

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES DO EPITÉLIO**  
**INTESTINAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS**  
**ORALMENTE COM 10 OU 20 CISTOS DE *Toxoplasma gondii***

**Discente: Marisol Patricia Pallette Briceno**

**Orientadora: Professora Dra. Neide Maria Silva**

**Uberlândia - MG**

**2023**

**MARISOL PATRICIA PALLETE BRICENO**

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES DO EPITÉLIO INTESTINAL  
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS ORALMENTE COM 10 OU 20  
CISTOS DE *Toxoplasma gondii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Área de concentração: Parasitologia e Histologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Neide Maria da Silva

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

**MARISOL PATRICIA PALLETE BRICENO**

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES DO EPITÉLIO INTESTINAL  
DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS ORALMENTE COM 10 OU 20  
CISTOS DE *Toxoplasma gondii***

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nota: \_\_\_

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neide Maria da Silva

---

Dr.<sup>a</sup> Flávia Batista Ferreira França

---

Dr.<sup>a</sup> Iasmin Aparecida Cunha Araújo

**UBERLÂNDIA – MG**

**2023**

Dedico este trabalho aos  
meus pais Ruth e José, que me  
oferecem conselhos e ânimos  
desde sempre para continuar com  
meu trabalho e aspirações.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades e por me fortalecer todos os dias.  
Sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Ruth e José, por sempre me apoiar com os estudos e crescimento na área das ciências e pesquisa. Por confiar em mim desde que decidi estudar biologia.

A minha orientadora, Neide Maria Silva, por ter me acolhido no laboratório e por proporcionar aprendizados e experiências incríveis. Obrigada pela paciência em todos estes anos de trabalho.

A todo o pessoal do laboratório IMPAT e setor da histologia. Desde o ano 2013 que convivo com vocês. Muitas pessoas se foram, mas outras ficaram, e acredito que terei sempre o apoio delas tanto no acadêmico como pessoal.

A Universidade Federal de Uberlândia e CAPES por me proporcionar as ferramentas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho e de vários outros que, espero, vejam.

Por último, mas não menos importante, ao meu marido Alex, pelo apoio nestes últimos 5 anos sendo meu porto seguro e bom ouvinte de todas as passagens pela universidade.

## Resumo

O epitélio gastrointestinal é a maior porta de entrada de vários patógenos, incluindo o parasito *Toxoplasma gondii*. A primeira barreira de defesa contra *T. gondii* é a mucosa intestinal sendo importante o estudo deste epitélio para uma maior compreensão da toxoplasmose. Assim, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de um estudo capaz de avaliar as diferenças histológicas e moleculares no intestino delgado usando dois inóculos de cistos (10 e 20) de *T. gondii* visando uma infecção oral na linhagem C57BL/6. Nossos achados indicam que enquanto maior a carga parasitária utilizada para infecção experimental de camundongos suscetíveis C57BL/6, maior será a inflamação e parasitismo intestinal. Além disso, observamos que quanto maior o inóculo do parasito, maior é a depleção de células caliciformes e de Paneth, refletindo em infecção mais grave nesses animais. Adicionalmente marcadores moleculares *Math1* e *Hes1*, representantes das células secretórias e de enterócitos respectivamente, são diminuídos pela infecção de *T. gondii* junto com o aumento da carga parasitaria. A elevada concentração de citocinas pro-inflamatórias favorece a inflamação pela infecção por *T. gondii* sendo maior com a dose de 20 cistos. Concluimos que quanto maior a carga parasitaria utilizada para a infecção experimental, maior será a inflamação, parasitismo e depleção de células no epitélio intestinal.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, epitélio intestinal, camundongo, C57BL/6, cistos.

## Abstract

The gastrointestinal epithelium is the major port of entry for several pathogens, including the *Toxoplasma gondii*. The first barrier against *T. gondii* is the intestinal mucosa, and the study of this epithelium is important for a better understanding of toxoplasmosis. Thus, the present study is justified by the need of a report capable of evaluating the histological and molecular differences in the small intestine using two inoculums of cysts (10 and 20) of *T. gondii* targeting an oral infection in the C57BL/6 mice strain. Our results indicate that the high parasitic load used for the mice experimental infection, the greater is the intestinal inflammation and parasitism. Moreover, the greater the parasite load, the greater the depletion of goblet and Paneth cells, resulting in more severe infection in these animals. Additionally, the molecular markers, *Math1* and *Hes1*, representing secretory cells and enterocytes respectively, decrease by *T. gondii* infection along with increased parasite load. The concentrations of pro-inflammatory cytokines promote inflammation by *T. gondii* infection which will further increase with the 20 cysts dose. We conclude that the higher the parasite load used for the experimental infection, the higher is the inflammation, parasitism, and cell depletion in the intestinal epithelium.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, intestinal epithelium, mice, C57BL/6, cysts.

## SUMARIO

<b><u>1.</u> INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e o ciclo de vida .....	9
1.2 Mecanismo de invasão nas células do hospedeiro .....	10
1.3 Resposta imune intestinal a <i>T. gondii</i> .....	12
<b><u>2.</u> OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b><u>3.</u> METODOLOGIA .....</b>	<b>14</b>
3.1 Organismo infeccioso e manutenção .....	14
3.2 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação .....	14
3.3 Delineamento experimental.....	14
3.4 Determinação do encurtamento do intestino delgado.....	15
3.5 Análises histológicas.....	16
3.6 Análise da inflamação.....	16
3.7 Imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais.....	16
3.8 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) .....	17
3.9 Mensuração de citocinas no soro de animais experimentais por “Cytometric Beads Array” (CBA).....	18
3.10 Análises estatísticas.....	19
<b><u>4.</u> RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Características clínicas após infecção com <i>T. gondii</i> utilizando inóculos diferentes de cistos	20
4.2 Relação do inóculo de cistos e a redução do comprimento do intestino delgado em camundongos C57BL/6.....	21
4.3 Grau de parasitismo e inflamação nos animais infectados com 10 ou 20 cistos de <i>T. gondii</i>	22
4.4 Células calciformes e de Paneth são reduzidas com o aumento do inóculo de cistos de <i>T. gondii</i>	24



4.5 Marcadores de transcrição relacionados com a homeostase intestinal e diferenciação celular no intestino delgado são alterados pela infecção por <i>T. gondii</i> .....	27
4.6 Resposta inflamatória sistêmica na infecção por <i>T. gondii</i> usando dois inóculos diferentes de cistos.....	28
<u>5.</u> <b>DISCUSSÃO</b> .....	29
<u>6.</u> <b>CONCLUSÕES</b> .....	32
<u>7.</u> <b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	32
<u>8.</u> <b>ANEXO</b> .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Toxoplasma gondii* e o ciclo de vida

*Toxoplasma gondii*, o agente etiológico da toxoplasmose pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccídea, é um protozoário intracelular obrigatório (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004). Este parasito possui uma distribuição mundial, com alta incidência de infecção em humanos e animais domésticos (FERGUSON, 2002). No Brasil, estudos mostraram que na população em geral, a prevalência da infecção por *T. gondii* varia de 20 a 84% (DUBEY, *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos, se estima que 11% da população dentro da faixa etária maior que 6 anos de idade, estão infectados com *T. gondii*. Em vários outros países no mundo, sabe-se que mais que 60% da população está infectada com *T. gondii* (CDC, 2018).

Patógenos pertencentes à subclasse Coccídea têm ciclos biológicos complexos sendo particulares em cada hospedeiro, e em alguns casos estes patógenos podem ser transmitidos por um ciclo fecal-oral, contudo *T. gondii* também pode ser transmitido pelo carnivorismo e por via transplacentária (JONES; DUBEY, 2010). Em relação ao ciclo biológico, são conhecidas três formas infecciosas do parasito: o taquizoíto caracterizado pela replicação rápida, é responsável pelos sintomas durante a fase aguda da enfermidade; os bradizoítos dentro do cisto tecidual apresentam uma replicação lenta sendo característicos na fase crônica; e os esporozoítos contidos nos oocistos são eliminados junto com as fezes dos felídeos, os hospedeiros definitivos de *T. gondii*. (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; SPEER; DUBEY, 1998).

O ciclo biológico de *T. gondii* é dividido numa fase sexuada que ocorre nas células intestinais dos hospedeiros definitivos, e numa fase assexuada que pode acontecer nos hospedeiros definitivos e nos hospedeiros intermediários – aves e mamíferos, incluindo o homem (DUBEY, 1998).

Nos felídeos, a fase sexuada começa quando carne contaminada com cistos é ingerida e, no estômago, diversas enzimas gástricas destroem a parede destas estruturas, liberando os bradizoítos no lúmen intestinal dos felídeos. Os parasitos invadem os enterócitos e passam pelo processo de merogonia resultando na formação dos merozoítos contidos nos esquizontes (DUBEY, 1998). Seguindo, ocorre a formação dos gametas masculinos e femininos mediante o processo chamado gametogênese. Com a fecundação dos gametas, são formados os oocistos os quais são liberados pela destruição dos enterócitos e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos felídeos. O processo de esporulação ocorre entre 1-5 dias dependendo da temperatura, umidade e oxigenação do meio externo, conduzindo ao desenvolvimento de

oocistos infecciosos e maduros, que contém dois esporocistos e cada um com quatro esporozoítos (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A fase assexuada do ciclo de *T. gondii* ocorre em ambos os hospedeiros, através da ingestão de oocistos esporulados ou carnes cruas ou malcozidas contaminadas com cistos teciduais. Depois da ingestão de oocistos, os esporozoítos são liberados, invadem o epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos replicando-se rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer célula nucleada e se disseminam facilmente por todo o organismo. Como resultado da conversão de taquizoítos a bradizoítos, os cistos teciduais se formam com 7 a 10 dias após a infecção, e podem permanecer no hospedeiro intermediário por toda a vida, predominantemente no cérebro, olhos e músculos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

### **1.2 Mecanismo de invasão nas células do hospedeiro**

*T. gondii* é um parasito com a habilidade de invadir uma grande variedade de células do hospedeiro. Foram propostos e descritos 3 tipos de invasão celular por *T. gondii*: 1) a transcelular, 2) a paracelular e 3) a invasão por "cavalo de troia" (JONES; KORCSMAROS; CARDING, 2017; MENDEZ; KOSHY, 2017).

O processo de invasão transcelular é ativo e depende da motilidade do parasito e da liberação de proteínas de organelas secretoras, as micronemas (MICs), roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRA) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O reconhecimento e adesão de moléculas de superfície entre o parasito e a célula hospedeira ocorre por interações de baixa afinidade com antígenos de superfície (SAG) da membrana do parasito ancorados por GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (TOMAVO; SCHWARZ; DUBREMETZ, 1989; DZIERSZINSKI, *et al.*, 2000). As SAGs reconhecem uma ampla gama de receptores em diferentes tipos de células, tais como heparan sulfato, proteoglicanos e laminina (FURTADO; CAO; JOINER, 1992; CARRUTHER *et al.*, 2000; AZZOUZ *et al.*, 2013).

Proteínas secretadas especificamente da região do pescoço das roptrias, RON2, RON4 e RON5 junto com a proteína secretada por micronema ancorada na membrana do parasito (AMA1) formam uma estrutura importante para a invasão da célula hospedeira denominada de junção móvel (MJ) (ALEXANDER *et al.*, 2005; BESTEIRO *et al.*, 2009).

Com a formação da MJ, o parasito está fortemente equipado para se internalizar em células como os enterócitos do epitélio intestinal, acontecendo a sua replicação durante as primeiras 24 horas após infecção (SPEER; DUBEY, 1998). O parasito começa a invasão

transcelular mediante a MJ, se impulsionando pela força motora interna de actinmiosina, dando origem ao vacúolo parasitóforo que se aloja no citoplasma da célula hospedeira (SUSS-TOBY; ZIMMERBERG; WARD, 1996; BICHET *et al.*, 2014).

Na modalidade de invasão paracelular, *T. gondii* atravessa diretamente o epitélio intestinal. A habilidade migratória e de rápido movimento do parasito (*gliding*) através das barreiras epiteliais é importante para sua disseminação no hospedeiro antes da ativação do sistema imune (BARRAGAN; SIBLEY, 2002). Mediante o uso de RNA de interferência (siRNA) para a redução da expressão do gene ocludina, foi demonstrado que a migração de *T. gondii* diminui significativamente, mostrando que ocludina é importante na invasão paracelular do epitélio intestinal (WEIGHT *et al.*, 2015). A infecção por *T. gondii* em células Caco-2 alterou a expressão proteica de ocludina e ZO-1, proteínas importantes das junções de oclusão no epitélio intestinal (BRICENO *et al.*, 2016). Ramírez-Flores e colaboradores (2021) demonstraram que o produto excretório/secretório de taquizoítos (cepa RH) modifica as junções intercelulares levando a sua diminuição da expressão proteica e, após 4 horas de exposição em células MDCK, o produto excretório/secretório facilita a migração paracelular dos taquizoítos.

A última forma de invasão descrita pela literatura é o mecanismo “ cavalo de troia ”, onde células infectadas transportam o parasito para diferentes tecidos permitindo que o parasito se espalhe pelo organismo hospedeiro até locais secundários de infecção, como músculos, baço e cérebro (MENDEZ; KOSHY, 2017). *T. gondii* invade diferentes tipos de grupos celulares do sistema imune como células dendríticas, neutrófilos, monócitos e macrófagos; tudo isto para se disseminar nos tecidos do hospedeiro (LAMBERT *et al.*, 2006; BIERLY *et al.*, 2008; COOMBES *et al.*, 2013). Com o uso do modelo *in vivo* por infecção intraperitoneal (i.p.), baços de camundongos foram analisados e foi demonstrado que a migração de células dendríticas infectadas é maior que células dendríticas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (LAMBERT *et al.*, 2006). Mediante o modelo de infecção i.p. em camundongos; monócitos, macrófagos e neutrófilos infectados com o parasito foram encontrados na cavidade peritoneal após 72h de infecção; porém no baço, as células dendríticas plasmocitoides são a maior população celular infectada (BIERLY *et al.*, 2008). Coombes e colaboradores (2013) descrevem que na lâmina própria do intestino delgado de camundongos, os neutrófilos são a população celular de preferência para que *T. gondii* invada e consiga se disseminar no organismo hospedeiro.

### 1.3 Resposta imune intestinal a *T. gondii*

A infecção experimental usando o modelo murino é uma ótima ferramenta para o entendimento das alterações patológicas causadas por *T. gondii*. Isto é porque o camundongo é considerado um hospedeiro intermediário natural e conseqüentemente o sistema imunológico do roedor poderia lidar melhor com a infecção por *T. gondii*. (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; GAZZINELLI *et al.*, 2015). Sendo o trato gastrointestinal a via de entrada importante de *T. gondii*, este causa uma inflamação na mucosa intestinal de camundongos C57BL/6 produto de uma elevada produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (RACHINEL *et al.*, 2004; EGAN *et al.*, 2009).

Com este cenário, a infecção por *T. gondii* ativa a resposta imune celular e humoral do hospedeiro. Em camundongos C57BL/6, após a infecção experimental com *T. gondii* por via oral, ocorre a inflamação no íleo, semelhante à inflamação de pacientes com a doença de Crohn (EGAN *et al.*, 2009), tal inflamação gera uma necrose das vilosidades na mucosa causando destruição tecidual (LIESENFELD *et al.*, 1996). A ileíte é causada por uma resposta imune mediada por células T CD4+ do tipo 1 caracterizada por aumento de mediadores inflamatórios incluindo IFN- $\gamma$ , TNF e óxido nítrico (NO) (KHAN *et al.*, 1997; MENNECHET *et al.*, 2002).

A primeira linha de defesa inicial entre o hospedeiro e os patógenos intestinais como *T. gondii* é o epitélio intestinal (MÜLLER; AUTENRIETH; PESCHEL, 2005). Esta barreira é composta por um grupo de células epiteliais como os enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células M e células enteroendócrinas (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009; ALLAIRE *et al.*, 2018). Uma fonte rica em peptídeos antimicrobianos são as células de Paneth localizadas nas criptas intestinais. A infecção por *T. gondii* desencadeia uma alta produção de IFN-  $\gamma$ , produto da ativação de células T CD4+, que leva à destruição das células de Paneth no epitélio intestinal (RAETZ *et al.*, 2013b). Outro grupo importante no arcabouço intestinal são as células caliciformes as quais secretam mucinas formando uma camada de muco em toda a superfície intestinal sendo considerada uma barreira física (PELASEYED *et al.*, 2014; OKUMURA, TAKEDA, 2017; SCHNEIDER *et al.*, 2018). Diversos trabalhos descrevem que a infecção por *T. gondii* atinge as células caliciformes levando a desorganização do epitélio intestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2022; BRICEÑO *et al.*, 2022).

Adicionalmente, a infecção oral com *T. gondii* induz o recrutamento de uma grande quantidade de monócitos inflamatórios na lâmina própria do intestino delgado (COHEN; DENKERS; 2015). Essas células dependem do receptor de quimiocina CCR2, e podem controlar o parasitismo enquanto invadem a mucosa intestinal (DUNAY *et al.*, 2008). Também os monócitos inflamatórios são fonte de IL-12 que induzem a produção de IFN- $\gamma$  contribuindo

para o controle do parasitismo (GAZZINELLI *et al.*, 1994; BENEVIDES *et al.*, 2013; COHEN *et al.*, 2013). Por outro lado, há mecanismos reguladores como a produção de IL-10 que é importante para prevenir os efeitos patológicos da infecção por *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 2000). Na ausência de IL-10, camundongos infectados com *T. gondii* sucumbiram rapidamente pela resposta depende de células T CD4<sup>+</sup> devido a produção alta de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GAZZINELLI *et al.*, 1996).

Neste panorama, a importância de uma metodologia de trabalho e análise é essencial para um melhor entendimento da doença. Para isto, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de um estudo capaz de avaliar as diferenças histológicas e moleculares no intestino delgado usando dois inóculos de cistos (10 e 20) de *T. gondii* visando uma infecção oral na linhagem C57BL/6. Este trabalho acrescentaria, de modo relevante, ao entendimento da infecção e pode ser usado como estudo de referência para futuros projetos relacionados com a toxoplasmose oral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente características histológicas e moleculares no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com os inóculos de 10 e 20 de cistos de *Toxoplasma gondii*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência de animais C57BL/6 infectados com cistos de *T. gondii* por via oral.
- Verificar o parasitismo pela técnica de imunohistoquímica e a expressão do gene *Surface antigen 1 (SAG1)* por qPCR no intestino delgado.
- Quantificar as células caliciformes pela coloração Alcian blue em intestinos de camundongos C57BL/6.
- Quantificar as células de Paneth pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e avaliar marcadores antimicrobianos, lisozima (*Lyz1*), defensina 3 (*Defa3*) e defensina 5 (*Defa5*), no intestino delgado pela técnica de qPCR.
- Avaliar a expressão de marcadores de diferenciação de células secretoras (*Math1*) e enterócitos (*Hes1*) pela expressão de RNA mensageiros (mRNAs) mediante qPCR no intestino de camundongos C57BL/6.

- Quantificar citocinas pró e anti-inflamatórias em animais infectados oralmente por *T. gondii* com 10 ou 20 cistos.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Organismo infeccioso e manutenção**

A cepa ME-49 (tipo II) de *T. gondii* foi utilizada para a infecção experimental neste trabalho. A manutenção da cepa foi realizada via intraperitoneal em camundongos da linhagem *Swiss* utilizando uma dose de 10 cistos. No trigésimo dia após a inoculação, o cérebro foi coletado, macerado em 1 mL de PBS para posterior quantificação dos cistos a fresco no microscópio de luz. Para os ensaios experimentais do presente trabalho, camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 ou 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* em um volume final de 200 µl de PBS.

#### **3.2 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação**

Forem utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR). Durante todo o procedimento experimental, os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração.

Todos os procedimentos experimentais nos animais assim como os protocolos deste trabalho foram aprovados pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo N° 088/15).

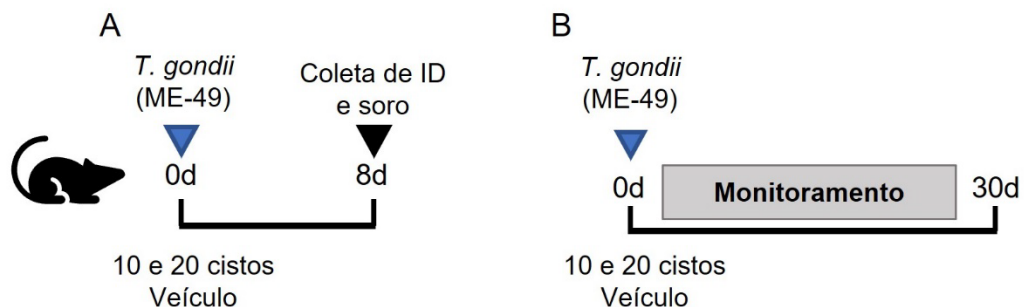
#### **3.3 Delineamento experimental**

Os camundongos foram infectados por via oral com 10 ou 20 cistos (Fig 1A). Com 8 dias de infecção, os camundongos foram anestesiados com cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) / xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) por via intraperitoneal (i.p.) para, primeiramente, coletar o sangue por punção do plexo retro orbital e, posteriormente, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical para a coleta dos órgãos. Adicionalmente, dois grupos controles foram avaliados paralelamente com os grupos experimentais baseado no tempo de infecção.

**Tabela 1.** Detalhes dos grupos experimentais

Grupo experimental	Dose de cistos	Tempo de infecção	Número de indivíduos (N)
A1	10 cistos	8 dias	5
A2	20 cistos		5
B1	10 cistos	30 dias	5
B2	20 cistos		5

O comprimento do intestino delgado foi mensurado e logo dividido em quatro porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo); e processado como "rolo suíço" para as análises histológicas. O intestino delgado foi fixado em formol tamponado a 10% e processado para inclusão em parafina e posterior corte histológico com uma espessura de 4µm no micrótomo RM 2125 (Reichert, Leica, Wetzlar, Alemanha). Para a obtenção do soro, amostras de sangue coletadas foram centrifugação a 500 rpm durante 5 minutos e armazenadas a -80 °C para análise de citocinas. Além disso, separadamente, outros animais infectados com os dois inóculos foram monitorados diariamente até o dia 30 após infecção para a avaliação da perda de peso, a taxa de sobrevivência e o escore de morbidade (Fig. 1B) (BARTLEY *et al.*, 2006).

**Figura 1.** Gráfico explicativo da metodologia aplicada neste trabalho.

A) Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram infectadas por via oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* usando dois inóculos (10 e 20) para avaliação experimental. Após 8 dias de infecção, os animais foram eutanasiados para análises histológicas e moleculares comparativas do intestino delgado (ID). B) Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram infectadas por via oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* usando dois inóculos (10 e 20) e monitoradas por 30 dias para avaliação das características clínicas.

### 3.4 Determinação do encurtamento do intestino delgado

A porcentagem de encurtamento do intestino delgado (E) foi calculada de acordo com Muñoz e colaboradores (2009) seguindo a fórmula na qual  $\bar{X}$  representa a média do comprimento dos intestinos delgados de camundongos não infectados e  $L$  indica o comprimento



do intestino delgado de camundongos infectados com 8 dias após infecção, multiplicado por 100 e dividido pela média do comprimento dos intestinos delgados não infectados.

$$E = \frac{\bar{X} - L}{\bar{X}} \times 100$$

### 3.5 Análises histológicas

As porções de intestino delgado fixadas em formol tamponado a 10% foram processadas para a inclusão em parafina e cortados no micrótomo para sua posterior coloração dependendo da análise e tipo celular a ser avaliado. As células de Paneth foram contadas em 100 campos microscópicos por porção intestinal (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) em cortes corados com hematoxilina e eosina (H&E), totalizando 400 campos microscópicos por camundongo.

Para a quantificação das células caliciformes, a coloração Alcian blue (AB - pH 2,5) foi usada para identificar as células produtoras de mucinas ácidas (SCHNEIDER *et al.*, 2018; STAHL *et al.*, 2018). As células caliciformes foram analisadas em 50 campos microscópicos por segmento intestinal, totalizando 200 campos teciduais por camundongo. As análises foram feitas às cegas utilizando uma objetiva de 40X de aumento no microscópio de luz.

### 3.6 Análise da inflamação

O escore inflamatório foi avaliado em toda a seção tecidual do intestino delgado em cortes de tecido corados com H&E, como descrito anteriormente (BENEVIDES *et al.*, 2013) sendo representado como unidades arbitrárias: 0-2, leve; 2-4, moderado; 4-6, grave; e acima de 6, muito grave. As análises do escore inflamatório foram realizadas às cegas com objetiva de 10X no microscópio de luz.

### 3.7 Imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais

A detecção de parasitos teciduais foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica seguindo o protocolo descrito anteriormente com algumas modificações (BARENCO *et al.*, 2014). Resumidamente, as lâminas com os cortes de tecidos desparafinados foram colocadas em uma câmara úmida e incubadas com peróxido de hidrogénio a 3% para bloquear a atividade da enzima peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito no micro-ondas por 7 minutos com tampão citrato (11mM - 0,21% em água destilada, pH 6). Para bloquear os sítios de ligação não específicos, os cortes foram incubados com leite desnatado a 0,3% (Molico; Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) em PBS a temperatura ambiente. Para a detecção dos parasitos, os cortes foram incubados com soro anti - *T. gondii* (1:100) proveniente de camundongos *Swiss*

infectados com cistos da cepa ME-49 diluído em 0,01% de saponina e sendo incubados os cortes overnight a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo IgG biotilado anti-camundongo (1:500) produzido em cabra (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) a 37°C por 1 hora.

A sensibilidade da reação foi amplificada com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:100) (kit ABC, PK-4000 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) a 37°C durante 30 minutos. A reação foi revelada com 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> junto com 3,3'-diaminobenzidinatetracloridrato (DAB; Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Os cortes de tecido foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados com lamínula e examinados no microscópio de luz usando uma objetiva de 40X às cegas. O parasitismo tecidual foi avaliado pela contagem dos cistos e vacúolos parasitóforos em toda a secção do intestino delgado.

### **3.8 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)**

A extração de RNA total foi realizada usando fragmentos congelados de íleo. Estas amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido para assim ser homogeneizadas em 1000 µl do reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 300 µl de clorofórmio e agitadas por inversão durante 15 segundos, incubadas durante 3 minutos e centrifugadas a 12,000 × g por 15 minutos a 4 °C. Logo, a fase aquosa (transparente) foi transferida para um tubo novo e adicionados 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA sendo incubada esta solução durante 10 minutos para depois ser centrifugada a 12,000 × g por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1000 µl de etanol a 75% diluído em água Mili-Q. Após agitação manual por 10 segundos, as amostras foram centrifugadas a 10,000 × g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA ressuspendido em 50 µl de água de injeção e as amostras foram acondicionadas a -80°C.

A concentração de RNA total será mensurada no espectrofotômetro GeneQuant (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Para a eliminação de resto de fitas simples ou duplas de DNA, cada amostra foi tratada com a enzima DNase I seguindo a instruções do fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA). O DNA complementar (cDNA) será sintetizado usando 1µg de RNA junto com o primer oligo (dT) diluído em água de injeção. A mistura foi aquecida a 70°C durante 5 minutos no termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific), colocados no gelo por 5 minutos e depois foram adicionados 11,5µl de uma solução contendo tampão de reação ImProm-II 1x, MgCl<sub>2</sub> 3mM, mix de dNTPs 0,5 mM, a enzima transcriptase reversa ImProm-II <sup>TM</sup> (Promega, Madison, WI, EUA) e completado com água de

acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a solução continuou um ciclo de 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C no mesmo termociclador.

Por fim, o cDNA foi diluído a uma concentração de 6ng/μl e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. Finalmente, o cDNA foi amplificado e quantificado no aparelho de PCR em tempo real ABI PRISM-7500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), utilizando o Master Mix SYBR® Green PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA) e primers específicos seguindo as instruções do fabricante (Tabela 2).

**Tabela 2.** Genes e suas sequencias de nucleotídeos.

<i>Genes</i>	<i>Sequencias</i>
<i>Hes1</i>	Fw - GGAGAGGCTGCCAAGGTTTT
	Rv - GCAAATTGGCCGTCAGGA
<i>Math1</i>	Fw - ACATCTCCCAGATCCCACAG
	Rv - ACAACGATCACCACAGACCA
<i>Lyz1</i>	Fw - GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG
	Rv - CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG
<i>Defa3</i>	Fw - CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG
	Rv - TCAGCGACAGCAGAGTGTGTA
<i>Defa5</i>	Fw - TTGTCCTCCTCTCTGCCCTTGT
	Rv - ATGAAGAGCAGACCCTTCTTGG
<i>Sag1</i>	Fw - TTTCCGAAGGCAGTGAGACG
	Rv - CCATAACGCCACATCGCA
<i>GAPDH</i>	Fw - GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG
	Rv - CAGTGTAGCCCAAGATGCCC

### 3.9 Mensuração de citocinas no soro de animais experimentais por “Cytometric Beads Array” (CBA)

Amostras de sangue foram centrifugadas e os soros coletados e armazenados a -80°C até o uso. As citocinas IL-6, IL-10, TNF e IFN-γ foram quantificadas pelo método CBA (BD Company, San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram analisadas pelo aparelho de citometria de fluxo FACSCanto-II (BD Company, San Diego, CA, USA) e os valores obtidos foram analisados com o software FACSDiva (BD Company, San Diego, CA, USA).

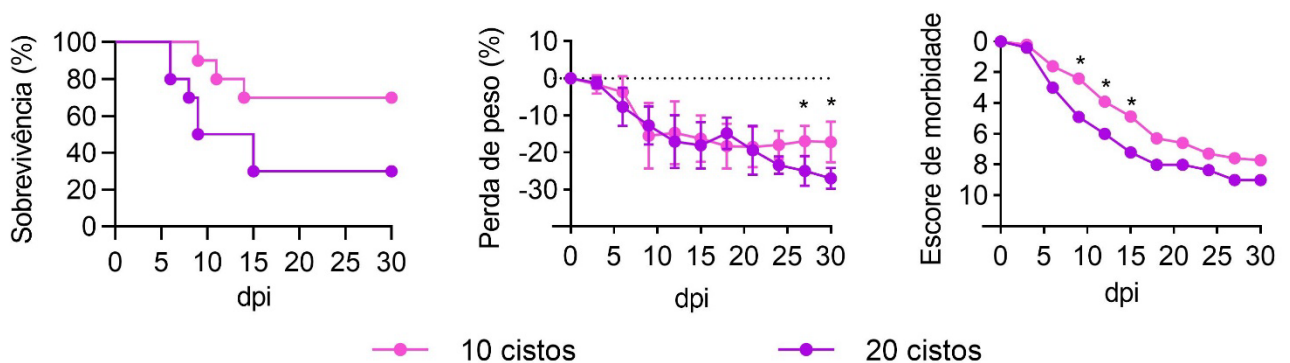
### 3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e o escore de morbidade foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Para comparações entre dois grupos foram utilizados o teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Para comparações múltiplas entre mais de dois grupos foi usado o teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, ou teste de Kruskal-Wallis com a teste de múltiplas comparações de Dunn para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características clínicas após infecção com *T. gondii* utilizando inóculos diferentes de cistos

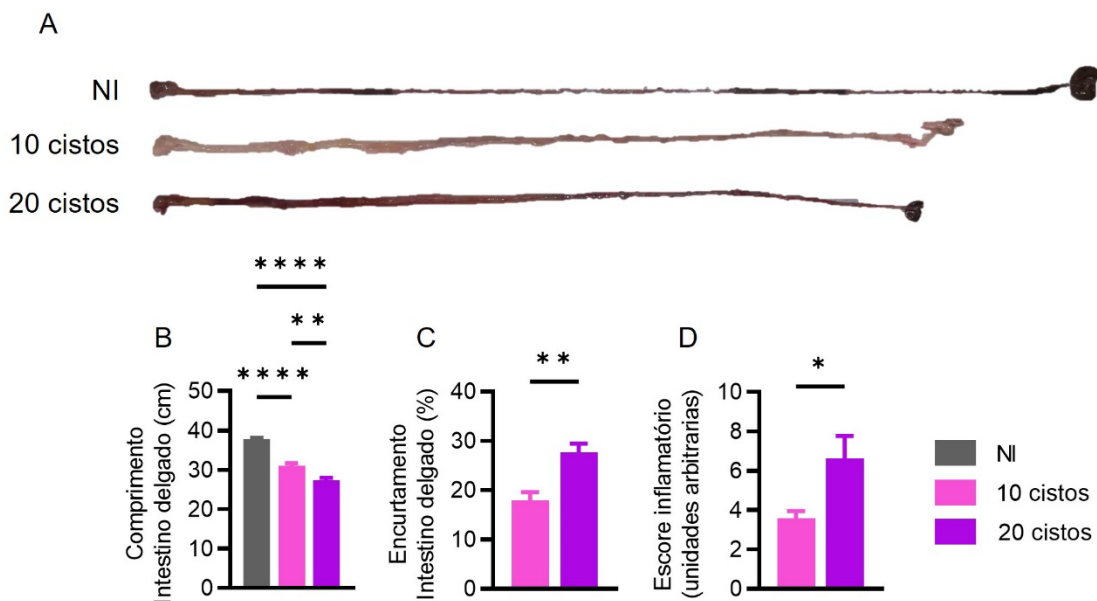
Começando o estudo comparativo entre os dois inóculos de cistos de *T. gondii*, realizamos a avaliação das características clínicas dos animais infectados no decorrer de 30 dias. Sobre a sobrevivência para ambos os grupos experimentais, esta foi diminuindo ao longo dos 30 dias após a infecção sem diferença estatística (Fig. 2A). Porém observamos que a mortalidade é maior e rápida nos animais inoculados com 20 cistos. Quando usamos o inóculo de 20 cistos, camundongos C57BL/6 apresentaram uma perda de peso significativa, especialmente entre os dias 26 e 30 comparado com o grupo infectado com 10 cistos (Fig. 2B). O escore de morbidade mostra o agravamento da doença ao longo dos 30 dias após a infecção (Fig. 2C). Observamos que entre os dias 9 e 15 após a infecção houve diferença significativa entre os grupos experimentais (dia 9  $p=0,0001$ ; dia 12  $p=0,0104$ ; dia 15  $p=0,0097$ ), sendo que os camundongos infectados com 20 cistos mostraram piora das características clínicas comparado com os camundongos infectados com 10 cistos.



**Figura 2. Características clínicas de animais infectados com duas doses de cistos de *T. gondii*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 e 20 cistos da cepa ME-49 por via oral, e mantidos por 30 dias sendo monitorados diariamente para as seguintes análises: A) taxa de sobrevivência, B) perda de peso e C) escore de morbidade. Existe um agravamento dos aspectos clínicos nos animais infectados com a dose maior de cistos. A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste de Kaplan-Meier; a perda de peso e escore de morbidade por *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ . Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

#### 4.2 Relação do inóculo de cistos e a redução do comprimento do intestino delgado em camundongos C57BL/6

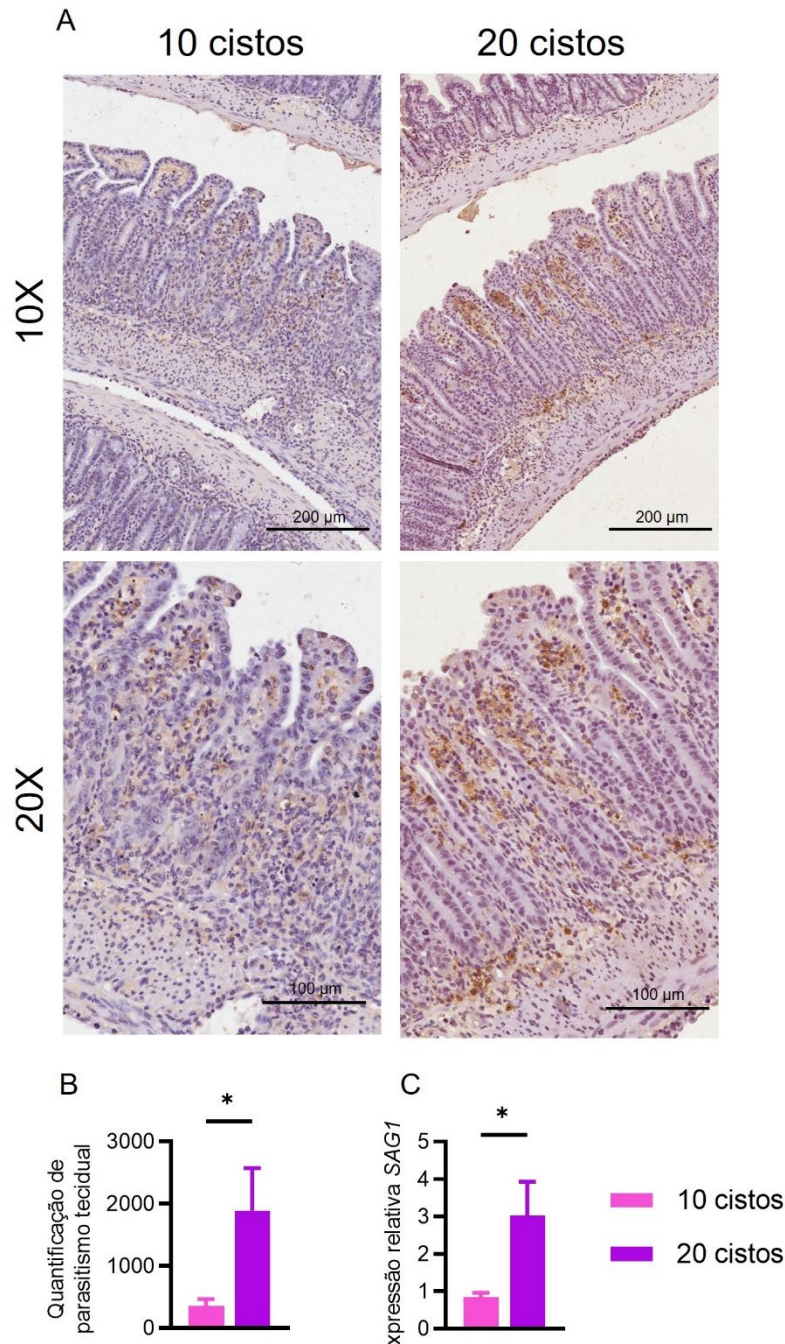
Continuando com a avaliação, camundongos C57BL/6 infectados com 10 ou 20 cistos após 8 dias de infecção foram eutanasiados e o intestino delgado foi coletado para avaliar o comprimento entre os grupos experimentais e o grupo não infectado. Observamos que o comprimento médio do intestino delgado do grupo não infectado (37,75 cm) é maior ao ser comparado com os grupos experimentais infectados com 10 e 20 cistos (31 e 27,3 cm respectivamente) (Fig. 3A-B). Além disso, observou-se uma diminuição de 17,88% e 27,68% do comprimento do intestino delgado para os grupos infectados com 10 e 20 cistos respectivamente (Fig. 3C). Com isto, podemos confirmar que a infecção por *T. gondii* altera o tamanho do intestino delgado de camundongos C57BL/6 sendo que o encurtamento é maior com um inóculo maior. Quando se avaliou a inflamação do intestino delgado, foram observados infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, sendo estes mais graves nos animais infectados com 20 cistos (Fig. 3D).



**Figura 3. Avaliação do comprimento e escore inflamatório do intestino delgado em camundongos infectados com cistos de *T. gondii*.** Após os 8 dias de infecção por via oral com 10 e 20 cistos da cepa ME-49, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram analisados. A) Imagens macroscópicas de intestinos delgados dos grupos não infectados (NI) e dos grupos infectados com 10 e 20 cistos. B) O comprimento e C) encurtamento dos órgãos mostram uma redução à medida que aumenta o número de cistos. D) O escore inflamatório foi realizado após o processamento histológico do intestino delgado. Observou-se um aumento significativo dos aspectos inflamatórios no grupo infectados com 20 cistos. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para análise estatística do comprimento do órgão e o teste *t* não pareado para a porcentagem de encurtamento e escore inflamatório. Os dados são representativos de dois experimentos independentes de cinco animais por grupo e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ .

### **4.3 Grau de parasitismo e inflamação nos animais infectados com 10 ou 20 cistos de *T. gondii***

Posteriormente, os órgãos coletados foram processados para as análises histológicas e moleculares. O parasitismo no intestino delgado dos grupos experimentais foi avaliado pela quantificação do parasito nos quatro segmentos do órgão e análises da expressão do mRNA do gene *SAG1*, uma proteína de superfície de *T. gondii*. Mediante a quantificação do parasitismo tecidual, foi observado que o grupo infectado com 10 cistos apresentou uma menor quantidade de parasitos no intestino delgado, sendo cinco vezes maior no grupo de animais infectados com o inóculo de 20 cistos (Fig. 4A, C). Seguindo a mesma tendência, a expressão de *SAG1* nos animais infectados com 20 cistos apresentou o triplo de expressão do mRNA comparado com o grupo infectado com 10 cistos. (Fig. 4B).



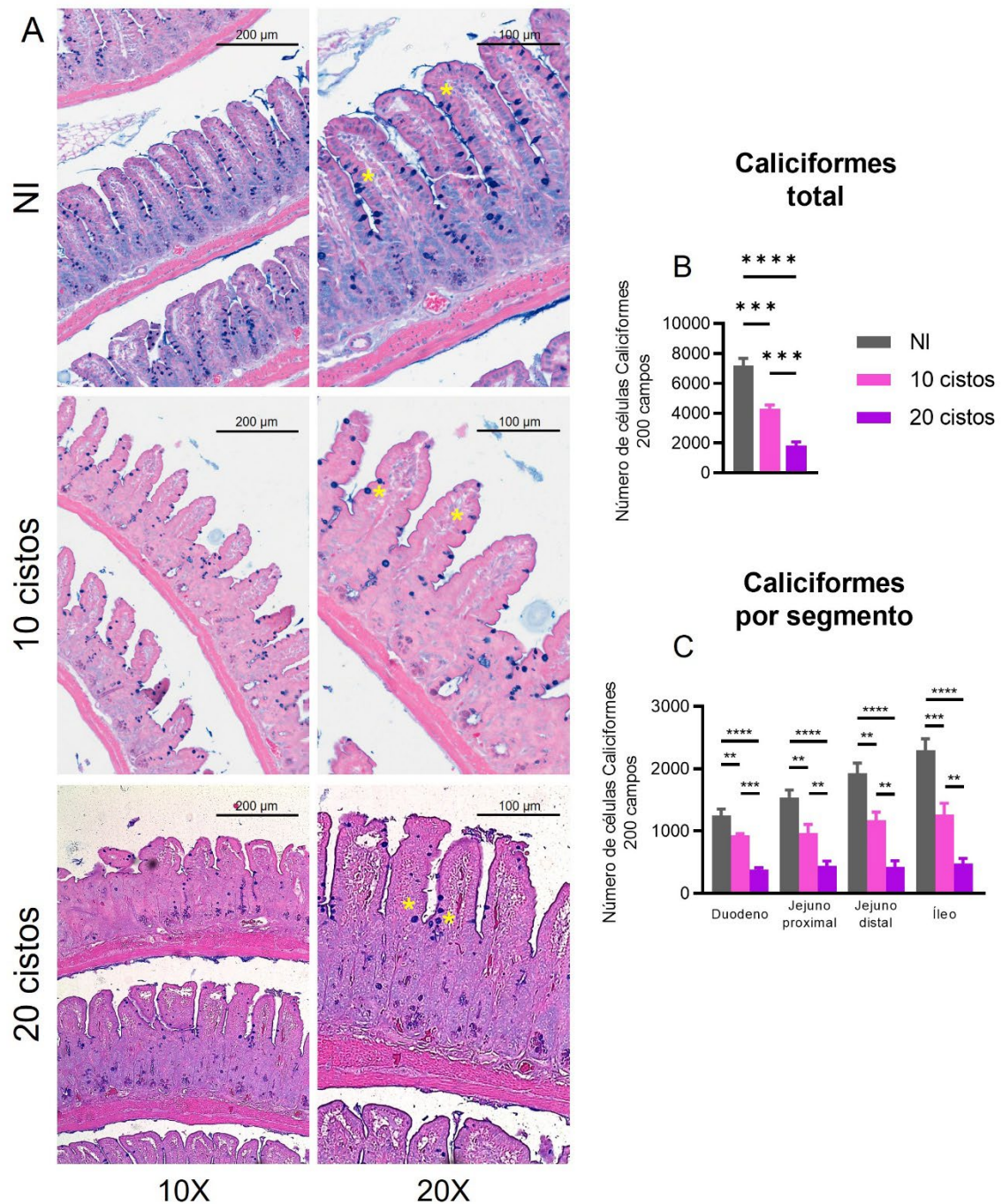
**Figura 4. Análise da expressão do mRNA de *SAG1* e quantificação total de parasitos no intestino delgado de animais infectados por via oral com *T. gondii*.** Utilizando duas doses de cistos da cepa ME-49, camundongos C57BL/6 foram infectados por via oral. Após 8 dias de infecção, a coleta do órgão foi realizada para posterior processamento histológico e molecular. A) Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado representativas de áreas altamente parasitadas. As duas imagens superiores estão com aumento de 10X, enquanto as duas inferiores estão com aumento de 20X. B) A quantificação tecidual no órgão inteiro e C) a expressão de mRNA de *SAG1* se corroboram entre si mostrando aumento da parasitemia com a dose maior de cistos. Os níveis de mRNA de *SAG1* foram analisados por qPCR em fragmentos de íleo. Os dados foram normalizados com o gene *GAPDH*. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. O teste *t* não pareado foi usado para as análises estatísticas. \*  $p < 0,05$ . Escala de barra: 200 e 100  $\mu$ m.



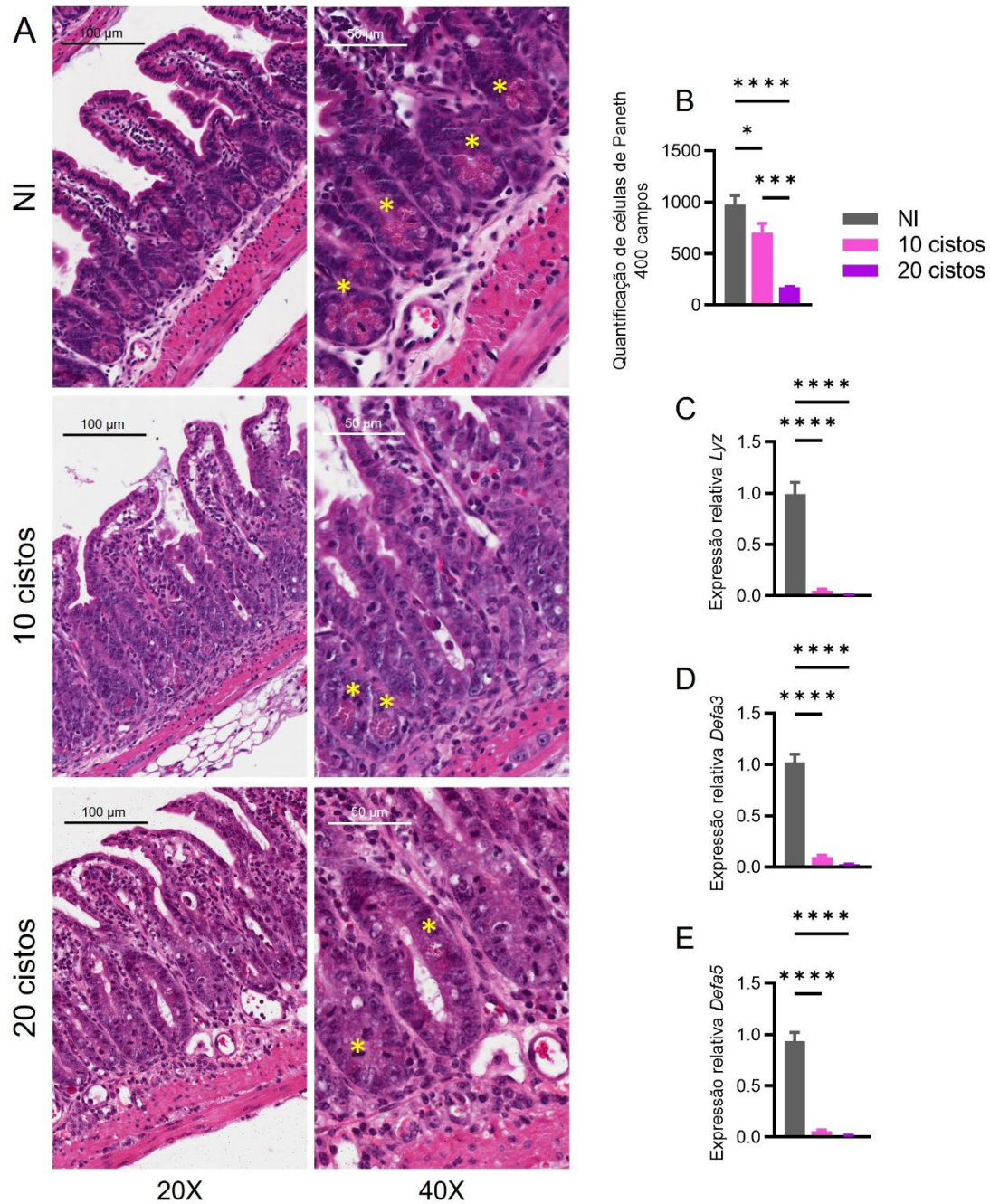
#### **4.4 Células caliciformes e de Paneth são reduzidas com o aumento do inóculo de cistos de *T. gondii***

A seguir, realizamos a contagem das células caliciformes, produtoras de muco e que formam parte da arquitetura do epitélio intestinal, onde a infecção por *T. gondii* diminui a quantidade destas células. Foi observado uma redução significativa deste grupo celular nos animais infectados com o inóculo de 20 cistos (Fig. 5A-B). O decréscimo das células caliciformes é observado em cada segmento do intestino delgado com a mesma tendência: o inóculo de 20 cistos produz uma diminuição relevante no número de células caliciformes (Fig. 5C).

As células de Paneth são outro grupo celular característico do intestino, localizadas nas criptas intestinais. Tais células são produtoras de peptídeos antimicrobianos, entre eles, lisozima, defensina 3 e defensina 5. O grupo celular foi quantificado e observou-se uma diminuição do número de células em ambos os grupos experimentais ao ser comparados com o grupo não infectado (Fig. 6A-B). Com uma tendência similar, a expressão dos mRNAs dos peptídeos antimicrobianos decrescem significativamente pela infecção com cistos de *T. gondii* ao comparar com o grupo não infectado (Fig. 6C-E). Com todos estes dados, podemos dizer que há uma redução maior das células caliciformes e de Paneth na infecção por *T. gondii* usando o inóculo de 20 cistos.



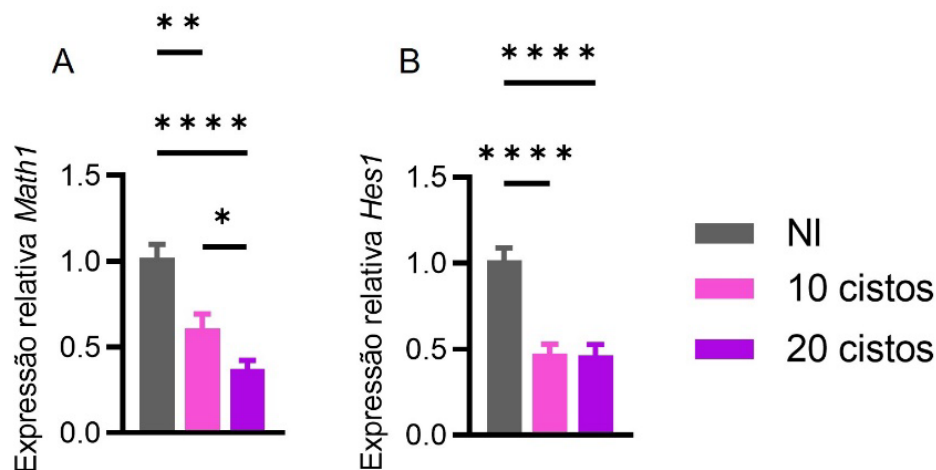
**Figura 5. Contagem de células caliciformes no intestino delgado de animais infectados com *T. gondii*.** Utilizando duas doses de cistos da cepa ME-49, camundongos C57BL/6 foram infectados por via oral. Após 8 dias de infecção, a coleta do órgão foi realizada para posterior processamento histológico e contagem das células caliciformes pela coloração de Alcian blue. A) Fotomicrografias representativas de células caliciformes de cortes histológicos do intestino delgado de camundongos infectados e NI usando 10X e 20X de aumento. Asteriscos em amarelo indicam a presença de células caliciformes. B) Contagem total de células caliciformes em 200 campos por animal e C) contagem em cada porção do órgão: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes tendo cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ . Escala de barra: 200 e 100  $\mu$ m.



**Figura 6. Quantificação das células de Paneth e dos mRNAs dos peptídeos antimicrobianos no intestino delgado de camundongos C57BL/6 comparando dois inóculos de *T. gondii*.** Utilizando 10 e 20 cistos da cepa ME-49, camundongos C57BL/6 foram infectados por via oral. Após 8 dias de infecção, a coleta do órgão foi realizada para posterior processamento histológico e contagem das células de Paneth pela coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E). A) Fotomicrografias representativas das células de Paneth localizadas na base das criptas do intestino delgado usando aumento de 20X e 40X. Asteriscos em amarelo indicando as células de Paneth e seus grânulos. B) Quantificação das células de Paneth pela coloração por H&E. Os níveis de expressão de (C) lisozima 1 (*Lyz1*), (D) defensina 3 (*Defa3*) e (E) defensina 5 (*Defa5*) foram analisados por qPCR em fragmentos de íleo. Os níveis de mRNA foram normalizados com o gene GAPDH. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ . Escala de barra: 100 e 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 Marcadores de transcrição relacionados com a homeostase intestinal e diferenciação celular no intestino delgado são alterados pela infecção por *T. gondii*

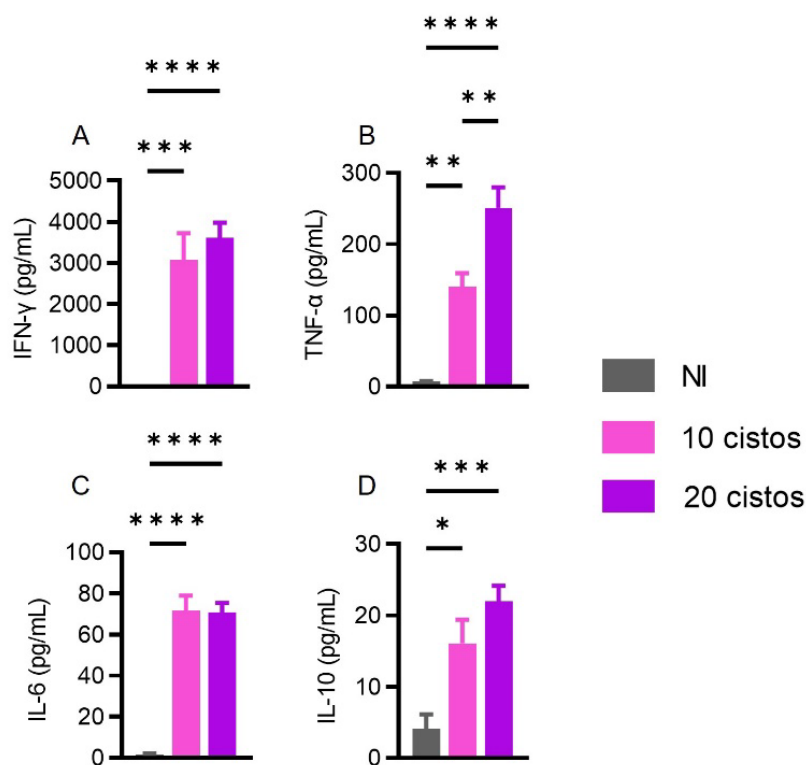
Os marcadores de transcrição *Math1* e *Hes1* estão relacionados com a diferenciação de células tronco intestinais para células secretórias e não secretórias respectivamente e o equilíbrio da mucosa intestinal (YANG *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2018). Mediante a técnica de qPCR, observamos que os níveis de transcrição do mRNA de ambos os genes diminuem na presença da infecção por *T. gondii* ao ser comparados com o grupo não infectado. Analisando separadamente, a expressão de *Math1* é menor no intestino delgado de animais infectados com 20 cistos em relação ao grupo de animais infectados com 10 cistos (Fig. 7A). Já a expressão de *Hes1* em ambos os grupos infectados é bastante similar, sendo menores que o grupo não infectado (Fig. 7B). Com estes dados podemos dizer que há uma alteração relevante da homeostase intestinal pela infecção com *T. gondii* e poderia estar relacionado com a redução de células do perfil secretório no epitélio intestinal.



**Figura 7. Marcadores representativos de células secretoras (*Math1*) e enterócitos (*Hes1*) no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com dois inóculos de cistos de *T. gondii*.** Utilizando 10 e 20 cistos da cepa ME-49, camundongos C57BL/6 foram infectados por via oral. Após 8 dias de infecção, a coleta do órgão foi realizada para posterior extração de RNA, confeição de cDNA e qPCR. A quantificação da expressão relativa do mRNA de A) *Math1* e B) *Hes1* foi normalizado com o gene GAPDH. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Resposta inflamatória sistêmica na infecção por *T. gondii* usando dois inóculos diferentes de cistos

Amostras de soro dos grupos estudados foram analisadas para determinar a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na infecção por *T. gondii*. As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 aumentaram significativamente nos grupos infectados. Em relação às citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6, a dosagem foi similar entre os grupos experimentais de 10 e 20 cistos (Fig. 8A). A concentração da citocina TNF- $\alpha$  foi maior no grupo infectado com 20 cistos em comparação com o grupo de animais infectados com 10 cistos (Fig. 8B).



**Figura 8. Avaliação dos mediadores inflamatórios sistêmicos em camundongos C57BL/6 infectados com 10 e 20 cistos de *T. gondii*.** Utilizando dois inóculos da cepa ME-49, camundongos C57BL/6 foram infectados por via oral e após 8 dias de infecção, as amostras de soro foram coletadas para dosagem das citocinas pró-inflamatórias A) IFN- $\gamma$  - B) TNF- $\alpha$ , e das anti-inflamatórias C) IL-6 - D) IL-10 usando o kit CBA. Os dados são expressos como pg/mL e as concentrações foram obtidas de acordo com a curva padrão de cada citocina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com pelo menos cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ .

Com uma tendência similar, a citocina anti-inflamatória IL-10, aumentou significativamente em ambos os grupos experimentais, porém, os valores das concentrações são menores se comparamos com as citocinas pró-inflamatórias (Fig. 8C-D). Adicionalmente, IL-6 teve concentrações similares em ambos os inóculos (Fig. 8C). Estes dados mostram que o

inóculo de 20 cistos induz uma resposta pro-inflamatória elevada nos camundongos pela presença de TNF- $\alpha$  e de IFN- $\gamma$ ; e que a produção de IL-10 é insuficiente para controlar a inflamação nos animais, embora as concentrações sejam maiores comparando com o grupo não infectado.

## 5 DISCUSSÃO

O protozoário *T. gondii* e a toxoplasmose vem sendo amplamente estudados pelo uso de diversas metodologias, desde o uso de cultura de células até modelos *in vivo*, passando pela utilização de organoides (BETANCOURT *et al.*, 2019). A diversidade de trabalhos usando metodologias de infecção com diferentes inóculos do parasito e cepas diferentes contribui com o nosso entendimento da doença (LIESENFELD *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 2000; GREGG *et al.*, 2013; HEIMESAAT; DUNAY; BERESWILL, 2019; ARAUJO *et al.*, 2022; BRICEÑO *et al.*, 2022). Porém ainda existem lacunas para compreender como a infecção por *T. gondii* altera o intestino delgado do ponto de vista histológico e molecular comparando inóculos diferentes de cistos.

Em nosso estudo, avaliando a mortalidade dos animais infectados, observamos que existe um agravamento significativo da doença com o aumento da dose de cistos; começando o decesso no nono e sexto dia após infecção para os grupos com 10 e 20 cistos respectivamente. Camundongos C57BL/6 são uma linhagem de animais suscetíveis ao parasito *T. gondii*, observando-se que após o sexto dia de infecção com 100 cistos da cepa ME-49 por via oral, começa a mortalidade desses animais (LIESENFELD *et al.*, 1996; LIESENFELD *et al.*, 1999). Em outro estudo, animais C57BL/6 infectados por via oral com 20 cistos da cepa ME-49 começaram a perecer a partir o décimo dia de infecção (SUZUKI *et al.*, 2000). Já Muñoz e colaboradores (2009), aplicando um modelo de infecção com 100 cistos, observaram que a mortalidade começou no oitavo dia após infecção. Trabalhos do nosso grupo descrevem que animais infectados com 10 cistos começam a mortalidade a partir do décimo dia após infecção (ARAUJO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2022).

De acordo com os dados encontrados na literatura juntamente com os nossos, deve-se levar em consideração diferenças experimentais, tais como as condições em que os animais foram cuidados nos respectivos biotérios e as condições em que foram realizados os processos de obtenção de cistos (HEIMESAAT; DUNAY; BERESWILL, 2019). Contudo, os trabalhos publicados pelo nosso grupo junto com este estudo mostram que as condições e o local de desenvolvimento dos experimentos são relevantes para obter uma constância dos resultados (ARAUJO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2022).

Nossos dados descrevem que os camundongos infectados com ambos inóculos tiveram uma perda de peso de 10% aproximadamente, e o intestino delgado também teve uma redução de 13% até 27% no oitavo dia de infecção. Trabalhos utilizando uma elevada dose de cistos descrevem perda de peso de 20% e redução do intestino delgado de mais de 20% (MUÑOZ *et al.*, 2009; VON KLITZING *et al.*, 2017). Trabalhos mais recentes usando 10 e 20 cistos como inóculo de infecção demonstram que o tamanho do intestino delgado diminui com o aumento da quantidade de cistos observando uma redução ou encurtamento de 8% em animais infectados com 10 cistos (ARAUJO *et al.*, 2022) e 18% para 20 cistos (BRICEÑO *et al.*, 2022) concordando com os dados mostrados neste estudo.

A avaliação da inflamação do intestino delgado em camundongos infectados por *T. gondii* é descrita em diversos estudos. Suzuki e colaboradores (2000) descrevem que animais C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa ME-49 não apresentaram necroses no intestino delgado. Modelos experimentais usando inóculos elevados de cistos após 8 dias de infecção apresentam uma grave inflamação e necroses no intestino delgado (MUÑOZ *et al.*, 2009; VON KLITZING *et al.*, 2017). Estudos propõem a infecção por via oral usando uma baixa dose de cistos para o estudo da toxoplasmose em camundongos (DUNAY *et al.*, 2008; HEIMESAAT *et al.*, 2018; HEIMESAAT; DUNAY; BERESWILL, 2019). Estes trabalhos citados descrevem uma inflamação média-moderada na mucosa intestinal com características de infiltração celular e destruição dos vilos intestinais em camundongos C57BL/6 (DUNAY *et al.*, 2008; HEIMESAAT *et al.*, 2018; HEIMESAAT; DUNAY; BERESWILL, 2019).

Neste trabalho, o aumento da inflamação pela infecção com *T. gondii* usando 10 e 20 cistos está correlacionado com o aumento do parasitismo tecidual e a expressão de *SAG1* como era esperado. Alguns estudos descrevem que na infecção oral com 10 cistos de *T. gondii*, o intestino delgado de camundongos C57BL/6 apresentam infiltração celular inflamatória intensa, além de diminuição do tamanho dos vilos e necrose (OLIVEIRA *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2022).

Estudos anteriores demonstram que a infecção experimental por *T. gondii* reduz o número de células caliciformes (SCHNEIDER *et al.*, 2018; ARAUJO *et al.*, 2020; BRICENO *et al.*, 2022) e praticamente elimina ou diminui bastante as células de Paneth (RAETZ *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2021). Como era esperado, no presente trabalho observamos uma diminuição de células caliciformes e, uma redução substancial no número de células de Paneth e de seus peptídeos antimicrobianos, na medida que o inóculo de cistos aumenta na infecção experimental.

A diferenciação de células tronco intestinais a células secretórias e epiteliais, e a homeostase da arquitetura do epitélio intestinal associam-se com os níveis de expressão dos genes *Hes1* e *Math1* (YANG *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2018). Ambos os genes formam parte e são regulados pela via de sinalização Notch, sendo que a via leva à ativação de *Hes1*, enquanto a expressão de *Math1* é suprimida por *Hes1* (JENSEN *et al.*, 2000; NOAH, SHROYER, 2013). Os dois genes interagem diretamente entre eles, assim o aumento da expressão de *Math1* favorece o número de células secretoras como as células caliciformes e de Paneth; já em camundongos com mutações no gene *Math1* há uma ausência de células secretoras, mas persistem as células de absorção (YANG *et al.*, 2001). Guo e colaboradores (2018) ressaltam que camundongos com mutação no gene *Hes1* apresentam disbiose intestinal e perturbação da homeostase no epitélio intestinal.

Em nossos resultados prévios, observamos que a infecção por *T. gondii* interfere diretamente na expressão de *Math1* e *Hes1* o que está relacionado com a perda de células caliciformes, de Paneth e como consequência, a perda da homeostase do intestino delgado refletido na elevada inflamação no órgão. Pontualmente, sobre a expressão de *Math1* nos animais infectados com 10 cistos, podemos observar que a expressão é maior quando comparado com o grupo infectado com 20 cistos. Isto pode estar relacionado com as células caliciformes e de Paneth presentes nesse grupo de animais, que embora deram uma contagem menor que o grupo controle, foram maiores em número ao ser comparados com o grupo infectado com 20 cistos. Contudo, a infecção por *T. gondii* desregula a expressão dos genes *Math1* e *Hes1* que auxiliam no equilíbrio e diferenciação de células intestinais.

As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 estão relacionados com o controle do parasitismo na infecção por *T. gondii* e envolvendo uma forte resposta imune de tipo Th1 (DECKERT-SCHLÜTER *et al.*, 1998; JEBBARI *et al.*, 1998; VILLERET *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2021). Sem dúvida, a alta produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  está relacionada com o desenvolvimento de lesões e necrose no intestino delgado (LIESENFELD *et al.*, 1999; MUÑOZ *et al.*, 2009), e IL-10 juntamente com IL-6 são necessárias para prevenir uma exacerbada patologia intestinal e diminuir a mortalidade de camundongos infectados com *T. gondii* (JEBBARI *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2000). Considerando esse cenário, as altas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em nossos resultados estão relacionadas com a inflamação no intestino delgado dos grupos infectados. Adicionalmente, TNF- $\alpha$  pode estar contribuindo com a maior mortalidade devido às alterações histológicas no grupo de animais infectados com 20 cistos ao ser comparado com o grupo infectado com 10 cistos onde a concentração da citocina é menor (250,952 pg/mL vs.



139,88 pg/mL). Por outro lado, a presença de IL-10 no grupo de animais infectados com 10 cistos pode estar envolvida na menor inflamação no intestino delgado, apesar de ainda ser evidente.

Neste trabalho no qual comparamos e estudamos as diferenças na infecção por *T. gondii* utilizando dois inóculos diferentes, encontramos que o agravamento da doença aumenta com a dose de cistos. Células secretoras de muco e peptídeos antimicrobianos do intestino delgado vão diminuindo em número levando a menor proteção do epitélio e consequente aumento do parasitismo. Este cenário é auxiliado pela alta resposta de tipo Th1 com a produção de citocinas pro-inflamatórias.

## 6 CONCLUSÕES

Quanto maior a carga parasitária utilizada para infecção experimental de camundongos suscetíveis C57BL/6, maior será a inflamação e parasitismo intestinal.

A infecção por via oral com *T. gondii* induz uma diminuição de células caliciformes produtoras de muco que é protetor, assim como de células de Paneth, especializadas em produção de peptídeos antimicrobianos, prejudicando o controle do parasitismo tecidual.

Quanto maior o inóculo do parasito, maior é a depleção de células caliciformes e de Paneth, refletindo em infecção mais grave nesses animais.

Adicionalmente, marcadores moleculares *Math1* e *Hes1*, células secretórias e enterócitos respectivamente, são diminuídos pela infecção oral por *T. gondii*, sendo essa diminuição maior, quanto maior é a carga parasitária infectiva.

A elevada concentração de citocinas pro-inflamatórias favorece a inflamação pela infecção por *T. gondii*; assim os animais inoculados com uma maior carga parasitária têm uma produção de citocinas maior, o que reflete em uma maior inflamação.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEXANDER, D. L. *et al.* Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathogens*, v. 1, p. e17, October 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>

ALLAIRE, J. M. *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, v. 39, p. 677-696, September 2018. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>

ALMEIDA, M. P. O. *et al.* Heme Oxygenase-1 Induction in Human BeWo Trophoblast Cells Decreases *Toxoplasma gondii* Proliferation in Association With the Upregulation of p38 MAPK

Phosphorylation and IL-6 Production. *Frontiers Microbiology*, v. 12, p. 659028, April 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659028>

ARAUJO, A. *et al.* IFN- $\gamma$  mediates Paneth cell death via suppression of mTOR. *eLife*, v. 10, p. e60478, October 2021. <https://doi.org/10.7554/eLife.60478>

ARAUJO, E. C. B. *et al.* Beneficial effects of *Strongyloides venezuelensis* antigen extract in acute experimental toxoplasmosis. *Parasite Immunology*, v. 43, n. 4, p. e12811, April 2020. <https://doi.org/10.1111/pim.12811>

ARAUJO, E. C. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infection Decreases Intestinal 5-Lipoxygenase Expression, while Exogenous LTB4 Controls Parasite Growth. *Infection and Immunity*, v. 90, n. 7, p. e00029-22, June 2022. <https://doi.org/10.1128/iai.00029-22>

AZZOUZ, N. *et al.* *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures. *Glycobiology*, v. 23, p. 106 - 120, January 2013. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws134>

BARENCO, P. V. C. *et al.* *Toxoplasma gondii* 70 kDa Heat Shock Protein: Systemic Detection Is Associated with the Death of the Parasites by the Immune Response and Its Increased Expression in the Brain Is Associated with Parasite Replication. *PLoS ONE*, v. 9, p. e96527, May 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096527>

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial Migration of *Toxoplasma gondii* is Linked to parasite motility and virulence. *Journal of Experimental Medicine*, v. 195, n. 12, p. 1625 - 1633, June 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>

BARTLEY, P. M. *et al.* Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. *Parasitology*, v. 133, p. 421-432, October 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>

BENEVIDES, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* Soluble Tachyzoite Antigen Triggers Protective Mechanisms against Fatal Intestinal Pathology in Oral Infection of C57BL/6 Mice. *PLoS ONE*, v. 8, p. e75138, September 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>

BESTEIRO, S. *et al.* Export of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion. *PLoS Pathogens*, v. 5, p. e1000309, February 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>

BETANCOURT, E. D. *et al.* From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, p. 46, March 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00046>

BICHET, M. *et al.* The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustain parasite invasive force. *BMC Biology*, v. 12, n. 773, p. 1-20, December 2014. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0108-y>

BIERLY, A. L. *et al.* Dendritic Cells Expressing Plasmacytoid Marker PDCA-1 Are Trojan Horses during *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 12, p. 8485-8491, December 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8485>

BRICEÑO, M. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 64, n. 8, p. 459 - 469, August 2016. <https://doi.org/10.1369/0022155416656349>

BRICEÑO, M. P. *et al.* Effects of Notch signaling pathway inhibition by dibenzazepine in acute experimental toxoplasmosis. *Tissue and Cell*, v. 79, p. 101952, December 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101952>

CARRUTHERS, V. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4005 - 4011, July 2000.

<https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4005-4011.2000>

CDC. Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection). Centers of Disease Control and Prevention - CDC, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>. Acesso em: junho 2022.

COHEN, S. B. *et al.* CXCR3-Dependent CD4+ T Cells Are Required to Activate Inflammatory Monocytes for Defense against Intestinal Infection. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 10, p. e1003706, October 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003706>

COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Impact of *Toxoplasma gondii* on Dendritic Cell Subset Function in the Intestinal Mucosa. *The Journal of Immunology*, v. 195, p. 2754-2762, August 2015.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501137>

COOMBES, J. L. *et al.* Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 110, n. 21, p. E1913 - E1922, May 2013.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1220272110>

DECKERT-SCHLUTER, M. *et al.* Crucial Role of TNF Receptor Type 1 (p55), But Not of TNF Receptor Type 2 (p75), in Murine Toxoplasmosis. *The Journal of Immunology*, v. 160, n. 7, p. 3427-3436, April 1998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.7.3427>

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 569-588, October 1998.

<https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.569>

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, July 2012.

<https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 1019 - 1024, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X)

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, p. 267 - 299, April 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUNAY, I. R. *et al.* Gr1+ (Ly6C+) Inflammatory Monocytes are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, v. 29, p. 306-317, August 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.019>

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optimal extra?. *TRENDS in Parasitology*, v. 18, p. 355 - 359, August 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02330-9)

FLIER, L. G. V. D.; CLEVERS, H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, v. 71, p. 241-260, 2009.

<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, v. 167, p. 893 - 896, February 1970.

<https://doi.org/10.1126/science.167.3919.893>

FURTADO, G. C.; CAO, Y.; JOINER, K. A. Laminin on *Toxoplasma gondii* Mediates Parasite Binding to the beta1 Integrin Receptor alpha6beta1 on Human Foreskin Fibroblasts and Chinese Hamster Ovary Cells. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 4925 - 4931, November 1992.

<https://doi.org/10.1128/iai.60.11.4925-4931.1992>

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Parasite-Induced IL-12 Stimulates Early IFN- $\gamma$  Synthesis and Resistance During Acute Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, v. 153, n. 6, p. 2533-2543, September 1994. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.6.2533>

GAZZINELLI, R. T. *et al.* In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, v. 157, n. 2, p. 798-805, July 1996. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.2.798>

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats and men. *Cell Host Microbe*, v. 15, n. 2, p. 132-138, February 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

GREGG, Beth *et al.* Replication and Distribution of *Toxoplasma gondii* in the Small Intestine after Oral Infection with Tissue Cysts. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 5, p. 1635–1643, May 2013.

<https://doi.org/10.1128/IAI.01126-12>

GUO, X-K. *et al.* Epithelial Hes1 maintains gut homeostasis by preventing microbial dysbiosis. *Mucosal Immunology*, v. 11, n. 3, p. 716–726, May 2018. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.111>

HEIMESAAT, M. M. *et al.* Peroral Low-Dose *Toxoplasma gondii* Infection of Human Microbiota-Associated Mice — A Subacute Ileitis Model to Unravel Pathogen–Host Interactions. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 8, n. 2, p. 53-61, April 2018.

<https://doi.org/10.1556/1886.2018.00005>

HEIMESAAT, M. M.; DUNAY, I. R.; BERESWILL, S. Comprehensive Kinetic Survey of Intestinal, Extra-intestinal and Systemic Sequelae of Murine Ileitis Following Peoral low-dose *Toxoplasma gondii* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, p. 98, April 2019.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00098>

JEBBARI, H. *et al.* A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 5, p. 231-239, May 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>

JENSEN, J. *et al.* Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genetics*, v. 24, n. 1, p. 36 - 44, January 2000. <https://doi.org/10.1038/71657>

JONES, E. J.; KORCSMAROS, T.; CARDING, S. R. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue barriers*, v. 5, p. e1273865, 2017.

<https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1273865>

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 10 - 25, March 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

KAUR, K. *et al.* Mucus mediated protection against acute colitis in adiponectin deficient mice. *Journal of Inflammation*, v. 12, p. 35, April 2015. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0079-y>

KHAN, I. A. *et al.* A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, p. 13955-13960, December 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13955>

LAMBERT, H. *et al.* Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1611 - 1623, October 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x>

LIESENFELD, O. *et al.* Association of CD4+ T Cell-dependent, Interferon-gamma-mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 597-607, August 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.597>

LIESENFELD, O. *et al.* TNF- $\alpha$ , nitric oxide and IFN- $\gamma$  are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, v. 21, n. 7, p. 365-376, January 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>

MENDEZ, O. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathogens*, v. 13, p. e1006351, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>

MENNECHET, F. J. D. *et al.* Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *The Journal of Immunology*, v. 186, p. 2988-2996, March 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2988>

MONTOYA, J. G.; LIENSENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, v. 363, p. 1965 - 1976, June 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MÜLLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 1297-1307, June 2005. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5034-2>

MUÑOZ, M. *et al.* Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 206, p. 3047-3059, October 2009. <https://doi.org/10.1084/jem.20090900>

NOAH, T. K.; SHROYER, N. F. Notch in the Intestine: Regulation of Homeostasis and Pathogenesis. *Annual Review of Physiology*, v. 75, p. 263 - 288, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183741>

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 49, n. 5, p. e338, May 2017. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.20>

OLIVEIRA, M. C. *et al.* The Availability of Iron Is Involved in the Murine Experimental *Toxoplasma gondii* Infection Outcome. *Microorganisms*, v. 8, n. 4, p. 560, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040560>

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, n. 1, p. 8-20, July 2014. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

RACHINEL, N. *et al.* The Induction of Acute Ileitis by a Single Microbial Antigen of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, v. 173, p. 2725-2735, August 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2725>

RAETZ, M. *et al.* Parasite-induced Th1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- $\gamma$ -dependent elimination of Paneth cells. *Nature Immunology*, v. 14, p. 136-142, December 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2508>

RAMÍREZ-FLORES, C. J. *et al.* *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitate tachyzoites paracellular migration. *Cellular Microbiology*, v. 23, n. 3, p. e13283, March 2021. <https://doi.org/10.1111/cmi.13283>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, p. 264 - 296, April 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

SCHNEIDER, Hannah *et al.* Study of mucin turnover in the small intestine by in vivo labeling. *Scientific Reports*, v. 8, n. 5760, April 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24148-x>

SCHNEIDER, L. C. L. *et al.* *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 30, n. 5, p. e13264, May 2018. <https://doi.org/10.1111/nmo.13264>

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology*, v. 116, p. 35 - 42, 1998. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001959>

STAHL, M. *et al.* The Muc2 mucin coats murine Paneth cell granules and facilitates their content release and dispersion. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 315, p. G195-G205, August 2018. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00264.2017>

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J.; WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: The parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, p. 8413-8418, August 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8413>

SUZUKI, Y. *et al.* IL-10 Is Required for Prevention of Necrosis in the Small Intestine and Mortality in Both Genetically Resistant BALB/c and Susceptible C57BL/6 Mice Following Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 10, p. 5375-5382, May 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5375>

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 2000, p. 1217 - 1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

VILLERET, B. *et al.* Blockade of IL-1R signaling diminishes Paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, v. 2, n. 1, p. 107-116, February 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714202/>

VON KLITZING, E. *et al.* Intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of *Toxoplasma gondii* induced acute ileitis in mice harboring a human gut microbiota. PLoS ONE, p. e0176144, April 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176144>

WEIGHT, M. C. *et al.* Elucidating pathways of *Toxoplasma gondii* invasion in the gastrointestinal tract: involvement of the tight junction protein occludin. Microbes and Infection, v. 17, n. 10, p. 698 - 709, October 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.07.001>

YANG, Q. *et al.* Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. Science, v. 294, p. 2155 - 2158, December 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1065718>

## 8 ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da administração oral de bactérias probióticas no controle da Toxoplasmose experimental em camundongos C57BL/6”, protocolo nº 069/19, sob a responsabilidade de **Neide Maria da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – 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), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **13 de Dezembro de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação da administração oral de bactérias probióticas no controle da Toxoplasmose experimental em camundongos C57BL/6”, protocol 069/19, under the responsibility of **Neide Maria da Silva** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 13th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 01/01/2020 Término: 01/10/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> – camundongo <i>Rattus norvegicus</i> -Ratos Wistar
Número de animais	250 camundongos e 5 ratos
Peso / Idade	18-22 g / 8-12 semanas e 200-250 g / 8-12 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 17 de dezembro de 2019.

  
**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU

Coordenador da CEUA

Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019