3-8, 2011.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Anim Health Res.**, v.6, n.1, p.41-61. Jun. 2005.

- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D.. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human diseases. **J. Infect. Dis.** v.172, p.1561, 1995.
- HUGHES, H. P. A.. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitol Today.** v.4,p.340-347, 1988.
- HUNTER, C. A. *et al.* Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from *Toxoplasma gondii* – Infected SCID Mice: Regulation by Interleukin-10, Interleukin12, and Tumor Necrosis Factor Alpha. **Infection and Immunity.** v.62, n.7, p. 2818-2824, 1994.
- HUNTER, C. A. *et al.* Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. **Immunology.** v.84, p.16-20, 1995.
- HUNTER C. A; SIBLEY David. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Rev Microbiol.** v.10, p. 766-778, 2012
- JOHANSSON, Malin E. V. e HANSSON, Gunnar C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **Nature Reviews.** v.16, p.639-649, 2016.
- JONES, T. C.; BIENZ, K. A.; ERB, P.. In Vitro Cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in Astrocytes in the Presence of Gamma Interferon. **Infection and Immunity.** v.51, n.1, p.147-156, 1986.
- JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne Toxoplasmosis. **Clin Infect Dis.**, v.55, p.845–851, 2012.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KHAN, I. A *et al.* CCR5 Is Essential for NK Cell Trafficking and Host Survival following *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS Pathogens.** v.2, p.484-500, 2006.
- KUNISAWA, Jun; TAKAHASHI, Ichiro; KIYONO, Hiroshi. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. **Immunological Reviews.** v.215, p.136-153, 2007.
- LECCI, Alessandro; SANTICIOLI, Paolo; MAGGI, Carlo A.. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Current opinion in pharmacology.** v. 2, n. 6, p. 630-641, 2002
- LOURENSSEN, Sandra *et al.* Entamoeba histolytica Infection and Secreted Proteins Proteolytically Damage Enteric Neurons. **Infection and Immunity.** v.78, n.12, p.5332-5340, 2010
- LUDER, C. G. K. *et al.* Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **International Journal for Parasitology.** v.33, p.833-844, 2003.
- LYTE, M. and CRYAN, J. F. **Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease.** 4° ed. New York 2014. Springer. 2014.

- MELLO, U.. Un cas de toxoplasmose du chien observe´ a` Turin (2). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil.**, v.3, p.359–363, 1910.
- MEYER-HOFFERT *et al.*. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. **Intestinal Infection**. v.57, p. 764-771, 2007.
- MILLAR, P. R. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**. v.37, p.292-295, 2007.
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M.. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunology Reviews**. v.240, p.269-285, 2011.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, M. D.. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v.363, n.9425, p.1965-1976, 2004.
- MORIZAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D.. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**. v.108, p.2457-2464, 1995.
- MYERS, B.M.; FREDENBURGH, J.L.; GRIZZLE, W.E. Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
- NICOLLE, C. & MANCEZUX, L. Sur une infection a` corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C. R. Seances Acad. Sci.**, v.147, p.763-766, 1908.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C. R. Seances Acad. Sci.**, v.148, p.369–372, 1909.
- OLSSON, Catharina; HOLMGREN, Susanne. Autonomic control of gut motility: A comparative view. **Autonomic Neuroscience: Basis and Clinical**. v.165, p.80-101, 2011.
- PAPAZIAN-CABANAS, Rodrigo M. *et al.*. Myenteric neuronal plasticity induced by *Toxoplasma gondii* (genotype III) on the duodenum of rats. **An Acad Bras Cienc**. v.84, p.737-745, 2012.
- PATTON, K.T.; THIBODEAU, G.A. *Anatomy & physiology*, ed 8, St Louis, 2013, Mosby, p 863.
- PELASEYED, T. *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. **Immunological Reviews**. v.260, p.8-20, 2014.
- PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S.; ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3 dioxygenase induced by gamma- interferon in cultured human fibroblasts. **J Interferon Res**. v.6, p. 267-279, 1986.
- RICARD-BLUM, Sylvie. The Collagen Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011;3:a004978 .

RIEDER, Florian; FIOCCHI, Claudio; ROGLER, Gerhard. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**. v.152, p.340-350, 2017.

SANT'ANA, D.M.G.; GÓIS, M.B.; ZANONI, J.N.; DA SILVA, A.V.; DA SILVA, C.J.T.; ARAÚJO, E.J.A. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, p. 279-286, 2012.

SANDERS, Kenton M. *et al.*. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. v.11, p.633-645, 2012.

SEABRA, Sergio H.; SOUZA, Wanderley de; DAMATTA, Renato A.. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental Parasitology**. v.100, p.62-70, 2002.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C.. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. v.359, p.82-85, 1992.

SIBLEY L. David. Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. **Immunol. Rev.** v.240, p. 72-91, 2011.

SILVA, L. S. *et al.*. *Toxoplasma gondii*: Myenteric neurons of intraperitoneally inoculated rats show quantitative and morphometric alterations. **Experimental Parasitology**. v.129, p.5-10, 2011.

SHAPIRA, S. *et al.* Suppression of NF- κ B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**. v.185, p.66-72, 2002.

SHRAISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; DA SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.M.G.; ARAÚJO, E.J.A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2146-2153, 2009.

SHWAB, E. K. *et al.* . **Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping**. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/terms>>. SOUZA, Wanderley *et al.* Organização estrutural do taquizoítio de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**. v.20, n.1, p.131-143, 2010.

SMITH, Barbara. Disorders of myenteric plexus. **Gut**. v.11, p.271-274, 1970.

SOARES, Janaína *et al.*. Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induzindo hipertrofia de neurônios do plexo mientérico do cólon descendente de *Rattus norvegicus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, n.2, p.57-60, 2009.

SPLENDRE, A.. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. **Rev. Soc. Scient.** v.3, p.109–112, 1908.

STEAD, Ron H. *et al.* Remodeling of B-50 (GAP-43)- and NSE-immunoreactive Mucosal Nerves in the Intestines of Rats Infected with *Mpoostrongylus brasiliensis*. **The Journal of Neuroscience**. v.11, n.12, p. 3809-3821, 1991

SUGAUARA, E. Y. Y. *et al.*. Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). **Arq Neuropsiquiatr.** v.66, p.516-123, 2008.

SUGAUARA, E. Y. Y. *et al.*. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). **Biological Sciences.**v.31, n.2, p.195-201, 2009.

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J.;WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: The parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via fission pore. **Cell Biology.** v.93, p.8413-8418, 1996.

SUZUKI Y. *et al.*. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science.** v.240, p.516-518, 1988.

SUZUKY, Y. *et al.* A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology.** v.74, p.732-739, 1991

SUZUKY, Y. *et al.* Induction of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon- γ in genetically resistant BALB/c mice. **Microbes and Infection.** v.5, n.5, p.455-462, 2000.

TENTER *et al.* *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology.** v.30, p. 1217-1258, 2000.

TREVIZAN, A.R.; VICENTINO-VIEIRA, S.L.; WATANABE, P.S.; GÓIS, M.B.; DE MELO, G.A.N.; GARCIA, J.L.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental Parasitology.** v. 165, p. 22-29, 2016.

VICENTINO-VIEIRA, S.L.; DE MELO, G.A.N.; GÓIS, M.B.; MOREIRA, N.M.; PEREIRA, L.G.A.; ARAÚJO, E.J.A.; GARCIA, J.L.; SANT'ANA, D.M.G. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. **Experimental Parasitology,** v. 156, p 12-18, 2015

WEISS, Louis M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International Journal for Parasitology.** v.31, p. 895-901, 2009.

WERSHIL, Barry K. e FURUTA, Glenn T. Gastrointestinal mucosal immunity. **J Allergy Clin Immunol.** v.121,n.2, p.380 -383, 2008.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B.. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science.** v.89, p.226–227, 1939.

YAP G.; PESIN M.; SHER A.. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** v.165, p.628-631, 2000.

ZANIOLO, L. M. *et al.*. *Toxoplasma gondii* infection causes morphological changes in caecal myenteric neurons. **Experimental Parasitology.** v.130, p.103-109, 2012.

This paper will be submitted as an ORIGINAL ARTICLE to the **Neurogastroenterology & Motility Journal** (Impact factor: 3.617)

Running Title: Colonic motility and infection with *T. gondii*

***Toxoplasma gondii* IMPAIRS THE COLONIC MOTILITY OF RATS DUE LOSS OF MYENTERIC NEURONS**

C. C. A. Machado¹, S. M. Ortigoza¹, H. G. Bergoc¹, A. C. E. Pupim¹, P. S. Watanabe¹, M. B. Góis³, J. L. Garcia², L. A. Blackshaw⁴, D. M. G. Sant'Ana³, E. J. A. Araújo¹.

1. Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
2. Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
3. Department of Morphological Science, State Univeristy of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil
4. Wingate Institute for Neurogastroenterology, Queen Mary University of London, London, United Kingdom.

Address for correspondence

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo

Department of Histology, State University of Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

Tel: +55 (43) 3371 4327

ejaaraujo@gmail.com

Abstract

Background Several mammals display intestinal inflammation upon *Toxoplasma gondii* infection. Previous anatomic results have shown alterations in the colonic myenteric plexus of infected animals, but it is unknown if it impacts the motility. In this report, we assessed whether the colonic coordinated movements are compromised by the toxoplasmic infection and if it is associated with anatomic changes. **Methods** Male Wistar rats were assigned into control or infected groups, which were evaluated 6, 12, 24, 48, 72 hours and 30 days post infection (dpi). Infected rats received orally 5×10^3 sporulated oocysts of the strain ME-49 (genotype II) of *T. gondii*. The colon was collected aiming anatomical analysis of the intestinal wall (including the myenteric plexus immunolabelled with HuC/D, nNOS and ChAT), and motility analysis *in vitro* (conventional manometry). **Key results** During the 72h post infection, *T. gondii* caused hypertrophy of the mucosa and increase in the number of intraepithelial lymphocytes. The number of goblet cells was increased during throughout the infection. The infection caused loss of total, nitrergic and cholinergic myenteric neurons in the colon proximal at 30 dpi, but this number kept unchanged in the distal colon. On the other hand, the amplitude and duration of the contractions were increased on the middle distal colon of infected rats. **Conclusion & Inferences** High load of oocysts of the strain ME-49 of *T. gondii* caused colonic histological changes during the infection course, culminating in myenteric neuronal loss in the proximal colon. All these anatomical changes altered the motility partner in the distal colon of infected rats.

Key words: Toxoplasmosis, large intestine, histology, enteric nervous system, intestinal motility.

INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a zoonosis with a large worldwide distribution. One-third of the world's population is probably infected with its etiological agent: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), an obligate intracellular protozoa parasite. The Centers for Disease Control and Prevention of the United States reported that *T. gondii* is one of three pathogens (along with Salmonella and Listeria) that together account for >70% of all deaths due to foodborne illness¹. The natural transmission route is ingestion of oocysts in contaminated food and water or tissue cysts in raw or undercooked meat^{2,3}. Oocysts are shed by infected felids, which are the definitive host of *T. gondii*. A single infected cat can shed millions of oocysts into the environment. These oocysts

can be taken up by intermediate hosts, which include virtually any warm-blooded animal, including humans. In these infected intermediate hosts, *T. gondii* establishes a chronic infection in the form of bradyzoite-containing tissue cysts⁴⁻⁶. After ingestion, the parasite crosses the intestinal epithelial barrier in order to disseminate to other organs in the body. It is well described that *T. gondii* infection presents dramatic consequences in immuno-compromised patients and in fetus of primo-infected pregnant women affecting mainly neural structures⁶⁻⁸.

Apart from neurological and ocular pathologies, another level of interest linked to *T. gondii* invasion in the gut is the observation that a number of mammals and primates display intestinal inflammation upon *T. gondii* infection⁹. An innate immune response is observed right after the parasite crosses from the lumen to the lamina propria. This initial immune response is mediated by cytokines and chemokines released by invaded enterocytes and by lymphocytes and macrophages which migrate to the mucosa because the *T. gondii* invasion¹⁰⁻¹². Most of the studies focused the small intestine when evaluated the gut of infected animals. Despite the poor number of investigations evaluating the large intestine, diarrhoea is a common finding in some species infected with *T. gondii* as chicken¹³, pigs¹⁴ and immunodepressed humans¹⁵⁻¹⁸.

Diarrhoea is a clinic sign that indicates disturbance of the enteric nervous system (ENS) on the distal part of the gut¹⁹. ENS is an extensive intrinsic nervous system of the gastrointestinal tract composed of two plexi: myenteric and submucosal. The myenteric plexus is responsible for determining the patterns of movement of the gastrointestinal tract²⁰. An increase in the frequency and intensity of the contractions of the colon in the anterograde direction is observed during the diarrhoea triggered by several pathogens. Infectious diarrhea causes approximately 1.5 million deaths a year, primarily in underdeveloped tropical countries²¹. However, it is unknown how the *T. gondii* infection can affect the function of the myenteric plexus. Despite the lack of functional information, previous studies have shown anatomical changes in the gut induced by the *T. gondii* infection, including atrophy / hypertrophy of intestinal wall layers, changes in number and shape of enterocytes, variation in collagen distribution and in production and constitution of mucus secreted by goblet cells²²⁻²⁴. In addition, several studies report morphometric changes and sometimes loss of enteric neurons during the toxoplasmic infection²³⁻²⁷.

In this report, we assessed whether the colonic coordinated movements are compromised by toxoplasmic infection and its association with anatomic changes on the colonic wall, specially the myenteric plexus, during the course of the infection. Our search for a mechanistic link required an understanding of both anatomical organization and motility analysis throughout the colonic region of rats infected with *T. gondii*. To reach this goal we used a range of techniques that have been previously validated in rodent, including a study of microscopic anatomy²⁵ and measurement of colonic motility using *in vitro* manometry²⁸. We showed that *T. gondii* caused many anatomic changes during the course of the infection from 6h up to 30 days post inoculation, including loss of myenteric neurons in the proximal colon. In addition, we found stronger and longer contractions on the middle distal colon of infected rats.

2 MATERIALS AND METHODS

All performed procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Maringá, Brazil (Reference number: 079/2013) and by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina, Brazil (Reference number: 50/2017).

2.1 Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the State University of Maringá and the State University of Londrina were used. The rats were kept in polypropylene cages in an animal house with controlled temperature (24 ± 2 ° C) and light / dark cycle of 12/12 h, receiving standard chow for rodents and water *ad libitum*. At 28 days of age, the rats received an antiparasitic pre-treatment which included Metronidazole (500 mg / kg) for 5 days and Fembendazole (50 mg / kg) in a single dose. After 7 days, they were ready to be used on experimental procedures.

2.1 Experimental groups

In order to obtain the anatomical data, the animals were randomly assigned to control (CG) and *T. gondii* infected groups, which were evaluated 6 hours (G6h), 12 hours (G12h), 24 hours (G24h), 48 hours (G48h), 72 hours (G72h) hours and 30

days post infection (dpi) (G30d), considering $n = 5$ animals per group. For the motility analysis, 20 animals were distributed equally into two groups: control (CG) and infected during 30 days (G30d). All control rats received 1 mL of sterile saline per gavage, whereas the infected rats were inoculated orally with 1 mL of saline sterile containing 5×10^3 sporulated oocysts of the strain ME-49 (genotype II) of *T. gondii*. The load, infective form, and strain of the parasite were chosen considering previous studies²⁹.

The oocysts were supplied by the Laboratory of Veterinary Parasitology of the State University of Londrina, Brazil. All rats were evaluated for presence of serum anti-*T. gondii* using the indirect immunofluorescence technique or modified agglutination test (MAT)³⁰.

2.3 Euthanasia and sample harvest

After the experimental periods of 6, 12, 24, 72 hours and 30 days, the rats used to obtain anatomical data were submitted to euthanasia by anaesthetic deepening with overdose of halothane vapour³¹. The rats used for motility analysis were submitted to euthanasia by ketamine/xylazine combination (400 mg/kg and 20 mg per rat respectively) by intramuscular route³². Then, the colon of each animal was removed for anatomical or functional analysis.

2.4 Anatomical analysis

For histological analysis of the colonic wall, one-centimetre-samples of the colon were fixed in Bouin solution for 24 hours and included in paraffin. Four-micrometer-sections were stained hematoxylin and eosin (HE), Schiff's Periodic Acid (PAS), Alcian Blue (AB) pH 2.5, AB pH 1.0 or Picro Sirius Red. Sections stained with HE were used for measuring the thickness of the total intestinal wall (4X magnification-lens) and its layers (10X or 40X magnification-lens) in eight points of 10 different images per animal and counting of intraepithelial lymphocytes (LIE) present among 500 consecutive enterocytes per animal. Sections stained with PAS e AB (pH 2.5 and 1.0) were used to count the goblet cell number present in 10 crypts per animal. The distribution of collagen types I (red/yellow) and III (green) were evaluated in sections stained with Picro Sirius Red, considering six images (4X

magnification-lens) per animal obtained from a polarized light microscope (Zeiss Axio Imager.A1). All the morphometric analysis and the distribution of collagen were performed using the software Image-Pro Plus.

For the anatomical analysis of the myenteric plexus, colons were washed with 0.1 M PBS (pH 7.4) and fixed using 4% paraformaldehyde for 3 hours at room temperature. The colons were stored in 0.1M PBS, pH 7.4, containing 0.08% sodium azide at 4°C for microdissection using a stereomicroscope. Whole mounts containing the external muscular layer were processed according to standard immunofluorescence technique using antibodies which labelled the total population (anti-HuC/D - Invitrogen, A21271, 1:500), nitrenergic subpopulation (anti-nNOS - Santa Cruz, AB8189, 1:1000) and cholinergic subpopulation (anti-ChAT – Millipore, AB1444p, 1:100) of myenteric neurons. The number of total, nitrenergic and cholinergic myenteric neurons was counted in 50 ganglia per animal. Besides, we measured the area of 100 cell bodies of total, nitrenergic and cholinergic myenteric neurons per animal.

2.5 Motility analysis

Colonic motility was determined using a multilumen perfusion manometry kit²⁸. For that, the colon was immersed in an organ bath right after to be removed and washed with Krebs solution. An intraluminal catheter containing three sensor points distanced by 1.5 cm was used to detect contraction in the proximal, midle proximal, and midle distal colon. Induced pressure waves were recorded right after application of 100µM of the nitric oxide synthase inhibitor: N-omega-nitro-L-arginine (NOLA, Sigma, N5501). Recordings were obtained and analysed manually using Spike software in order to obtain number of peaks/min, amplitude and duration of the contractions.

2.6 Statistical analysis

All data were expressed as the mean \pm SEM. Normal distribution was analysed by Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA, followed by Tukey *post hoc* test, was performed to compare groups with normal distribution. Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's *post hoc* test, was used for non parametric data. GraphPad

Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for all analysis. The significance level was set to 5%.

3 RESULTS

3.1 *T. gondii* infection caused histological alterations in the inner layers of the colonic wall

T. gondii infection caused histological alteration only in the inner layers of colonic wall (Table 1). The mucosa became hypertrophied (30%) during the first 72 hours post inoculation ($P < 0.05$ for G12h and G72h vs CG), restoring its normal thickness at 30 dpi. The *muscularis mucosae* was swollen (25%) during the first 72 hours ($P < 0.05$ for G6h vs CG), but it was atrophied (30%) at 30 dpi ($P < 0.05$). Enterocytes were much lower (59%) at 30 dpi ($P < 0.05$). The submucosa was atrophied (38%) between 12 and 72 hours post infection ($P < 0.05$), and became slightly hypertrophied at 30 dpi ($P > 0.05$). The number of intraepithelial lymphocytes (LIE) increased (69%) progressively until 72 hours post infection ($P < 0.05$), but they were at normal levels at 30 days ($P > 0.05$; Fig. 1A). The number of goblet cells producing neutral mucins, sialomucins and sulfomucins increased (28%) progressively until 12 hours and this hyperplasia was kept even at 30 dpi ($P < 0.05$; Fig. 1B, C and D). Regarding the distribution of collagen, fibres type I were in greater quantity (24%) from 6 hours until 30 dpi ($P < 0.05$). However, the concentration of collagen type III was reduced (41%) at 6h, 72h and 30 dpi ($P < 0.05$; Fig. 2).

3.2 *T. gondii* infection provoked loss of myenteric neurons in the proximal colon

Infection with oocysts of the strain ME-49 of *T. gondii* caused loss of myenteric neurons in the proximal colon of rats. We observed decrease (23%) in the number of total myenteric neurons/ganglion at 6h, 72h and 30 dpi ($P < 0.05$; Fig. 3A). The number of nitrenergic myenteric neurons was decreased (16%) only at 30 dpi ($P < 0.05$; Fig.4A). Loss of cholinergic myenteric neurons was observed at 6h (18%) and 30 dpi (20%) ($P < 0.05$; Fig. 5A). After neuronal loss, the remaining neurons became hypertrophied (HuC/D: 8%; nNOS: 24%) ($P < 0.05$; Fig.3B and 4B) except the

cholinergic neurons which presented similar size to control rats at 30 dpi ($P < 0.05$; Fig. 5B). These results are illustrated in Figs. 3, 4 and 5.

Despite the loss of myenteric neurons observed in the proximal colon, the number of myenteric neurons/ganglion in the distal colon of infected rats was unchanged. On the other hand, total myenteric neurons ($P < 0.05$; Fig. 3E) and cholinergic neurons ($P < 0.05$; Fig. 5E) were hypertrophied (HuC/D: 6%; ChAT: 15%) at 24h, 72h and 30 dpi whereas nitrergic neurons ($P < 0.05$; Fig. 4E) were atrophied (12%) from 6h up to 30 dpi.

3.3 Colonic contractions were stronger and longer upon *T. gondii* infection

We investigated further the consequences of the myenteric neuronal changes in bowel function of *T. gondii*-infected rats, in which we studied complex neural control of colonic motor function *in vitro*. Most of the contractions showed anterograde in control rats and it was not changed by the toxoplasmic infection. The numeric and size changes in myenteric neurons did not affect the number of peaks/min (Fig. 6A) and also the frequency and propagation velocity of the colonic migrating motor complexes (Fig. 6D). On the other hand, the amplitude (Fig. 6B) and the area under the curve (Fig. 6C) of NOLA-induced pressure waves were increased (190%) on the middle distal colon of infected rats, therefore the strength of contractions was stronger and longer in this region.

4 DISCUSSION

Here we report that *T. gondii* caused important anatomic changes in the colon of rats during the course of the infection from 6h up to 30 days post inoculation, including loss of myenteric neurons. In addition, we found stronger and longer contractions on the middle distal colon of infected rats.

We previously showed that different loads of the ME-49 strain of *T. gondii* are able to cause progressive anatomic changes in the colon of rats at 30 days post inoculation, concluding that the better load to cause death of myenteric neurons is 5×10^3 oocysts²⁹. Now, we evaluated how the colonic wall changes during the course of infection, from 6 hours up to 30 days, in rats infected with 5×10^3 oocysts of the ME-49 strain of *T. gondii*. Despite most of the *T. gondii* inoculum invade the host through

the small intestine, it is clear that the parasite reaches and affects the colon as well. During the first 72 hours, the mucosa became thicker probably because the recruitment of immune cells, which is supported by the progressive increase in the number of LIE during this period of the infection. In addition, goblet cells also increased in number, probably to secrete more mucus in order to strengthen the intestinal barrier. This can be considered a defence mechanism not only for fighting the *T. gondii* but also for avoiding other infections, specially during the period in which the intestinal tissue is injured. Increase in number of LIE and goblet cells is a common finding in the intestine of rats²³ chicken³³ and pigs³⁴ infected with different strains of *T. gondii*.

Loss of myenteric neurons upon *T. gondii* is not a common finding in rats, unless when they are infected with high loads of oocysts²⁹. Other species can lose myenteric neurons more easily, as we demonstrated before in chicken¹³ and pigs³⁴. The use of rats in experimental infection with *T. gondii* is relevant because they present similar response to immunocompetent humans³⁵.

The consequences of oral infection with *T. gondii* depend on the load, infective form and genotype of the parasite and also on the specie of the host. Thus, this can probably explain why we did not find myenteric neuronal loss in the colon of rats infected with 10^5 tachyzoites of the BTU-IV strain (genotype I)³⁶ or 10^4 tachyzoites of the BTU-II strain (genotype III)³⁷ at 30 days post infection. Here we report loss of myenteric neurons in the proximal colon at 6h, 72h and 30 days upon *T. gondii* infection whereas no loss of myenteric neurons was observed in the distal colon. Our data suggest that myenteric neurons of the proximal colon are less resistant to *T. gondii* infection compared to those of the distal colon.

The myenteric plexus is responsible for coordinating the movements performed by the external muscle layer^{20,38}. Considering the chemical code of the myenteric neurons, there are two main populations: cholinergic and nitrergic ones. Most of the cholinergic myenteric neurons are excitatory motor or integrative interneurons and most of the nitrergic are inhibitory motor^{20,39,40}. Thus, changes in their number or morphology of myenteric neurons can affect the complex control of the gastrointestinal motility. This is the first study which evaluated the complex neural

control of colonic motor function *in vitro* of rats infected with *T. gondii*. There is no previous report regarding the motility of colon in rats infected with *T. gondii*.

We found that both cholinergic and nitrenergic myenteric neurons were in less number/ganglion only in the proximal colon of infected rats at 30 dpi. Besides, alterations in motility patterns occurred only in the distal colon of the same animals. Thus, it is suggested that most of the lost myenteric neurons in the proximal colon probably were descending interneurons rather than final motoneurons. It makes sense since the contractions were present throughout the colon, but the coordination of the movements was impaired in the distal colon. On this way, it is known that ChAT/nNOS myenteric neurons are involved in descending inhibitory reflexes²⁰. If we consider that part of ChAT/nNOS myenteric neurons was missing in the proximal colon, it could explain not only the increase in the amplitude and duration of the contractions in the distal colon but also the atrophy of nitrenergic myenteric neurons in this region.

Furthermore, we suggest that cholinergic neurons of the proximal colon are the first to die because part of them were missing at 6h post infection. On the other hand, nitrenergic neurons seems to be more resistant since their number has the tendency to decrease at 72h post infection and they are partially missing in the proximal colon only at 30 dpi. Probably as a compensation mechanism, the area of the cell body of remaining neurons tended to enlarge, which probably also interfered on the colonic motility. Despite the rare observation of loss of myenteric neurons, morphometric alteration of colonic myenteric neurons have been describing in rats infected with different loads and strains of *T. gondii*^{36,41,42}.

We concluded that high load (5×10^3) of oocysts of the strain ME-49 of *T. gondii* caused colonic histological changes in the colonic mucosa and myenteric neuronal loss in the proximal colon. The anatomical changes of the myenteric plexus altered the motility partner of the distal colon in infected rats.

5 REFERENCES

1. Guo M, Mishra A, Buchana RL, Dubey JP et al. A systematic meta-analysis of *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals in the United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2016;13(3):109-118.
2. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *International Journal for Parasitology.* 2009;31:895-901.
3. Jones JL, Dubey JP. Foodborne Toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.*,2012;55:845–851.
4. Dubey JP, Miller NL, Frenkel, MD. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* 1970;132:636-662.
5. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology.* 1998;28:1019-1024.
6. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews.*1998;11:267-299
7. TENTER *et al.* *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology.* 2000;30:1217-1258.
8. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-640
9. Schreiner M and 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.
10. Filisetti D, Candolfi, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super Sanità.* v.40, n.1, p.71-80, 2004.
11. Hughes HPA. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol Today.* v.4,p.340-347, 1988.
12. HUNTER, CA. *et al.* Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from *Toxoplasma gondii* – Infected SCID Mice: Regulation by Interleukin-10, Interleukin12, and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and Immunity.*
13. Bonapaz, RS, Hermes-Uliana, C, Santos FN, et al. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2010;30:787-792.
14. Da Silva PC, Shiraishi CS, Da Silva AV et al. *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental Parasitology.* 2010;125:380-383.
15. Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Hernández-Tinoco J, et al. Influence of *Toxoplasma gondii* infection on symptoms and signs of pré-menstrual syndrome: A cross-sectional study. *Eur J Microbiol Immunol.* 2016;6(4):298-305.
16. Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Anguiano LF, Hernández-Tinoco J, et al. Influence of *Toxoplasma gondii* infection on symptoms and signs of menopause. *Eur J Microbiol Immunol.* 2016;6(1):49-55.
17. Yang M, Perez E. Disseminated toxoplasmosis as a cause of diarrhea. *South Med J.* 1995;88(8):860-1.

18. Glover M, Tang Z, Sealock R, Jain S. Diarrhea as a presenting symptom of disseminated toxoplasmosis. *Case Rep Gastrointest Med.* 2017;2017:3491087 doi: 10.1155/2017/3491087. Epub 2017 Jun 20.
19. Rao M, Gershon MD. Neurogastroenterology: The dynamic cycle of life in the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(8):453-454.
20. Furness JB. The enteric nervous system. Nova York, Blackwell publishing. 2006. 288p.
21. Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004 Jul;15(3):155-68.
22. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, Watanabe PS, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Experimental Parasitology.* 2016;165:22-26.
23. Gois MB, Hermes-Uliana C, Zafo MCB, et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. *Experimental Parasitology.* 2016;164:56-63.
24. Vicentino-vieira, SL, De Melo GAN, Góis MB, et al. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. *Experimental Parasitology.* 2015;156:12-18.
25. Vicentino-Vieira SL, Góis MB, Trevizan, AR, et al. *Toxoplasma gondii* infection causes structural changes in the jejunum of rats infected with different inoculum doses. *Life Sciences.* 2017;191:141-149.
26. Araújo EJA, Zaniolo LM, Vicentino SL, Góis MB et al. *Toxoplasma gondii* infection causes morphological changes in caecal myenteric neurons. *Experimental Parasitology.* 2012;120:103-109.
27. Zaniolo, L. M. et al.. *Toxoplasma gondii* infection causes morphological changes in caecal myenteric neurons. **Experimental Parasitology.** v.130, p.103-109, 2012.
28. Fraser R, et al. Effects of fractionated abdominal irradiation on small intestinal motility--studies in a novel in vitro animal model. *Acta Oncol* 1997;36:705-710.
29. Ferezin RI, Vicentino-Vieira SL, Góis MB, et al.. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 2017;26:47-53.
30. Desmots G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology.* 1980;11(6):562-568.
31. Booth NH. Inhalant anesthetics. In: Booth NH, McDonald LE, eds. *Veterinary pharmacology and therapeutics.* 6th ed. Ames, Iowa: Iowa State Univeristy Press, 1988;181–211.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Asssocation.
33. Shraishi CS, Azevedo JF, Da Silva, AV, et al. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. *Ciência Rural.* 2009;39(7):2146-2153.

34. Odorizzi L, Moreira NM, Gonçalves GF, et al. Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in swines with toxoplasmosis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2010;155:68-72.
35. Dubey JP, Frenkel JK. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*. 1998;77:1-32.
36. Soares J, Moreira NM, Da Silva AV, et al. Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induzindo hipertrofia de neurônios do plexo mientérico do cólon descendente de *Rattus norvegicus*. *Rev. Bras. Parasitol Vet*. 2009;18:57-60.
37. Sugauara EYY, Sant'Ana DMG, De Almeida EC, et al. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). *Arq Neuropsiquiatr*. 2008;66:516-523.
38. FURNES, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Gastroenterology e Hepatology*. 2012;9:286-204.
39. Lecci A, Santicoli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Current opinion in pharmacology*. 2002;2:630-641.
40. Sanders KM et al. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;11:633-645.
41. Silva LS et al. *Toxoplasma gondii*: Myenteric neurons of intraperitoneally inoculated rats show quantitative and morphometric alterations. *Experimental Parasitology*. 2011;129:5-10.
42. Sugauara EYY et al. Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). *Arq Neuropsiquiatr*. 2008;66:516-123.

Table 1 – Histological analysis of the colonic wall of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection.

PARAMETER (μm)	GC	G6h	G12h	G24h	G72h	G30d
<u>Enterocyte height</u>	30,48 \pm 1,35	27,87 \pm 1,24	30,93 \pm 0,49	30,56 \pm 0,79	30,27 \pm 0,97	12,52* \pm 1,11
<u>Mucosa</u>	165,89 \pm 9,82	199,25 \pm 6,35	207,04* \pm 6,91	198,37 \pm 9,20	217,06* \pm 7,73	147,26 \pm 13,07
<u>Muscularis mucosae</u>	2,14 \pm 0,19	2,89* \pm 0,14	2,58 \pm 0,07	2,61 \pm 0,10	2,68 \pm 0,12	1,51* \pm 0,04
<u>Submucosa</u>	43,49 \pm 5,62	42,63 \pm 4,10	28,11* \pm 1,48	26,22* \pm 2,37	29,51 \pm 1,42	56,96 \pm 9,13
<u>Circular muscle</u>	113,60 \pm 11,55	112,04 \pm 10,52	99,59 \pm 10,44	104,40 \pm 16,02	104,28 \pm 8,93	96,10 \pm 23,70
<u>Longitudinal muscle</u>	23,91 \pm 3,72	37,91 \pm 6,07	27,68 \pm 5,19	27,72 \pm 5,43	33,92 \pm 6,44	24,81 \pm 1,35
<u>External muscle</u>	139,36 \pm 16,77	155,54 \pm 13,41	128,68 \pm 15,59	145,62 \pm 32,05	143,61 \pm 16,79	125,36 \pm 5,89

Statistical analysis was performed using One-way ANOVA follow by Tukey test considering 5% as significant level.

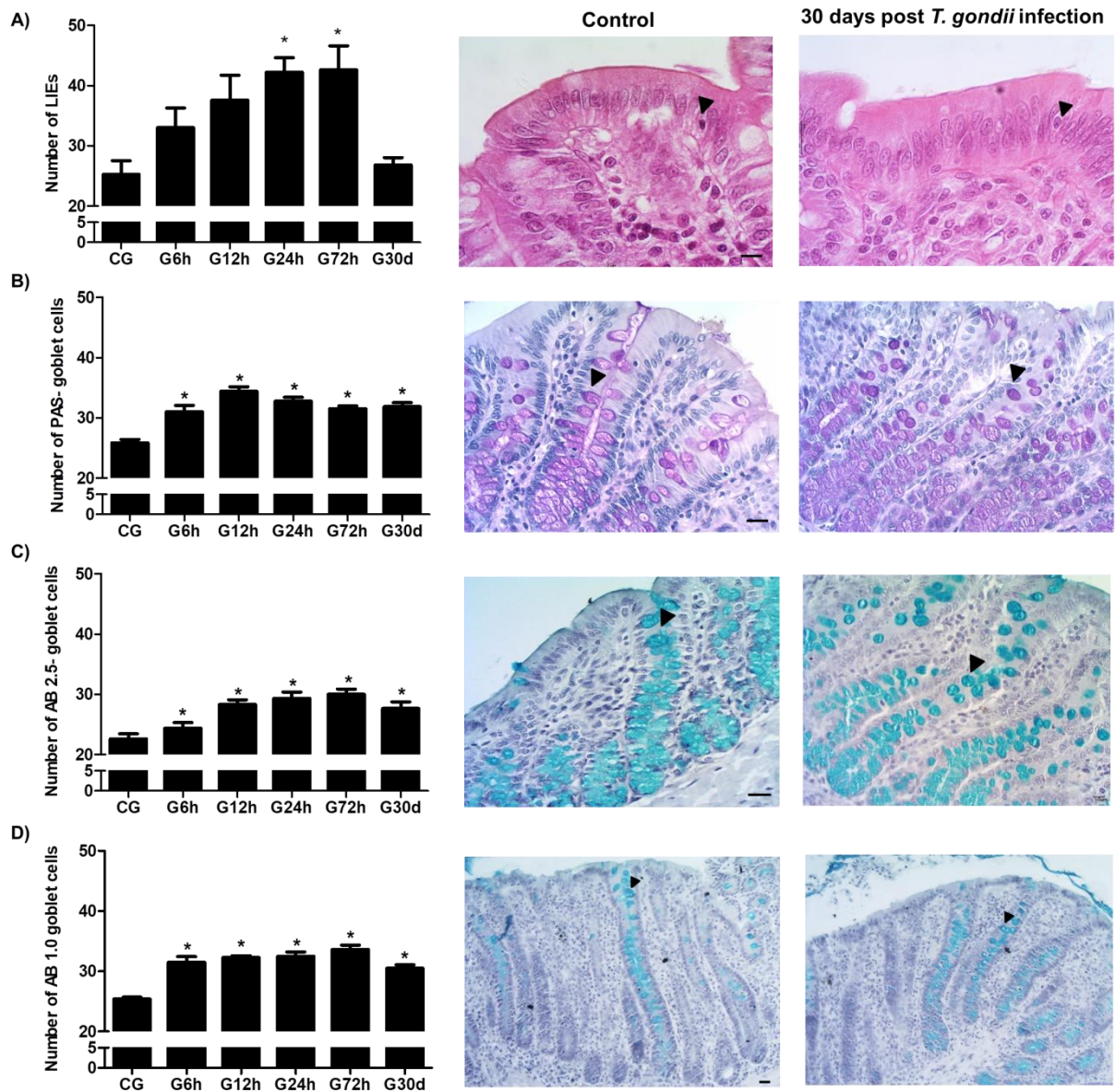


Figure 1 – Number of intraepithelial lymphocytes (LIE) and goblet cells of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection. LIE were counted in section stained with HE. PAS: Periodic Acid-Schiff – labelling neutral mucins. AB: Alcian Blue – labelling sialumins + sulfomucins (pH 2.5) or only sulfomucins (pH 1.0). Bar: 20 μ m. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA follow by Tukey test considering 5% as significant level.

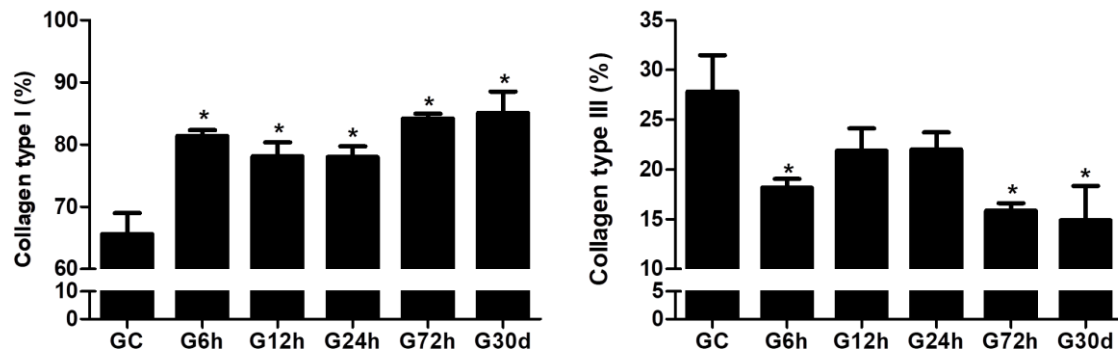


Figure 2 – Distribution of collagen types I and III in the colon of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA follow by Tukey test considering 5% as significant level.

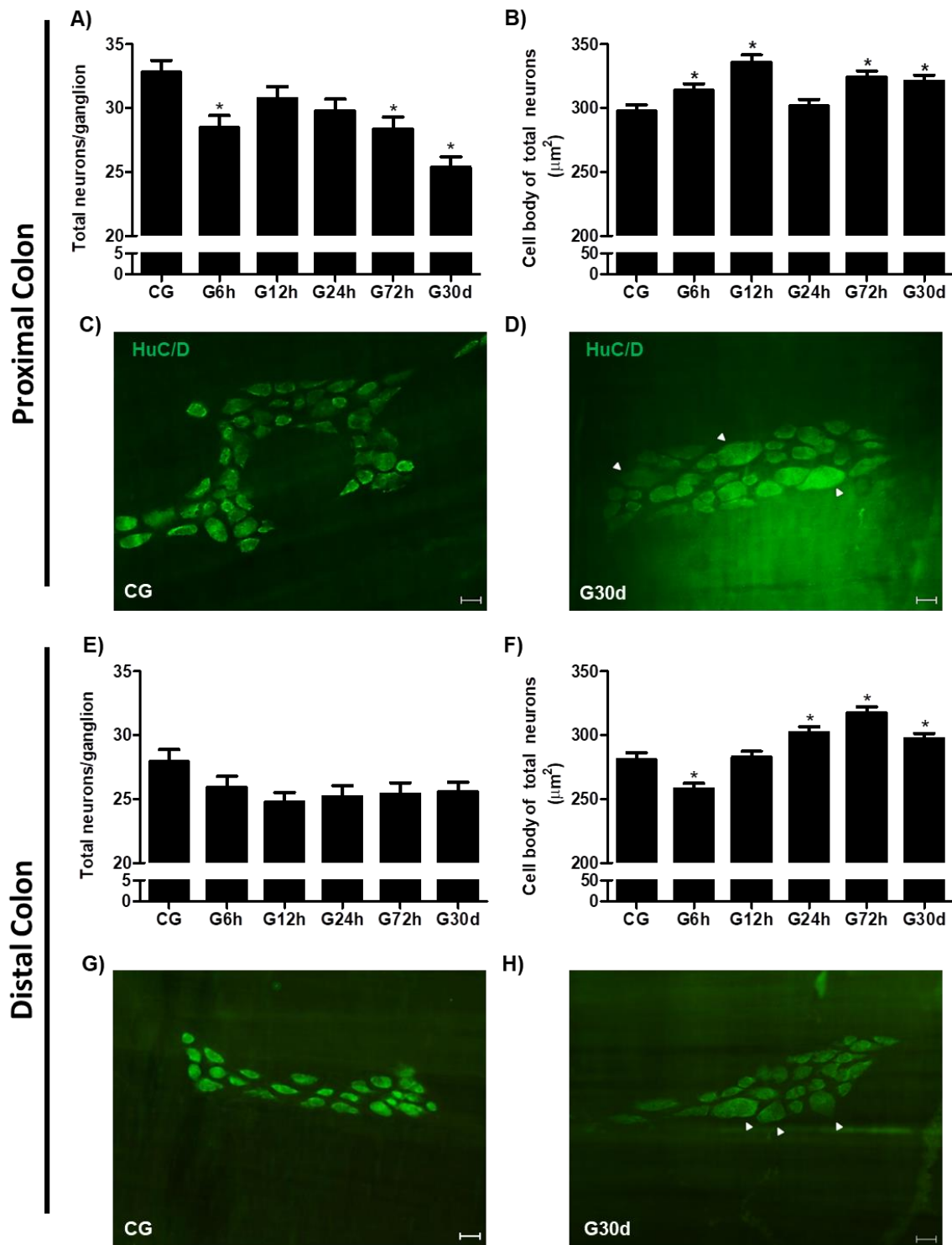


Figure 3 – Number/ganglion and cell body area of proximal (A,B) and distal (E,F) colonic total myenteric neurons of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection. C, D, G and H illustrate the labelling of neuronal protein HuC/D in health rats (C,G) and infected rats (D,H) at 30 days post infection. Bar: 20 μm . Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis follow by Dunn's test considering 5% as significant level.

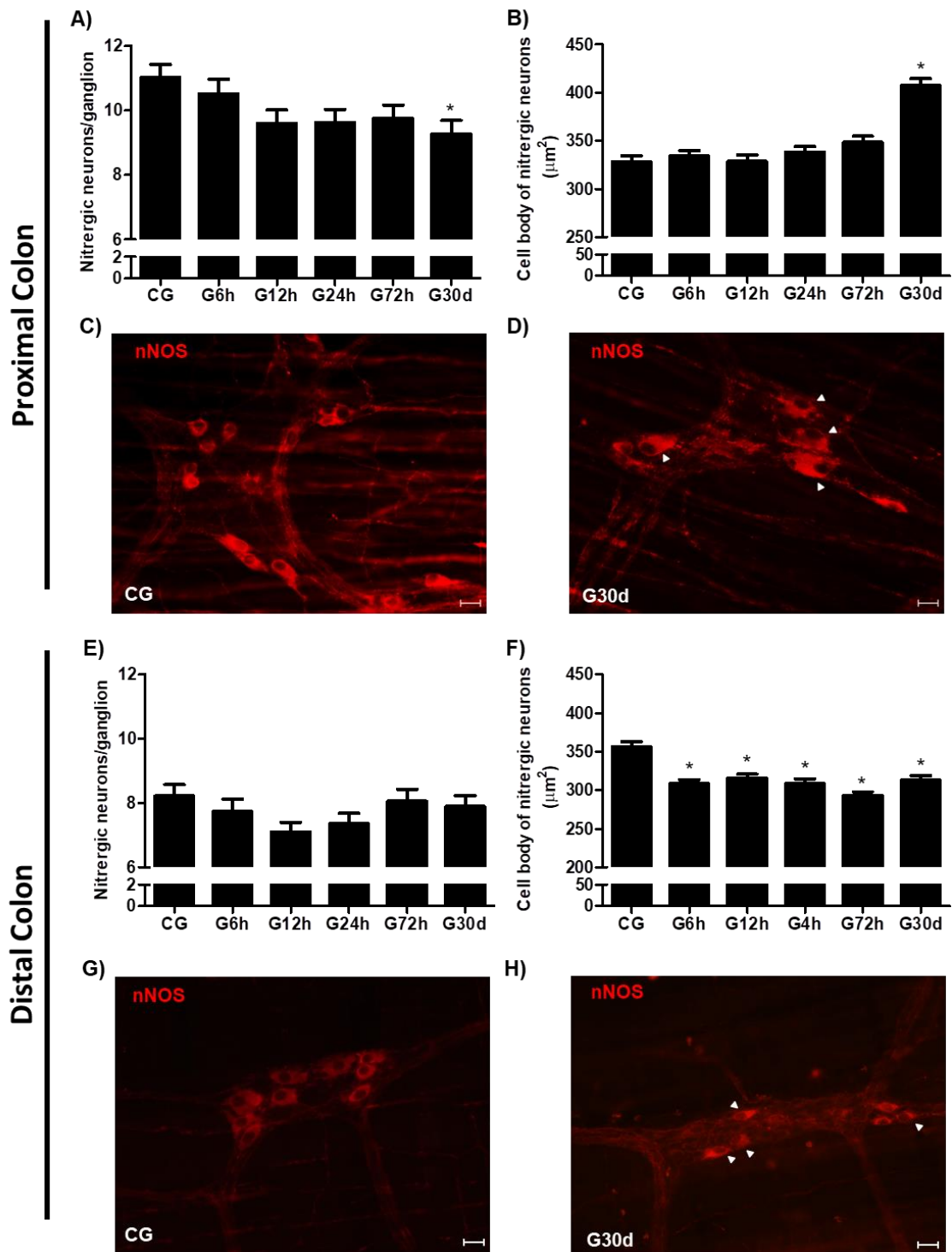


Figure 4 – Number/ganglion and cell body area of proximal (A,B) and distal (E,F) colonic nitrenergic myenteric neurons of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection. C, D, G and H illustrate the labelling of neuronal nitric oxide synthase in health rats (C,G) and infected rats (D, H) at 30 days post infection. Bar: 20 μm . Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis follow by Dunn's test considering 5% as significant level.

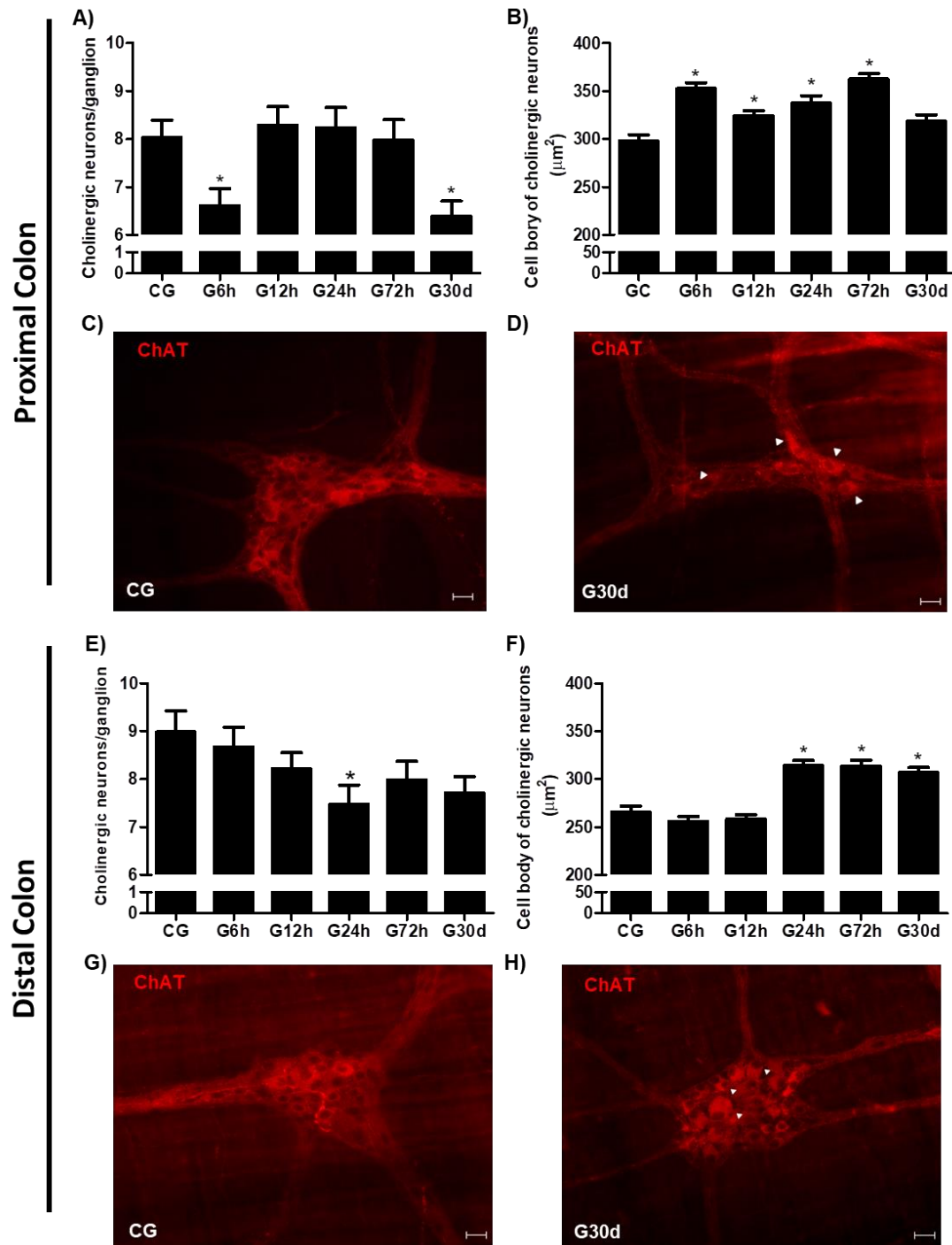


Figure 5 – Number/ganglion and cell body area of proximal (A,B) and distal (E,F) colonic cholinergic myenteric neurons of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain for 6h to 30 days post infection. C, D, G and H illustrate the labelling of Choline Acetyltransferase in health rats (C,G) and infected rats (D,H) at 30 days post infection. Bar: 20 μm . Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis follow by Dunn's test considering 5% as significant level.

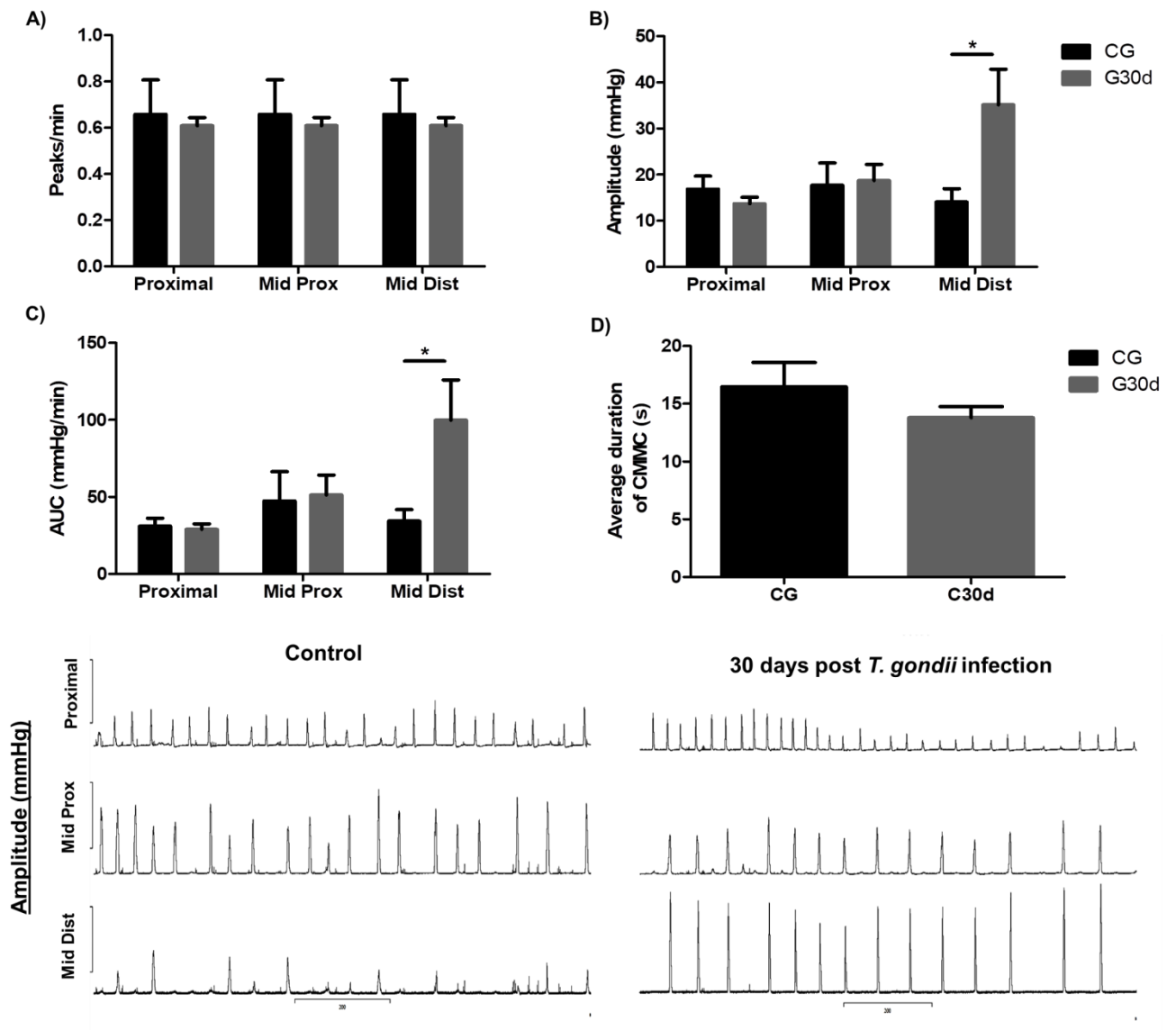


Figure 6 - Colonic motility analysis of rats infected with 5×10^3 oocysts of the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain. A) Peaks of contractions/minute. B) Amplitude of contractions. C) Area under the curve for the contractions. D) Average duration of colonic migration motor complex. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA follow by Tukey test considering 5% as significant level.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, observou-se um aumento gradativo no número de trabalhos que tinham como foco principal demonstrar as alterações que a infecção toxoplásmica desencadeia na parede intestinal e no SNE. Embora esses trabalhos muitas vezes sejam muito específicos, em relação ao segmento do TGI analisado e a cepa utilizada, em conjunto eles demonstram que as diferentes regiões do TGI apresentam respostas diferenciadas a uma mesma cepa e que essa resposta pode ainda variar de acordo com o período de infecção.


Nosso trabalho evidenciou essa heterogenicidade, uma vez que os segmentos analisados aqui, responderam de forma diferenciada a infecção por oocistos da cepa ME-49. Essas respostas também variavam com o decorrer do período experimental, demonstrando a capacidade de adaptação das células intestinais para sobreviver a estímulo nocivo, neste caso a presença do *T. gondii*.

Mostramos que a carga elevada de 5×10^3 oocistos da cepa ME-49 desencadeou alterações relevantes, como alterações histológicas na parede do cólon, acompanhada de morte neuronal na porção proximal e importante alterações morfométricas nos neurônios mioentéricos na porção distal. Por fim, demonstramos que embora não foi observada perda de neurônios na porção distal do cólon, as alterações que ocorreram na região proximal possivelmente desencadearam alterações nos padrões de motilidade do cólon distal.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá protocolo 013/2013, processo nº 032/2006-CEP

 Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 27/6 /2013 Parecer nº 079/2013

Pesquisador: Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana Setor: DCM

Título: Protocolo nº 013/2013

Ação do Toxoplasma gondii sobre o intestino de ratos nas fases aguda e crônica da infecção

Entrada: 19/3/2013 Início: 1/7/2013 Término: 31/7/2015

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.

Considerações e Parecer:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 27/06/2013, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).



Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,
Presidente em exercício do CEAE

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:
I - aprovado;
II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
IV - não aprovado

www.ppg.uem.br - e-mail: ceeaa@uem.br

ANEXO B

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá
(CEUA/UEL) protocolo 50/2017, processo nº 5617.2017.35



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 50/2017

Londrina, 31 de Maio de 2017.

Prezado Profº.

Certificamos que o projeto intitulado: " **Análise do cólon de ratos submetidos a diferentes durações de infecção causada por *Toxoplasma gondii***" protocolo CEUA nº5617.2017.35, sob a responsabilidade de **Eduardo José de Almeida Araujo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **30/05/2017**.

O objetivo é analisar as alterações causadas pelo *Toxoplasma gondii* no cólon de ratos durante o curso da infecção. Grau de invasividade = 2

Vigência do Projeto	01/06/2017 a 31/05/2020
Espécie/linhagem	Rato heterogênico
Nº de animais	20
Peso/Idade	272-282 g / 45 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UEL/ CCB
Amostras a serem coletadas	Cólon

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Profa. Dra.  Glaura Spantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araujo
Responsável pelo projeto
Departamento de Histologia/CCB.