

ATROFIA NEURONAL MIENTÉRICA NO ÍLEO DE RATOS INFECTADOS CRONICAMENTE POR UMA CEPA GENÓTIPO I DE *Toxoplasma gondii*

Barbara Jacqueline Peres Barbosa¹
Eduardo Jose de Almeida Araújo²
Aristeu Vieira da Silva³
Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴

BARBOSA¹, B. J. P.; ARAÚJO², E. J. A.; SILVA³, A. V.; SANT'ANA⁴, D. M. G. Atrofia neuronal mientérica no íleo de ratos infectados cronicamente por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 2, p. 101-108, jul./dez. 2009.

RESUMO: A toxoplasmose é uma zoonose que desperta grande preocupação na saúde pública em nível mundial. No Brasil, os índices de soropositividade para *Toxoplasma gondii* variam entre 54% e 75% da população. Neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos da infecção crônica, causada por uma cepa genótipo I de *T. gondii*, sobre o número e a morfometria de neurônios mientéricos do íleo terminal de ratos. Foram utilizados oito ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos. O grupo experimental foi inoculado oralmente com 10⁵ taquizoítos de uma cepa genótipo I de *T. gondii*. Após 30 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia, e por meio de laparotomia, o jejuno-íleo foi retirado, mensurado em seu comprimento e largura para cálculo de área. O íleo terminal de cada animal foi dissecado para confecção de preparados totais, os quais foram corados pela técnica de Giemsa. Não foram observadas alterações no peso corporal, comprimento ou área intestinal, apenas a largura do jejuno-íleo sofreu aumento. Não houve alteração significativa em relação à análise quantitativa dos neurônios. Na análise morfométrica, observou-se redução da área do pericário, do núcleo e do citoplasma dos neurônios mientéricos do grupo experimental. No que se refere à frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalo da área do pericário, não houve alterações significativas. Entretanto, houve um aumento do número de neurônios cujos núcleos representavam de 21 a 30% de seu pericário e uma redução no número daqueles em que o núcleo representava 51-60% e mais que 71%.

PALAVRAS-CHAVE: Toxoplasmose. Íleo. Plexo mientérico. Neurônios entéricos. Análise quantitativa. Morfometria.

MYENTERIC NEURONAL ATROPHY INDUCED BY CHRONIC INFECTION CAUSED BY A GENOTYPE I *Toxoplasma gondii* STRAIN IN THE RAT ILEUM

ABSTRACT: Toxoplasmosis is a zoonosis which causes a great worldwide public health concern. In Brazil, *T.gondii* seropositivity indexes range from 54% to 75% of the population. This study assesses the effects of chronic infection caused by a genotype I *Toxoplasma gondii* strain over the amount and morphometrics of myenteric neurons of rat terminal ileum. Eight male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used. The experimental group was orally inoculated with 10⁵ tachyzoites from a genotype I strain of *Toxoplasma gondii*. The animals were submitted to euthanasia 30 days after the infection. Blood sampling was carried out by puncturing the retro-orbital plexus in order to detect *anti-T.gondii* seric antibodies. The ileum-jejunum was removed, measured with respect to its total length and width for the calculation of its area through laparotomy. The ileum from each animal was collected, dissected and stained with Giemsa. Alterations concerning body weight, length or intestinal area were not observed, however, the width of the ileum-jejunum had increased. There were no significant alterations with respect to the quantitative analysis. Reduction of the area of the perikarium, nucleus, and cytoplasm of the myenteric neurons from the experimental group were noticed through morphometric analysis. There were no significant alterations with respect to the incidence of neurons within the different interval classes of the perikarium area. However, there was an increase of the amount of neurons whose nuclei presented 21-30% of their perikarium as well as the reduction of those in which the nucleus presented 51-60%, and higher than 71%.

KEYWORDS: Toxoplasmosis. Ileum. Quantitative analysis. Morphometric analysis.

ATROFIA NEURONAL MIENTÉRICA EN EL ÍLEON DE RATAS INFECTADAS CRONICAMENTE POR UNA CEPA GENOTIPO I DE *Toxoplasma gondii*

RESUMEN: La toxoplasmosis es una zoonosis que despierta mucha preocupación en la salud pública a nivel mundial. En Brasil, los índices de soropositividad para *Toxoplasma gondii* varían entre 54% y 75% de la población. El objetivo de este

¹Acadêmica da última série do Curso de Enfermagem da Universidade Paranaense (UNIPAR), bolsista de iniciação científica (PIBIC/UNIPAR).

²Professor Titular da UNIPAR. Mestrado em Ciência Animal. Laboratório de Neurogastroenterologia Experimental. Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil, 87502-210. E-mail: eduardoaraujo@unipar.br

³Professor Titular da UNIPAR. Mestrado em Ciência Animal. Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública. Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil, 87502-210.

⁴Professor Titular da UNIPAR. Mestrado em Ciência Animal. Laboratório de Neurogastroenterologia Experimental. Universidade Paranaense (UNIPAR).

estudio fue evaluar los efectos de la infección crónica, causada por una cepa genotipo I de *T. gondii*, sobre el número y la morfometría de neuronas mientéricas del íleon terminal de ratas. Fueron utilizadas 8 (ocho) ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar machos. El grupo experimental fue inoculado oralmente con 10^5 taquizoítos de una cepa genotipo I de *T. gondii*. Después de 30 días de infección, los animales fueron sometidos a eutanasia, y a través de la laparotomía fue retirado el yeyuno-íleon, y así su anchura y longitud fueron medidas para cálculo del área. El íleon terminal de cada animal fue disecado para confección de preparados totales, los cuales fueron corados por la técnica de Giemsa. No fueron observadas alteraciones en el peso corporal, longitud o área intestinal, apenas en la anchura del yeyuno-íleon el cual sufrió aumento. No hubo alteraciones significativas con relación al análisis cuantitativo de las neuronas. En el análisis morfométrico, se observó reducción del área del pericario, del núcleo y del citoplasma de neuronas mientéricas del grupo experimental. Con relación a la incidencia de neuronas en las diferentes clases de intervalo del área del pericario, no hubo alteraciones significativas. Sin embargo, hubo un aumento en el número de neuronas cuyos núcleos representaban de 21 a 30% de su pericario y una reducción en el número de aquellos en que el núcleo representaba 51-60% y más que 71%.

PALABRAS CLAVE: Toxoplasmosis. Íleon. Plexo mientérico. Neuronas entéricas. Análisis cuantitativa. Morfometría.

Introdução

O *Toxoplasma gondii*, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, é altamente disseminado pelo globo terrestre, sendo causador da toxoplasmose, uma zoonose que desperta grande preocupação para a saúde pública em nível mundial. No Brasil, os índices de soropositividade para *T. gondii* variam entre 54% e 75% da população (BRASIL, 2006).

Quando o parasito chega ao intestino de seu hospedeiro, precisa superar a barreira física e imunológica, levando o protozoário a desenvolver estratégias para burlar seu sistema imunológico. Nos felídeos, os hospedeiros definitivos, ocorre o ciclo extraintestinal e o intraintestinal, esse responsável pela reprodução sexuada com formação de gametócitos na mucosa. Posteriormente ocorre a evacuação de oocistos não esporulados, que podem contaminar o solo por até 18 meses (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003). Porém, a via de infecção dos hospedeiros intermediários, não se restringe apenas a ingestão dos oocistos que podem estar presentes na água ou alimentos mal lavados, pois pode envolver também a ingestão de cistos teciduais presentes na carne ou sua obtenção por meio de transplante de órgãos. (DUBEY; BEATTIE, 1988; GARCIA et al. 1999).

O *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório adaptado a uma ampla variedade celular, invadindo-as por um processo ativo (COPPENS; JOINER, 2001) e formando um vacúolo parasitóforo, que permite a sua reprodução e proteção contra o ataque das células de defesa do organismo parasitado (COPPENS; JOINER, 2001; GATEL; WERTS, 2006).

As cepas de *T. gondii* são classificadas em três linhagens genéticas denominadas genótipos I, II e III (SOARES, 2004). Tal cepa é frequentemente encontrada em infecções humanas sintomáticas que apresentam comprometimento ocular em indivíduos imunocompetentes, resultantes ou não da transmissão congênita. Para camundongos a infecção por essa cepa é letal (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; SOARES, 2004; GENNARI et al. 2006).

A infecção causada pelo protozoário nos hospedeiros, está diretamente relacionada à sua condição imunológica e a virulência da linhagem do *T. gondii*, que variam em sua capacidade de invasão celular, taxa de crescimento e conversão de taquizoítos em bradizoítos (SUMYUEN; GARIN;

DEROUIN, 1995).

O *T. gondii*, provavelmente dissemina-se pelo hospedeiro por intermédio dos sistemas circulatório e linfático, possui afinidade por músculos estriados, coração, cérebro e pulmão, tendo maior taxa pelo sistema nervoso em ratos (DUBEY, 1997; SUMYUEN; GARIN; DEROUIN, 1995). Dentre as alterações provocadas pela toxoplasmose está o comprometimento das funções intestinais (AMATONETO et al. 1995). A diarreia ocorre em cães, galinhas, suínos (FREYRE; FALCON, 1989) e roedores (DUBEY; FRENKEL, 1973).

O controle das funções intestinais, dentre elas a regulação da motilidade, coordenação da secreção e absorção, controle do fluxo sanguíneo, modulação das funções imunológicas e endócrinas é feita pelo sistema nervoso entérico (SNE). Esse é uma parte do sistema nervoso autônomo, considerado como o único fora do sistema nervoso central, que apresenta uma grande complexidade, constituindo dois plexos ganglionados denominados submucoso e mientérico (FURNESS, 2006; GRUNDY; SCHEMANN, 2006).

Em função das alterações neurológicas e gastrointestinais causadas pelo *T. gondii*, objetivou-se neste estudo avaliar os possíveis efeitos da infecção crônica por uma cepa genótipo I desse parasito, sobre o número e a morfometria de neurônios mientéricos do íleo terminal de ratos.

Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense (protocolo 12361/2008).

Foram utilizados oito ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos de 60 dias de idade, peso corporal $289,6 \pm 22,5$ g. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC, n=5) e grupo experimental (GE, n=3). Os animais do GC receberam solução salina por via oral e os animais do GE foram inoculados por via oral com 10^5 taquizoítos de uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii* (DA SILVA et al. 2005). Os dois grupos foram mantidos em gaiolas com água e ração⁵ *ad libitum* durante 30 dias. No momento da eutanásia, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular conforme o seguinte protocolo: Acepromazina⁶ 2%

⁵Nuvelab®.

⁶Acepromazina - Acepran, Univet S.A., São Paulo, SP.

(1,26 mL/kg) + Cetamina⁷ 10% (1,26 mL/kg) + Cloridrato de xilazina⁸ 2,5% (0,42 mL/kg) e Sulfato de atropina⁹ 1% (0,22 mL/kg) (PACHALY et al., 2003), seguido por superdosagem de Cloreto de potássio¹⁰ (KCl), intra-cardíaco (IC) após laparotomia.

Realizou-se a colheita de sangue por intermédio de punção do plexo retro-orbital de todos os animais, visando detecção de anticorpos séricos anti-*T. gondii* por aglutinação direta (DA SILVA et al. 2003). Foram considerados positivos os títulos ≥ 25 . Através de laparotomia, o jejuno-íleo foi retirado, mensurado em seu comprimento total e largura para cálculo de área. Em função da dificuldade de distinguir anatomicamente o ponto exato da transição do jejuno e íleo, essas medidas foram feitas considerando estes dois órgãos sem separá-los, e os segmentos estudados do íleo foram obtidos de sua porção terminal, posteriormente a prega íleo-cecal.

O íleo de todos os animais foi submetido à fixação em formol acético, seguida de dissecação e retirada da túnica mucosa e tela submucosa para confecção de preparados totais e coloração pela técnica de Giemsa (BARBOSA, 1978). Os segmentos de todos os animais foram divididos para análise morfométrica e quantitativa em três regiões: mesentérica (0°-60° e 300°-360°), antimesentérica (120°-240°) e intermediária (60°-120° e 240°-300°), considerando a inserção do mesentérico como 0°. Com a utilização de microscópio óptico¹¹ por meio da objetiva de 40X, foram contados os neurônios presentes em 40 campos microscópicos de cada região de todos os segmentos intestinais de cada animal. A área de cada campo microscópio era de 0,21 mm².

Para a análise morfométrica mensurou-se a área do pericário e do núcleo de 300 neurônios (100 por região) de cada animal de ambos os grupos. A mensuração foi realizada por um software¹² a partir de imagens capturadas por uma câmera digital¹³ acoplada a um microscópio de luz. A partir da diferença entre as áreas do pericário e do núcleo, calculou-se a área do citoplasma. Além disso, determinou-se a razão entre a área do núcleo e a área do pericário objetivando verificar a proporção ocupada por esta organela dentro do pericário.

Para avaliar o padrão de distribuição dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram representadas pela média e desvio padrão, enquanto que as demais pela mediana e percentis 25 e 75 (P25 e P75). A comparação entre as médias de peso corporal, largura, comprimento e área do jejuno-íleo e números de neurônios entre os grupos foi realizada por intermédio do teste t de Student para amostras independentes. A comparação entre as medianas das áreas do pericário, núcleo e citoplasma e da razão núcleo/citoplasma foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Em todos os contrastes entre grupos foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

De acordo com os resultados do exame sorológico,

os animais do GE tiveram sorologia positiva para anticorpos anti-*T. gondii*, considerando-se títulos maior ou igual a 25, enquanto os do GC apresentaram resultado negativo. Apesar da comprovação da existência de anticorpos anti-*Toxoplasma*, não foram observadas alterações no peso corporal, comprimento ou área intestinal, apenas a largura do jejuno-íleo sofreu aumento resultante da situação experimental (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm desvio padrão do peso corporal, comprimento, largura e área do jejuno-íleo de ratos controle (GC) e submetidos à infecção por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii* (GE) durante 30 dias.

| Grupo | Peso (g) | Comprimento (cm) | Largura (cm) | Área do jejuno-íleo (cm ²) |
|-------------|-----------------------|------------------|---------------------|--|
| GC (n=5) | 363,30 $\pm 16,80$ | 1,36 \pm 0,39 | 0,84* \pm 0,13 | 1,11 \pm 0,21 |
| GE (n=3) | 337,50 $\pm 24,60$ | 1,70 \pm 0,62 | 1,23* \pm 0,15 | 2,15 \pm 1,05 |

Medidas seguidas de asteriscos indicam \neq significativa entre os grupos.

Considerando a área estudada de 25,2 mm² e a projeção do número de neurônios para todo o segmento estudado, não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio-padrão da densidade populacional de neurônios em 25,2 mm² (120 campos microscópicos) e projeção deste número para o jejuno-íleo inteiro de ratos hígidos (Grupo Controle – GC) e submetidos à infecção por uma cepa genótipo I de *T. gondii* (Grupo Experimental – GE).

| Grupo | Densidade neuronal em 25,2 mm ² | Projeção do número de neurônios para o jejuno íleo inteiro |
|-------|--|--|
| GC | 2.608,50 \pm 696,44 | 128.805,95 \pm 38.064,72 |
| GE | 3.068,25 \pm 728,76 | 164.255,92 \pm 15.4064,77 |

Quanto à análise morfométrica, observou-se que houve uma redução da área do pericário, do núcleo e do citoplasma dos neurônios mientéricos do grupo experimental em relação aos do grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 3). A tabela 4 apresenta a correlação entre as medidas morfométricas realizadas.

⁷Cetamina - Dopalen Injetável, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, SP.

⁸Cloridrato de xilazina - Calmiun, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP.

⁹Sulfato de atropina - Atropina 1% Fagra, Farmagráfica S.A., Mairiporã, SP.

¹⁰Cloreto de potássio - Laboratórios Darrow S.A., Rio de Janeiro, RJ.

¹¹Motic B5.

¹²Motic Imagem Plus 2.0.

¹³Moticam 2000, 2.0 mega pixel.

Tabela 3. Mediana (percentil 25; percentil 75) da área do corpo celular, do núcleo, do citoplasma e a razão núcleo/corpo de neurônios corados com azul de metileno do íleo de ratos controle (GC) e submetidos à infecção por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii* (GE) durante 30 dias.

| Grupo | Área do pericário (μm^2) | Área do núcleo (μm^2) | Área do citoplasma (μm^2) | Razão Núcleo-Pericário(μm^2) |
|----------|---------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| GC (n=5) | 321,5* (161,0; 841,5) | 126,5* (58,0; 317,0) | 207,7* (99,9; 511,4) | 0,37*(0,30; 0,46) |
| GE (n=3) | 153,5* (101,0;563,2) | 51,0* (32,8; 191,0) | 108,4* (65,1; 351,6) | 0,32*(0,26; 0,41) |

Medidas seguidas de asterisco indicam \neq significativa entre os grupos.

Tabela 4. Correlação entre área do pericário, do citoplasma e do núcleo de neurônios mientéricos do íleo terminal e de ratos hígidos (Grupo Controle – GC) e submetidos à infecção por uma cepa genótipo I de *T. gondii* (Grupo Experimental – GE).

| Grupo | Área do Pericário | Área do Pericário | Área do Núcleo |
|-------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | X | X | X |
| | Área do Núcleo | Área do Citoplasma | Área do Citoplasma |
| GC | 0,91 | 0,97 | 0,79 |
| GE | 0,92 | 0,98 | 0,84 |

A Figura 1 demonstra a frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalo da área do pericário, demonstrando que não houve alterações significativas. Já a figura 2

demonstra a frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalo de razão entre o núcleo e o pericário, sendo observado alterações significativas em determinadas classes.

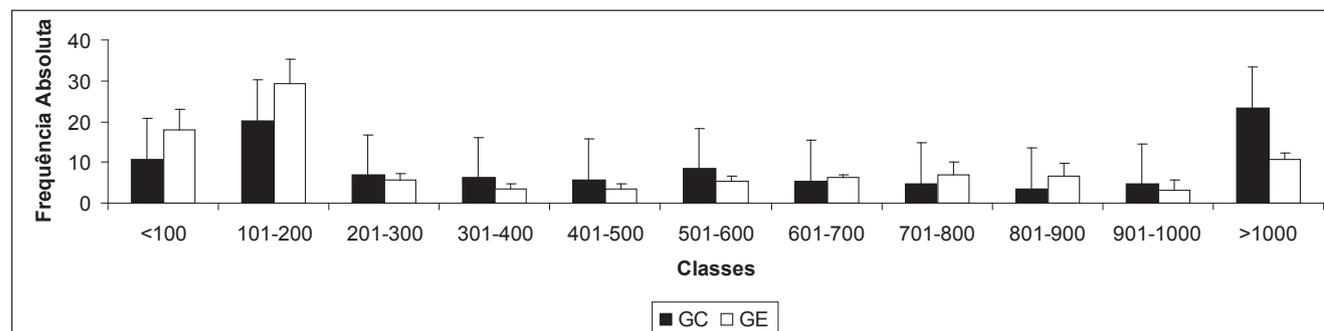


Figura 1 Histograma da área do pericário de neurônios mientéricos do íleo terminal de ratos hígidos (Grupo Controle – GC) e infectados por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii* (Grupo Experimental – GE). Colunas marcadas com asterisco diferem significativamente.

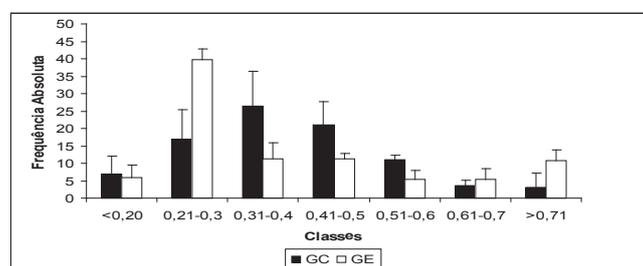


Figura 2 Histograma da razão entre a área do núcleo e a área do pericário de neurônios mientéricos do íleo terminal de ratos hígidos (Grupo Controle) e infectados por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii* (Grupo Experimental). Colunas marcadas com asterisco diferem significativamente.

Discussão

Os animais do GE apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, apesar dos ratos serem imunologicamente mais re-

sistentes à infecção quando comparados aos camundongos (DUBEY, 1997), a quantidade de taquizoítos, a via de inoculação e a duração da infecção utilizados neste experimento foram suficientes para induzir a formação de anticorpos (SUMYUEN; GARIN; DEROUIN, 1995). Apesar da descrição de diarreia nos animais domésticos infectados (DUBEY; FRENKEL, 1973; FREYRE; FALCON, 1989), neste estudo os animais não apresentaram quadro diarreico, reforçando que o rato normalmente apresenta um quadro subclínico da doença (DUBEY, 1997). Estudos prévios também não observaram diarreia entre ratos, independente da duração do experimento (SARTORI, 2007; SUGAUARA et al. 2008; TORRES, 2008). Outro ponto a ser elucidado refere-se à inoculação de taquizoítos por via oral, estudos demonstram que essa forma infectante do protozoário é sensível a ação do suco gástrico (MONTROYA; REMINGTON, 2000). Porém, neste estudo a via de inoculação não interferiu na infectividade do parasito, portanto, a quantidade inoculada foi

suficiente para promover infecção ou os parasitos penetraram anteriormente a sua passagem pelo estômago.

Além da ausência de sinais clínicos de toxoplasmose, não foi observada alteração no peso corporal, comprimento ou área intestinal nos animais infectados, apenas a largura do jejuno-íleo sofreu aumento resultante da situação experimental. Diante da ausência de dados histológicos com o intestino delgado destes animais, não podemos afirmar quais as alterações teciduais levaram a um aumento da espessura intestinal. Existe uma lacuna na literatura que demonstra quais as reações teciduais ocorridas diante da infecção crônica e faz-se necessária a realização de experimentos com processamento histológico dos órgãos, e avaliação morfológica e quantitativa das células imunológicas presentes. Sabe-se que durante a infecção aguda, poucos dias após o contato com o parasito, a resposta imune leva a um aumento nas placas de Peyer intestinais (SUMYUEN; GARIN; DEROUIN, 1995) e possivelmente o aumento da espessura durante a infecção crônica seja ainda resultado da resposta inflamatória provocada pela passagem do parasito. Além disso, o acometimento dos enterócitos pode dar início a uma série de eventos decorrentes da resposta imunológica, que leva a um processo inflamatório no intestino (WERSHIL; FURUTA, 2008). Essas manifestações foram descritas no trabalho de Kasper et al. (2003) a partir do sétimo dia após a infecção, desencadeando a secreção de quimiocinas e citocinas, que atraem e ativam as células inflamatórias, levando a um infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, encurtamento e necrose maciça das vilosidades (GATEL; WERTS, 2006).

Sugauara et al. (2008) observaram alterações significativas no peso corporal, comprimento ou área intestinal e largura do jejuno-íleo, apenas durante a infecção crônica, entretanto, a cepa empregada nesse experimento foi de genótipo III, salientando que em 24 horas o tempo de infecção não promoveu necrose ou apoptose das células nervosas. Com a mesma cepa deste experimento, infecções causadas pela inoculação intraperitoneal de *T. gondii* por 60 dias levaram aumento do comprimento e largura do jejuno (SARTORI, 2007) atribuída à resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito (GATEL; WERTS, 2006).

Considerando a área estudada de 25,2 mm² e a projeção do número de neurônios para todo o segmento estudado, não houve diferença estatística entre os grupos. A análise do jejuno infectado em diferentes experimentos com cepas genótipo I e genótipo III, também não encontraram alterações quantitativas significativas no plexo mientérico durante o período agudo (TORRES, 2008). No jejuno de animais submetidos à infecção por 60 dias pela via intraperitoneal também não foram observadas alterações quantitativas significativas (SARTORI, 2007). Esses estudos sugerem que apesar da cepa empregada ser do genótipo I, considerada altamente virulenta, a população de neurônios entéricos permaneceu numericamente inalterada durante a infecção crônica, independente da sua duração. Os neurônios entéricos do íleo não tiveram sua população reduzida em estudos agudos realizados utilizando-se cistos teciduais de genótipo II (SUGAUARA, 2008), nem em estudo agudo e crônico empregando cepa de genótipo III (SUGAUARA et al., 2008). Entretanto, o jejuno infectado cronicamente com uma cepa genótipo III teve perda de neurônios mientéricos (TORRES, 2008).

O processo inflamatório desencadeado pela ação do *T. gondii* na parede intestinal é parecido com os que ocorrem nas doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn, colite, íleite), pois ocorre um desequilíbrio da resposta imunológica da barreira intestinal (CAHILL et al., 1997). Alguns autores afirmam que os neurônios entéricos são resistentes à inflamação (ARANTES et al., 2004), enquanto outros demonstraram em estudos realizados com animais induzidos à colite têm como resultado a morte de neurônios mientéricos (SANOVIC et al. 1999). Goboos e Colins (1998) citam que pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa apresentam alterações em nível de sistema nervoso entérico, sendo a hiperplasia e hipertrofia alguns dos achados.

Quanto à análise morfométrica, observou-se que houve uma redução da área do pericário, do núcleo e do citoplasma dos neurônios mientéricos do grupo experimental. Sugauara (2008) encontrou as mesmas alterações no íleo, durante a infecção aguda provocada por uma cepa genótipo II, porém, inoculando cistos teciduais. Na infecção causada por taquizoítos de uma cepa genótipo III, o íleo apresentou redução da razão núcleo-citoplasma dos neurônios entéricos após 24 horas e atrofia na área do pericário, núcleo e citoplasma após 30 dias (SUGAUARA et al., 2008). No jejuno foi demonstrado redução da área do pericário, do núcleo e na razão entre núcleo/pericário dos neurônios mientéricos do grupo experimental após 30 dias, indicando que houve uma atrofia geral do neurônio (TORRES, 2008). Sartori (2007) trabalhando com um período de 60 dias de infecção por uma cepa genótipo I, com ratos inoculados por via intraperitoneal observou alterações morfométricas significativas nos neurônios entéricos com aumento da área citoplasmática e redução da área nuclear.

No que se refere à frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalo da área do pericário, o presente trabalho não encontrou alterações significativas. Todavia, a frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalos da razão entre o núcleo e o pericário, trouxe alterações significativas nas medidas compreendidas entre a classe 0,21 e 0,3; 0,51 e 0,6; e maiores que 0,71. Sartori (2007) demonstrou um aumento do número de neurônios em que o núcleo ocupava cerca de 31 a 40% do pericário, em detrimento daqueles em que o núcleo ocupava mais de 71% do pericário. Torres (2008) trabalhando com jejuno de ratos infectados por cepa do genótipo I submetidos à infecção por 24 horas encontrou redução na área do núcleo proporcionalmente maior do que o pericário, que levou a uma diminuição na proporção da área do pericário ocupada pelo núcleo (razão núcleo/pericário).

O trato gastrointestinal apresenta uma potente resposta antigênica contra bactérias comensais e antígenos ingeridos com os alimentos. O sistema gastrointestinal deve ser capaz de distinguir os patógenos pertencentes à biota residente dos antígenos presentes nos alimentos. Esta característica da mucosa diante da resposta imune é importante para a homeostasia do organismo (WERSHIL; FURUTA, 2008). Portanto, a redução encontrada na área do pericário, do núcleo e do citoplasma dos neurônios mientéricos pode estar relacionada ao processo de resposta imunológica que esses neurônios podem estar sofrendo, pois (KHAN et al., 1996) trazem que a infecção aguda de camundongos com *T. gondii* induz anergia de células T CD4 seguido do aumento da apoptose dessas células *in vitro*. A redução da área do

pericário e do núcleo podem ser indicativos morfológicos de um processo de apoptose, contudo para confirmação dessa possibilidade faz-se necessário a realização de novos experimentos com marcadores imunológicos característicos. Sabe-se pouco sobre o efeito de parasitos eucariotes em relação a apoptose, porém foi observado que após infecção tanto por *Leishmania donovani* ou *T. gondii* houve redução da taxa de apoptose nas células hospedeiras (GOEBEL et al., 1999).

Ao analisar-se a redução significativa da área nuclear, deve-se considerar que o tamanho da área nuclear está relacionado diretamente com a atividade metabólica (ANDRADE; JORDÃO, 2005), portanto, sugere-se que devido à infecção houve a redução do metabolismo dos neurônios entéricos, justificando a atrofia neuronal, visto que estudos indicam que o parasito acaba por usar da maquinaria celular para sua sobrevivência (SIBLEY, 1993; DLUGNOSKA, 2004; LEUDER; GROSS, 2005; NISHIKAWA et al. 2005; CARMEN et al., 2006; VILLENA et al. 2006; CARMEN; SINAI, 2007; CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

Apesar da cepa do genótipo I ser descrita como tendo afinidade com o tecido nervoso de ratos (DE CHAMPS et al. 1998), não se pode afirmar que o parasito estava presente nos neurônios entéricos, pois não foi possível a visualização de cistos teciduais durante a análise morfométrica. Fato este que pode ser justificado pelo trabalho de Dubey (1996), no qual não foram encontrados nas análises histológicas cistos nos tecidos estudados, segundo o autor pela pequena presença dos mesmos no tecido.

Porém, para se obter a confirmação da existência do parasito nos neurônios entéricos, e a ação do sistema imune sob estas células, são necessários estudos imunohistoquímicos, que possibilitem a marcação da localização do parasito e as células inflamatórias.

Conclusão

Apesar da comprovação da infecção, apenas a largura do jejuno-íleo sofreu aumento resultante da situação experimental. Sob a análise quantitativa, os neurônios não sofreram alteração significativa. Quanto à análise morfométrica, observou-se que houve uma redução da área do pericário, do núcleo e do citoplasma dos neurônios mientéricos. No que se refere à frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalo da área do pericário, o presente trabalho não encontrou alterações significativas. No entanto, a frequência de neurônios nas diferentes classes de intervalos da razão entre o núcleo e o pericário, trouxe alterações significativas.

Referências

AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 154.

ANDRADE, C. G. T. J.; JORDÃO, B. Q. O núcleo da célula. In: JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 40-49.

ARANTES, R. M. E. et al. Interferons- γ -induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in trypanosoma cruzi-infected mice. **American Journal of Pathology**, Maisons-

Laffitte, v. 164, n. 4, p. 1361-1368, 2004.

BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, Uberaba, v.11, n. 2-3, p. 95-97, 1978.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. Surto intrafamiliar de toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-RS, Julho 2005. **Bolem eletrônico epidemiológico**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 20 de maio 2008.

CAHILL, R. J. et al. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3126-3131, Aug. 1997.

CARMEN, J. C.; HARDI, L.; SINAI, A. P. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. **Cellular Microbiology**, Berkeley, v. 8, n. 2, p. 301-315, 2006.

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular Microbiology**, Princeton, v. 64, n. 4, p. 904-916, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia Bulletin**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.

COPPENS, I.; JOINER, K. A. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 1-20, 2001.

DA SILVA, A. V. et al. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felídeos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2003.

DA SILVA, A. V. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurologic signs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n.1, p. 29-33, 2005.

DE CHAMPS, C. et al. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. **Parasite**, Paris, v. 3, n. 5, p. 215-218, 1998.

DLUGOŃSKA, H. Molecular modifications of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 53, n. 2, p. 45-54, 2004.

DUBEY J. P.; FRENKEL, J. K. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. **The Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 59, n. 3, p. 505-512, 1973.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Florida: CRC Press, Boca Ratón, 1988. 220 p.

- DUBEY, J. P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 80, n. 6, p. 951-956, 1996.
- DUBEY, J. P. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Jornal Parasitology**, Cambridge, v. 83, n. 4, p. 755-757, 1997.
- FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos biológicos da parasitologia humana**. São Paulo: Manole, 2003. p. 17-25.
- FREYRE, A.; FALCON, J. D. **Toxoplasmosis e lãs espécies domésticas y como zoonosis**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de La Universidad de la República, 1989. p. 322.
- FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. New York: Churchill Livingstone, 2006. p. 1-28.
- GARCIA, J. L. et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguaipitã, PR, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 671-676, 1999.
- GATEL, D. B.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune System. **Trends in Parasitology**, England, v. 22, n. 10, p. 448-452, 2006.
- GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterology Motility**, Alberta, v. 10, n. 3, p. 189-202, 1998.
- GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Caracterização molecular de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA e 2º SIMPÓSIO DE RIQUETSIOSES, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: CBPV, 2006. p.149-151.
- GOEBEL, S. et al. *Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HI-60 cells. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, Japan, v. 23, n. 6, p. 351-356, 1999.
- GRUNDY, D.; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Current Opinion in Gastroenterology**, Boston, v. 22, n. 2, p. 102-110, 2006.
- KASPER, L. et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Internacional Journal for Parasitology**, Oxford, n. 43, p. 401-409, 2003.
- KHAN, I. A. et al. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-12/2 mice. **Internacional. Immunology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 636-643, 1996.
- LEUDER, C. G. K.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: Molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, New York, v. 289, n.1, p. 219-237, 2005.
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. *Toxoplasma gondii*. In: MANDEL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious disease. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2858-2888.
- NISHIKAWA, Y. et al. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. **Cellular Microbiology**, Berkeley, v. 7, n. 6, p. 849-867, 2005.
- PACHALY, J. R. et al. Anesthesia of wistar rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled doses of ketamine, xylazine, acepromazine and atropine-preliminary report. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 6, n. 2, p.195, 2003.
- SANOVIC, S. et al. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. **American Journal of Pathology**, Birmingham, v. 155, n. 4, p. 1051-1057, 1999.
- SARTORI, A. L. **Análise dos neurônios do plexo mientérico do jejuno de ratos infectados por 60 dias com *Toxoplasma gondii***. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Enfermagem) – Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde, Universidade Paranaense – UNIPAR, Umuarama, 2007.
- SIBLEY, L. D. et al. Macrophage interactions in toxoplasmosis. **Research in immunology**, France, v. 144, n. 1, p. 38-40, 1993.
- SOARES, R. M. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 17-19, 2004.
- SUGAUARA, E. Y. Y, et al. Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 516-523, 2008.
- SUGAUARA, E. Y. Y. **Alterações do plexo mientérico do íleo e cólon descendente causadas por *Toxoplasma gondii***. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Paranaense - UNIPAR, Umuarama, 2008.
- SUMYUEN, M. H.; GARIN, Y. J. F.; DEROUIN, F. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. **Jornal Parasitology**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 327-329, 1995.
- TORRES, J. R. P. **Perda e plasticidade neuronal mientérica no jejuno de ratos infectados por taquizoítos de *Toxoplasma gondii***. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Paranaense – UNIPAR, Umuarama, 2008.
- VILLENA, I.; AUBERT, D.; PINON, J. M. Cell-host-para-

site interactions: biodiversity, pathogenesis, environment. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, Paris, v. 64, n. 2, p. 115-120, 2006.

WERSHIL, K. B.; FURUTA, G. T. Gastrointestinal mucosal immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, United States, v. 121, n. 2, 2008.

Recebido em: 12/12/2008

Aceito em: 06/11/2009