

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Mecanismos protetores induzidos pelo tratamento prévio com antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados oralmente por *Toxoplasma gondii*

Luciana Alves de Sousa

Uberlândia
Fevereiro – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Mecanismos protetores induzidos pelo tratamento prévio com antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados oralmente por *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Luciana Alves de Sousa
Orientadora: Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia
Fevereiro – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S725m Sousa, Luciana Alves de, 1986-
2013 Mecanismos protetores induzidos pelo tratamento prévio com
 antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) no intestino delgado de
 camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados oralmente por *Toxoplasma*
 gondii / Luciana Alves de Sousa. -- 2013.
 62 p. : il.
- Orientador: Neide Maria da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Citologia - Teses. 3. *Toxoplasma gondii* -
 Teses. I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Federal de Uberlândia.
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

Aos meus avós, Mansueto e Maria Matilde, que me acolheram com muito amor e carinho como se fossem meus pais. Por toda confiança, preocupação e amor incondicional que sempre dedicaram a mim. Obrigada pelo exemplo de humildade, honestidade, companheirismo, caráter. O amor de vocês me guia e me ampara nos momentos mais difíceis. Sou muito grata por ter a oportunidade de ter por perto pessoas de tão boa índole e bom coração. Essa conquista, devo a vocês, meus amores!

À minha tia Nádia por toda dedicação, zelo e carinho. Obrigada por tudo que fez por mim, me considerando como uma filha e me apoiando sempre. Tenho muito orgulho de ter sido criada por você. À você, a minha eterna gratidão.

Seja humilde, e permanecerás íntegro.

Curva-te, e permanecerás ereto.

Esvazia-te, e permanecerás repleto.

Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exhibe, e por isso brilha.

Ele não se faz notar, e por isso é notado.

Ele não se elogia, e por isso tem mérito.

E, porque não está competindo, ninguém no mundo

pode competir com ele.

(Lao Tsé - Tao Te Ching)

Agradecimentos

À força superior que me guia, me protege e me ampara sempre.

*À minha mãe **Luísa** pelo carinho e amor e pelo seu bom humor nas horas mais difíceis. Agradeço por sempre tentar me entender e pelo apoio, mesmo estando distante. Te amo.*

Aos meus tios e tias que sempre estiveram tão próximos de mim, participando da minha vida e acompanhando cada conquista que eu tive. Agradeço pelo companheirismo, e pelo exemplo de família que foram para mim. Adoro vocês! Vocês são muito importantes para mim!

*Ao **Gabriel** por acreditar sempre em mim, pelo amor e companheirismo, por estar sempre comigo vibrando com as minhas vitórias e sofrendo junto comigo com cada angústia que passei durante esses anos de mestrado. Amo você.*

.

*À minha orientadora, **Dra. Neide Maria da Silva**, por estar sempre disposta a ajudar, e por ter estado sempre tão próxima, ajudando na parte experimental e corrigindo minuciosamente os trabalhos. Você é um exemplo de dedicação à pesquisa! Obrigada por guiar os meus passos ao longo desses anos. Você contribuiu muito para minha formação, me ensinando a ser uma pessoa criteriosa e determinada. Agradeço muito por tudo.*

*À **Alexsandra** pelo seu bom humor sempre, pelas conversas engraçadas, pela companhia e ajuda nos experimentos aos finais de semana e madrugadas (risos),*

pelo apoio e por ter sido tão paciente e desprendida. Obrigada pela compreensão e por toda ajuda que me deu no “nosso” trabalho. Nós trabalhamos muito bem juntas! Você foi fundamental na realização deste trabalho. Adoro você!

*À **Ester**, pela ajuda no trabalho, por ter me ensinado pacientemente várias práticas do laboratório, como a tarefa de enrolar os intestinos, sempre com paciência e dedicação. Obrigada pela boa convivência, por ouvir meus desabafos e minhas angústias e pelos conselhos que sempre me deu.*

*Aos meus colegas do grupo de pesquisa, **Karine, Layane, Loyane, Mário, Paulo Victor, Poliana, Rômulo** pela boa convivência e por estarem sempre dispostos a ajudar.*

*Aos meninos do BIC Júnior, **Túlio e Letícia**, que contribuíram muito para esse trabalho. Ajudaram bastante no processamento do material, e apesar da pouca idade, mostraram ser bastante competentes. Acho que essa etapa de convivência no laboratório foi fundamental para o crescimento deles.*

Ao pessoal do laboratório, por fazerem da Histologia um ambiente agradável de trabalho!

*Aos funcionários do laboratório, **Eliete, Fabrício, Ester, Juscélia, Mariani**, pela ajuda e boa convivência!*

*A **CAPES, FAPEMIG e CNPq**, pelo apoio financeiro.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Parasitismo tecidual no intestino delgado, pulmão , fígado e baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*.....28
- Figura 2.** Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....29
- Figura 3.** Fotomicrografias representativas do pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. 30
- Figura 4.** Fotomicrografias representativas do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. 31
- Figura 5.** Escore inflamatório no intestino delgado, pulmão, e fígado de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*.....32
- Figura 6.** Número de células caliciformes presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....33
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c não infectados e de animais pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....34
- Figura 8.** Número de células positivas para IgA presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....35
- Figura 9.** Número de células de Paneth presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....37
- Figura 10.** Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c não infectados e de camundongos pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....38
- Figura 11.** Expressão de criptidina-5 representadas pela quantidade de células de Paneth positivas para criptidina-5 e intensidade de fluorescência no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. 39

Figura 12. Fotomicrografias representativas da expressão de criptidina-5 no intestino delgado de C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. 40

Figura 13. Expressão de células positivas para presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.....41

Figura 14. Fotomicrografias representativas da expressão PCNA no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6.....42

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2. Ciclo de vida do parasito	14
1.3. Toxoplasmose.....	15
1.4. Resposta imune intestinal ao parasito.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Animais experimentais e organismos infecciosos.....	20
4.2. Preparação do STAg e tratamento prévio dos animais	21
4.3. Infecção experimental, coleta e processamento tecidual	21
4.4. Coloração pela Hematoxilina-eosina (HE) para determinação das alterações histológicas nos tecidos, bem como para quantificação de células de Paneth no intestino delgado	22
4.5. Análise histológica	22
4.6. Coloração por Alcian Blue para quantificação das células caliciformes no intestino delgado	23
4.7. Reação de imunohistoquímica para detecção de <i>T. gondii</i> nos órgãos periféricos	23
4.8. Reação de imunohistoquímica para detecção de células positivas para IgA no intestino delgado	24
4.9. Reação de imunohistoquímica para detecção de proliferação celular no intestino delgado	25
4.10. Reação de imunohistoquímica para detecção de criptidina 5 no intestino delgado ...	25
4. 11. Análises estatísticas.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Parasitismo tecidual nos órgãos periféricos de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T.gondii</i>	26

5.2. Análise histológica dos órgãos periféricos de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T.gondii</i>	28
5.3. Quantificação de células caliciformes no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T.gondii</i>	31
5.4. Quantificação de células positivas para IgA no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T.gondii</i>	33
5.5. Quantificação de células de Paneth e criptidina-5 no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T. gondii</i>	35
5.6. Análise da proliferação celular no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com <i>T.gondii</i>	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS	50
9. ANEXO I.....	62

RESUMO

T.gondii infecta a mucosa intestinal invadindo diretamente as células epiteliais do intestino delgado e essas células podem responder diretamente a infecção promovendo uma resposta imune local. Camundongos C57BL/6 infectados oralmente com alta carga parasitária de *T.gondii* são altamente susceptíveis, apresentando uma ileíte letal. Recentemente foi verificado que o tratamento prévio com antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) protege camundongos C57BL/6 contra patologia intestinal causada pela infecção por *T.gondii*. Com o intuito de verificar os mecanismos induzidos por STAg no intestino delgado frente a infecção por via oral com *T. gondii*, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com STAg 48 horas antes da infecção por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e sacrificados aos 8 dias após a infecção. O tratamento prévio com STAg foi capaz de diminuir o parasitismo e patologia em órgãos periféricos de animais BALB/c e C57BL/6, além de induzir um aumento na quantidade de células caliciformes, células positivas para IgA, células de Paneth e maior expressão de criptidina no intestino delgado de ambas as linhagens, além disso os animais BALB/c apresentaram maior quantidade dessas células em comparação com os animais C57BL/6. Os resultados sugerem que STAg é capaz de promover mecanismos protetores nas duas linhagens de animais, porém essa proteção é mais evidenciada nos animais BALB/c, e esses mecanismos podem, em parte, ser mediados pelo aumento de células caliciformes, células de Paneth e secreção local de IgA no intestino delgado de camundongos infectados oralmente por *T.gondii*.

Palavras-chave: Células caliciformes, Células de Paneth, Criptidina, IgA, STAg, *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

T. gondii can infect the gut mucosa by direct invasion of epithelial cells in the small intestine and these cells may respond directly to infection promoting a local immune response. C57BL/6 mice orally infected with a high parasitic load of *T.gondii* are highly susceptible, presenting a lethal ileitis. Recently, it was demonstrated that pretreatment with STAg protects C57BL/6 mice against intestinal pathology in oral *T. gondii* infection. To investigate the mechanisms induced by STAg in the small intestine in oral *T.gondii* infection, BALB/c and C57BL/6 mice were treated with STAg 48 hours before oral infection with 30 ME-49 cysts and sacrificed at 8 days of infection. Previous treatment with STAg were able of decrease parasitism and pathology in peripheral organs of BALB/c and C57BL/6 mice and induced a increase in amounts of goblet cells, IgA positive cells, Paneth cells and expression of cryptidin in the small intestine of both lineages of mice, moreover BALB/c mice presented higher amount of these cells comparing with C57BL/6 mice. The results suggests that STAg is able of promoting protective mechanisms in both lineages of mice, although these protection is more evidenced in BALB/c mice, and these mechanisms could be in part mediated by increase in goblet, Paneth and local secretion of IgA in the small intestine of mice orally infected with *T.gondii*.

Keywords: Cryptidin, Goblet cells, IgA, Paneth cells, STAg, *Toxoplasma gondii*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, sub-ordem Eimeriina, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.*, 1980).

O parasito foi encontrado primeiramente em 1908 no roedor *Ctenodactylus gundi* na Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 1908), e no mesmo ano foi encontrado em coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil (SPLENDORE, 1908). *T. gondii* possui uma distribuição geográfica mundial e pode infectar a maioria, senão todas, espécies de animais homeotérmicos, incluindo o homem (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAATET, 2011).

Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam características comuns, como a presença de um complexo apical de estruturas de citoesqueleto especializadas, além de organelas peculiares, tais como roptrias e micronemas, que são organelas secretoras responsáveis pela mobilidade do parasito, adesão e invasão da célula hospedeira (CARRUTHERS, 1999; MORRISSETE; SIBLEY, 2002).

Morfológicamente o parasito apresenta três estágios infecciosos: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (DUBEY, 2004; KAWAZOE, 2005). Os taquizoítas (do grego *tachys* = rápido; em grupos ou clones), são as formas que apresentam uma rápida proliferação na célula hospedeira, ocorrendo principalmente na fase aguda de infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TENTER, 2009). Os bradizoítas (do grego *brady* = lento, em cistos teciduais), são as formas de resistência ao sistema imune dos hospedeiros e devido à pressão imposta pela resposta imune encontra-se dentro de cistos sob replicação lenta na fase crônica de infecção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Os esporozoítas (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos) correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). São encontrados no ambiente podendo contaminar água, solos e alimentos (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

A transmissão de *T. gondii* ocorre principalmente por via oral, sendo esta a via natural de infecção deste parasito. A infecção ocorre principalmente por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos do parasito ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos liberados nas fezes dos felídeos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ALIBERTI, 2005). Outra via de infecção é a congênita, que pode ocorrer quando a mulher é infectada durante a gestação ou por reativação de infecção latente. A transmissão

também pode ocorrer através de transplantes de órgãos de doadores soropositivos ou raramente por transfusão sanguínea ou acidente laboratorial (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ELMORE *et al.*, 2010)

1.2. Ciclo de vida do parasito

T. gondii possui ciclo de vida heteroxênico. Membros da família dos felídeos, mais particularmente os gatos domésticos, são os hospedeiros definitivos onde ocorre a fase sexuada da infecção (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Esses hospedeiros podem se contaminar após ingerir cistos teciduais contendo bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítas, dando início à fase enteroepitelial do ciclo que ocorre em células epiteliais do intestino delgado desses animais (KAWAZOE, 2005; SIBLEY *et al.*, 2009). Após a ingestão, a parede do cisto ou do oocisto é dissolvida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino, liberando formas bradizoítas ou esporozoítas, respectivamente, capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino onde transformam-se em taquizoítas. Ocorre, então, a multiplicação assexuada por merogonia, originando os merozoítos que são liberados após o rompimento da célula hospedeira e posteriormente darão origem aos gametas masculinos e femininos dando início a fase sexuada do ciclo. Após a fecundação é iniciada a formação da parede do oocisto em volta do gameta fertilizado, ocorrendo então a liberação dos mesmos no lúmen intestinal e posterior eliminação nas fezes dos felídeos (FERGUSON, 2002; DUBEY, 2004; ALIBERTI, 2005). Se as condições do ambiente forem adequadas, ocorre a maturação dos oocistos por meio de esporulação e eles se tornam infecciosos. Os oocistos esporulados possuem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Os hospedeiros intermediários são os animais homeotérmicos. Após a ingestão de uma das formas infectantes do parasito, este invade as células epiteliais do intestino delgado de seu hospedeiro e se diferencia em taquizoítas (KIM; WEISS, 2008). A pressão imune sobre o parasito resulta na formação de cistos contendo bradizoítas, a forma de resistência do parasito (DUBEY, 2004; MAUBON *et al.*, 2008; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

1.3. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns, tanto no homem, como nos animais, apresentando ampla distribuição geográfica. A doença é considerada uma zoonose e um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos, e pode causar danos fetais em humanos, ovelhas, cabras, porcos e coelhos se o parasito for contraído pela primeira vez durante a gestação. (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUMÈTRE *et al.*, 2008).

Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo já foram expostas ao parasito (BENSON *et al.*, 2009; LAMBERT; BARRAGAN, 2010). A soroprevalência varia entre diferentes países, dependendo de fatores socioeconômicos, condições climáticas, hábitos alimentares e predisposição genética do hospedeiro (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Na África, em locais como a República Democrática de São Tomé e Príncipe, a taxa é de 75,2% (ELSHEIKHA, 2008) já em países de clima frio, como a Escandinávia, a prevalência é menor, de 11 a 28% (TENTER *et al.*, 2000) e nos Estados Unidos a soroprevalência é de 20 a 25% (MILLER *et al.*, 2009).

No Brasil a taxa de infecção por *T. gondii* em humanos é alta. A soroprevalência chega a níveis maiores que 70% (MILLER *et al.*, 2009; PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2010), onde o clima, a umidade e a presença dos hospedeiros definitivo e intermediário contribuem para o sucesso do parasito (MELAMED, 2009). Algumas localidades brasileiras apresentam as maiores taxas de incidência de infecção por *T.gondii*, dentre elas, destacam-se São Paulo com 68% (FRANCISCO *et al.*, 2006), Recife com taxa de 64% a 79%, Rio de Janeiro com soroprevalência de 79%, Manaus com 71% (CAMARGO, 1996) e entre indígenas brasileiros varia de 52% a 80% (SOBRAL *et al.*, 2005). Uma recente pesquisa realizada no Pontal do Triângulo Mineiro mostrou que 36% da população apresentaram anticorpos IgG anti- *T. gondii* e que a maior porcentagem estava entre os indivíduos de 16 a 45 anos (MAIA *et al.*, 2012). Além disso, estudos mostraram que a prevalência de gestantes soropositivas no Brasil é alta e varia de 32% a 77% (VARELLA *et al.*, 2003; SEGUNDO *et al.*, 2004). Pesquisa realizada na cidade de Uberlândia-MG, com 805 mães atendidas em hospitais público e privados demonstrou soroprevalência de 51%, enquanto a incidência de toxoplasmose congênita foi de 0,49% (SEGUNDO *et al.*, 2004). Cerca de 70 a 90% dos recém nascidos são assintomáticos para a doença, porém estes podem apresentar sequelas mais tardiamente. Aproximadamente 80% das crianças afetadas pela transmissão vertical do

parasito desenvolvem problemas visuais ou de aprendizagem na vida adulta (RORMAN *et al.*, 2006; KODJIKIAN *et al.*, 2010).

A maioria dos casos de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é assintomática. Eventualmente ocorrem alguns sintomas moderados, dentre os quais a manifestação clínica mais significativa é a linfadenopatia associada ou não à febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e de cabeça (HILL; DUBEY, 2002; SIBLEY *et al.*, 2009). Em grupos específicos de pacientes, incluindo fetos e recém-nascidos infectados durante a gestação e indivíduos imunocomprometidos, as manifestações podem ser mais graves, e geralmente ocorrem como resultado de reativação da infecção crônica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; WEISS; DUBEY, 2009; DOGRUMAN-AL *et al.*, 2011).

Nos casos de infecção congênita, as manifestações clínicas dependem do tempo de gestação em que a infecção é adquirida. Se a infecção ocorre no primeiro trimestre da gestação, os sintomas são mais graves, podendo ocorrer morte fetal, prematuridade, retardo mental, microcefalia e cegueira, o que torna a toxoplasmose congênita uma das formas mais graves da doença (WEISS; DUBEY, 2009).

Em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, transplantados, indivíduos com doenças auto-imunes), as manifestações da doença podem ser extremamente graves, podendo ocorrer miocardites, coriorretinites, e um quadro clínico de encefalite com dores de cabeça, convulsões e coma, podendo levar o paciente a óbito, caso não seja convenientemente tratado (DUBEY; JONES, 2008).

Em geral, o grau de complexidade das manifestações clínicas está relacionado com os fatores de interação entre parasito e hospedeiro e inclui a virulência da cepa, via de infecção, quantidade de inóculo, idade e estado imunológico do hospedeiro (BOPHALE, 2003; RORMAN *et al.*, 2006).

1.4. Resposta imune intestinal ao parasito

A resposta imune contra *T.gondii* é complexa, compartimentalizada e varia de indivíduo para indivíduo. Essa variação pode ser explicada pela grande heterogeneidade genética dos hospedeiros (DOGRUMAN-AL *et al.*, 2011). Além disso, cada tecido infectado tem sua resposta imune específica e infecções recorrentes com cepas de diferentes virulências podem determinar o nível de complexidade da resposta imune (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

A via natural de entrada de *T.gondii* é através do trato gastrointestinal podendo causar inflamação na parede intestinal (SCHREINER; LIESENFELD, 2009). O epitélio intestinal promove a primeira barreira contra a infecção e participa da defesa imunológica do hospedeiro por meio da produção de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (MULLER *et al.*, 2005) e tem a capacidade de se auto - renovar rapidamente (BARKER; WETERING; CLEVERS, 2008). As células-tronco intestinais se diferenciam em quatro linhagens celulares epiteliais (LEEDHAM *et al.*, 2005): os enterócitos que são as células mais abundantes do epitélio cuja principal função é a absorção de nutrientes; as células caliciformes as quais são capazes de produzir e secretar mucinas com o objetivo de formar uma camada protetora de muco; as células enteroendócrinas que secretam hormônios e as células de Paneth que secretam vários produtos antimicrobianos, como as lisozimas e α -defensinas (BEVINS; SALZMAN, 2011; SANTAOLALLA; ABREU, 2012).

A infecção dos enterócitos por *T.gondii* pode desencadear uma série de eventos imunológicos que leva a um forte processo inflamatório no intestino (KASPER *et al.*, 2004). Em alguns hospedeiros, a infecção por via oral pode induzir a produção de anticorpos IgA (KAWAZOE, 2005), que vai atuar limitando a multiplicação do parasito promovendo a sua lise na presença do sistema complemento (FILISETI; CANDOLFI, 2004).

No sítio de infecção ocorrem mudanças fisiológicas e morfológicas e as células podem secretar moléculas citotóxicas, como óxido nítrico (NO) (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006). Além disso, os enterócitos respondem à infecção secretando citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, células dendríticas (DCs), células *Natural Killers* (NKs) e neutrófilos para o local da infecção (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006). Os enterócitos, DCs e macrófagos ativados produzem interleucina- 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral - α (TNF- α) os quais induzem a proliferação de linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+) que produzem Interferon gamma (IFN- γ) (ALIBERTI *et al.*, 2004). IFN- γ juntamente com TNF- α ativam células fagocitárias profissionais como os macrófagos a produzirem altos níveis de NO que estão envolvidos no controle da replicação do parasito (ADAMS *et al.*, 1990). Porém, uma produção muito elevada de NO, IFN- γ e TNF- α contribuem para a inflamação e até necrose no intestino delgado de camundongos infectados e, se não controlada, pode levar à morte (KHAN *et al.*, 1997; LIESENFELD *et al.*, 1999).

Uma adequada imunoregulação é importante para prevenir lesões provocadas pela infecção por *T.gondii*. Foi demonstrado anteriormente que as citocinas TGF- β e interleucina-

10 (IL-10), induzem efeitos anti-inflamatórios importantes na prevenção de necrose intestinal, sendo TGF- β um potente agente imunoregulador que é capaz de limitar a produção de IFN- γ (AHUJA *et al.*, 1993; LUANGSAY *et al.*, 2003). Além disso, estudos anteriores mostraram que animais geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10^{-/-}) quando oralmente infectados, são altamente suscetíveis a fase aguda e apresentam necrose intestinal dependente da produção exagerada de IL-12 e IFN- γ (SUZUKI *et al.*, 2000).

A carga do inóculo, virulência do parasito, “background” genético, sexo e estado imunológico do hospedeiro afetam o curso da infecção em seres humanos e modelos animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Camundongos C57BL/6 oralmente infectados por *T.gondii* desenvolvem uma resposta intestinal inflamatória grave resultando em perda da arquitetura epitelial intestinal, influxo maciço de células inflamatórias na lâmina própria e focos de necrose (LIESENFELD *et al.*, 1996). O desenvolvimento de uma ileíte é um processo complexo que envolve várias células, incluindo linfócitos intraepiteliais e células NK (EGAN *et al.*, 2009).

Reis e Sousa *et al.*, 1999 mostraram que o pré tratamento com o antígeno solúvel de taquizoítas (STAg) 24 horas antes da infecção por *T.gondii* protege completamente camundongos IL-10^{-/-} e o fenômeno foi devido a uma menor produção de IL-12 p40 pelas DCs. Além disso, recentemente nós verificamos que o tratamento prévio com STAg protege camundongos C57BL/6 contra patologia intestinal em infecção oral por *T.gondii* (manuscrito submetido). Como os mecanismos que desencadeiam a proteção mediada pelo tratamento com STAg não estão completamente definidos, nós decidimos verificar alguns desses mecanismos, especialmente no intestino delgado, comparando animais resistentes BALB/c, com animais susceptíveis C57BL/6 com foco nas células do epitélio intestinal tais como células caliciformes, células de Paneth e secreção local de IgA.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença de prevalência mundial e na espécie humana, a infecção adquire importância em mulheres gestantes, onde a presença do parasito está associada com mortalidade e malformações congênitas e em pessoas imunocomprometidas. A infecção por *T.gondii* que ocorre em camundongos é muito semelhante da que ocorre em humanos. Por essa razão, o modelo murino de infecção experimental por *T. gondii* é muito utilizado como ferramenta para o entendimento das alterações patológicas causadas por este

parasito. Camundongos C57BL/6 infectados oralmente com uma elevada carga parasitária desenvolvem uma ileíte letal, cujas lesões se assemelham às observadas na doença intestinal inflamatória (IBD) verificada em humanos. Recentemente, verificamos que o tratamento prévio com STAg de camundongos C57BL/6 protege os animais contra uma ileíte letal frente a infecção por *T.gondii*. Considerando que o tratamento com STAg é capaz de promover mecanismos protetores em camundongos e que esses mecanismos ainda não estão bem elucidados, nós decidimos verificar se alguns tipos celulares intestinais, como as células caliciformes, células de Paneth e secreção local de IgA estariam envolvidas nessa importante proteção intestinal frente a infecção experimental por *T.gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar os mecanismos induzidos pelo tratamento prévio com STAg em células da mucosa intestinal em camundongos resistentes, BALB/c, e susceptíveis, C57BL/6 em infecção oral por *T.gondii*

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar o parasitismo tecidual no intestino delgado, bem como no pulmão, fígado e baço de animais BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T.gondii*;
- Analisar as alterações histológicas no intestino delgado, bem como no pulmão, fígado e baço de animais BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T. gondii*;
- Quantificar as células caliciformes presentes no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T.gondii*;

- Quantificar células positivas para IgA no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T.gondii*;
- Quantificar o número de células de Paneth, bem como a expressão de Criptidina 5 no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T.gondii*;
- Quantificar a proliferação celular intestinal por meio da detecção de células positivas para PCNA em animais BALB/c e C57BL/6 previamente tratados com STAg e infectados com *T.gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais e organismos infecciosos

O presente estudo utilizou camundongos fêmeas de 8-12 semanas de idade, das linhagens BALB/c e C57BL/6. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, em condições convencionais, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo de número 120/10 (ANEXO I).

A cepa de baixa virulência ME-49 de *T. gondii* foi utilizada para infectar animais neste experimento. Como descrito anteriormente (COUTINHO *et al.*, 2012), a cepa foi mantida em roedores *Calomys callosus* os quais foram infectados por via oral com 20 cistos de *T.gondii*. Um mês após a inoculação os cistos cerebrais foram coletados e utilizados para infectar os animais.

A cepa RH de *T. gondii* foi mantida na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia. Foi realizada inoculação intraperitoneal nos camundongos, por meio de passagens seriadas com intervalos de 48-72 horas de inóculo com aproximadamente 10^7 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal dos camundongos previamente infectados (MINEO *et al.*, 1980).

4.2. Preparação do STAg e tratamento prévio

A preparação do STAg foi feita conforme Gazzinelli *et al.*, (1991) com modificações; taquizoítas da cepa RH foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c que foram inoculados com aproximadamente 10^7 taquizoítas 2 dias anteriormente. A concentração de 10^9 parasitos foi ressuspensa em PBS EDTA 1 mM (3 mL), estes foram a seguir tratados com inibidores de proteases [Leupeptina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 10 μ M, Fenil-metil-sulfonil-fluoride (Sigma) (PMSF) 20 μ M e Aprotinina (Sigma) 10 μ M]. A suspensão de parasitos e inibidores de protease foi submetida a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C e depois foi sonicada com 4 “rounds” de sonicação em aparelho sonicador (Bandelin Eletronic Sonoplus) durante 20 segundos cada. Logo após, a suspensão foi centrifugada a 15000 x g durante 1 hora a 4 °C. O sobrenadante, o antígeno solúvel, foi coletado e a concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). O sobrenadante foi então armazenado em freezer – 20° em alíquotas de 500 μ l até o momento do uso.

Os animais foram tratados com STAg via intraperitonal 48 horas antes da infecção por *T. gondii*. Foi administrado 25 μ g de STAg por animal (REIS E SOUSA *et al.*, 1999) diluído em 0,2 ml de PBS em grupos de pelo menos 5 animais. Outros grupos de pelo menos 5 animais foram tratados pela mesma via com PBS apenas.

4.3. Infecção experimental, coleta e processamento tecidual

Após 48 horas do tratamento com STAg ou PBS, os animais foram infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* em um volume de 0,2 ml de PBS. Aos 8 dias de infecção, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia – SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia – SP, Brazil) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos periféricos (intestino delgado, pulmão, fígado, baço) foram coletados. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Estas foram lavadas com PBS e enroladas, cuidadosamente, em finos palitos de madeira formando um “rolo suíço”. Os órgãos foram então fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina. Foram feitos cortes

de 4µm de espessura em micrótomo Spencer 820. Para análise de imunohistoquímica os cortes foram fixados em lâminas contendo Poly-L-lisine (Sigma).

4.4. Coloração pela Hematoxilina-eosina (HE) para determinação das alterações histológicas nos tecidos, bem como para quantificação de células de Paneth no intestino delgado

Os cortes teciduais foram desparafinados em xilol durante 30 minutos, re-hidratados em alcoóis de concentrações decrescentes, 100, 95, 85 e 70% durante 10 segundos cada. As lâminas contendo os cortes foram colocadas em água corrente durante 15 minutos e coradas em Hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Os cortes permaneceram por mais 15 minutos em água corrente e foram imersos em Eosina-Floxina por 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente rapidamente e desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 85, 95, 100%) durante 10 segundos cada e mantidas em xilol por 10 minutos. As lâminas foram montadas em lamínulas e Entellan. O número de células de Paneth foi calculado por meio da análise de 100 criptas em cada parte do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) em pelo menos cinco animais por grupo, utilizando a objetiva de 100x.

4.5. Análise histológica

As lesões patológicas induzidas por *T. gondii*, foram quantificadas em lâminas coradas por H&E em 40 campos microscópicos utilizando a objetiva de 40x de acordo com Silva e colaboradores (2009). A análise das lesões foi feita de forma diferente nos diferentes órgãos:

1. No intestino, as lesões inflamatórias foram analisadas de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, alargamento das vilosidades e aumento em sua espessura, assim como presença de necrose;
2. No pulmão foi analisada a presença de infiltrados inflamatórios nos septos alveolares. As lesões inflamatórias foram analisadas quanto à sua extensão nos septos alveolares;
3. No fígado, focos inflamatórios foram analisados assim como áreas necróticas no parênquima, quando presentes;
4. O baço foi avaliado quanto à hiperplasia de polpa branca e outras possíveis lesões patológicas.

4.6. Coloração por Alcian Blue para quantificação das células caliciformes no intestino delgado

Os cortes teciduais foram desparafinados em xilol durante 30 minutos, re-hidratados em alcoóis de concentrações decrescentes 100, 95, 85 e 70% durante 10 segundos cada e posteriormente foram colocados em água destilada durante 10 segundos. Em seguida, os cortes foram banhados por 3 minutos em solução de ácido acético glacial PA 3%, e mergulhados em solução de Alcian Blue a 40°C por 2 horas. As lamínas contendo os cortes permaneceram em água destilada por 1 minuto e foram imersas em Eosina por 1 minuto. Posteriormente as lâminas foram submersas em água corrente rapidamente e desidratadas em concentrações de alcoóis crescentes 70, 85, 95, 100% durante 10 segundos cada e mantidas em xilol por 30 minutos. As lâminas foram montadas em lamínulas e Entellan. O número de células caliciformes foi determinado através da análise de 52 campos microscópicos em cada região do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) em pelo menos cinco animais por grupo, utilizando a objetiva de 40x.

4.7. Reação de imunohistoquímica para detecção de *T. gondii* nos órgãos periféricos

Os cortes teciduais foram desparafinados e reidratados em concentrações decrescentes de álcoois e incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. A seguir as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) em forno microondas em potência máxima, por 7 minutos para o resgate dos sítios antigênicos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, as lâminas foram incubadas com leite desnatado 3% (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após este tempo, as lâminas foram incubadas com anti-soro primário produzido em *C. callosus* (produzido em nosso laboratório através da infecção de *C. callosus* com a cepa ME49 de *T. gondii*) diluído a 1:100 em PBS saponina 0,01% durante toda a noite a 4°C. Depois deste período, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário imunoglobulina G (IgG) de cabra biotinilada anti-camundongo (Sigma Chem Co., St. Louis – MO, EUA), na diluição de 1:300 em PBS. A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:100, durante 45 minutos a 37°C e então foi revelada com uma solução cromógena, filtrada,

que consiste de 10 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride) (Sigma) diluída em 20 mL de PBS e 16 µL de peróxido de hidrogênio 30% v/v adicionada no momento do uso. A contra coloração foi feita em hematoxilina de Harris e então as lâminas foram desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), xilol e montadas em lamínula e Entellan. Para determinação do parasitismo tecidual o número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos foi avaliado em ao menos um corte tecidual de cada um dos animais que compunham um grupo, sendo estes obtidos a partir de cortes semi-seriados (distância de 40 µm entre eles). No intestino foram avaliados 52 campos microscópicos em cada região (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo). Nos demais órgãos foram avaliadas pelo menos uma seção tecidual por animal em pelo menos cinco animais por grupo utilizando a objetiva de 40x.

4.8. Reação de imunohistoquímica para detecção de células positivas para IgA no intestino delgado dos animais

Para detecção de células positivas para IgA, os cortes desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6,0, em forno microondas e depois as lâminas foram incubadas com PBS-Tween 0,05 % e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação com leite desnatado 3% (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil). Após nova lavagem com PBS-Tween 0,05%, os cortes foram incubados durante a noite toda, com o anticorpo monoclonal cabra anti-IgA de camundongo (Sigma) na diluição de 1:200 em PBS. As lâminas então foram incubadas com anticorpo produzido em burro anti-cabra biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:200 em PBS. A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories) e desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. As células positivas para IgA foram avaliadas em 52 campos microscópicos em cada região do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) em pelo menos cinco animais por grupo utilizando a objetiva de 40x.

4.9. Reação de imunohistoquímica para detecção de proliferação celular no intestino delgado dos animais

Seguida as primeiras etapas da reação de imunohistoquímica como previamente descrito no item 4.8, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-PCNA (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). O anticorpo secundário utilizado foi cabra anti-camundongo biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories) e desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. A expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi calculada por meio de uma escala arbitrária de níveis de intensidade que variou de 1 a 3 baseado na intensidade e frequência de células marcadas. As células foram analisadas em toda a extensão do intestino delgado por animal em pelo menos cinco animais por grupo, utilizando a objetiva de 10X.

4.10. Reação de imunohistoquímica para detecção de criptidina 5 no intestino delgado dos animais

A reação foi feita conforme previamente descrito (SHANAHAN *et al.*, 2010). Resumidamente, os cortes teciduais foram incubados com anticorpo polyclonal anti-Crp5 durante uma noite a 4°C. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa 555 (RAFFATELLU *et al.*, 2008). Os cortes foram montados usando SlowFade com Dapi (Invitrogen, Carlsbad, CA). As imagens foram capturadas utilizando microscópio confocal a laser LSM 5 e PASCAL (Zeiss, New York) e posteriormente foram analisadas utilizando o software Image J (NIH, Maryland).

4. 11. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos experimentais. A comparação de dados entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c foi analisada pelo teste *t* de Student, enquanto que a comparação entre as diferentes

condições experimentais foi analisada pelo teste ANOVA (“one-way”) e pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parasitismo tecidual nos órgãos periféricos de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T.gondii*

A avaliação do parasitismo tecidual no intestino delgado, bem como no pulmão, fígado e baço foi feita por meio da análise dos cortes histológicos dos mesmos submetidos à reação de imunohistoquímica. Aos 8 após a infecção, camundongos C57BL/6 previamente tratados com STAg apresentaram menor parasitismo tecidual no intestino delgado em comparação com os animais tratados apenas com PBS e infectados com *T.gondii* ($P < 0,05$) (Figura 1A). É interessante notar que o tratamento com STAg nesses animais foi capaz de diminuir o parasitismo consideravelmente, visto que os animais tratados apresentaram uma quantidade de parasitos aproximadamente 6 vezes menor do que os animais somente tratados com PBS e infectados. Resultados semelhantes foram observados em camundongos BALB/c, visto que o pré-tratamento com STAg foi capaz de diminuir significativamente o parasitismo neste importante sítio de infecção de *T.gondii* ($p < 0,05$) (Figura 1A). O presente estudo demonstrou ainda que os animais BALB/c em ambas as condições de tratamento (STAg ou PBS) apresentaram significativamente menor carga parasitária em comparação com os animais C57BL/6 ($p < 0,05$) (Figura 1A).

Quanto ao parasitismo no pulmão, foi observado que este órgão apresentou relativamente uma baixa carga parasitária em ambas as linhagens de camundongos se comparado com a carga parasitária observada no intestino delgado. Apesar disso, o fenômeno observado foi semelhante ao ocorrido no intestino delgado, visto que animais pré-tratados com STAg apresentaram menor parasitismo em comparação com os animais tratados com PBS e infectados com *T.gondii*. Os animais C57BL/6 tratados previamente com STAg apresentaram significativamente menor carga parasitária no tecido pulmonar em relação aos animais controles do mesmo grupo ($p < 0,05$) (Figura 1B). Quanto aos animais BALB/c, houve uma tendência de menor parasitismo nos animais pré-tratados com STAg e infectados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Comparando as duas linhagens de

camundongos, os resultados mostraram semelhante parasitismo em ambas as condições de tratamento (Figura 1B).

No fígado foi observado que aos 8 dias de infecção, ambas as linhagens de camundongos nas duas condições de tratamento apresentaram uma quantidade muito pequena de parasitos (menos de 1 parasito por grupo), notando-se somente que os animais controles pré-tratados com PBS apresentaram aparentemente mais parasitos, porém essa quantidade foi ínfima (Figura 1C). Já no baço observou-se uma tendência de menor parasitismo nos animais BALB/c e C57BL/6 pré- tratados com STAg em comparação com os respectivos grupos controles pré- tratados somente com PBS. Além disso, semelhante parasitismo foi observado nas duas linhagens em ambas as condições de tratamento (Figura 1D).

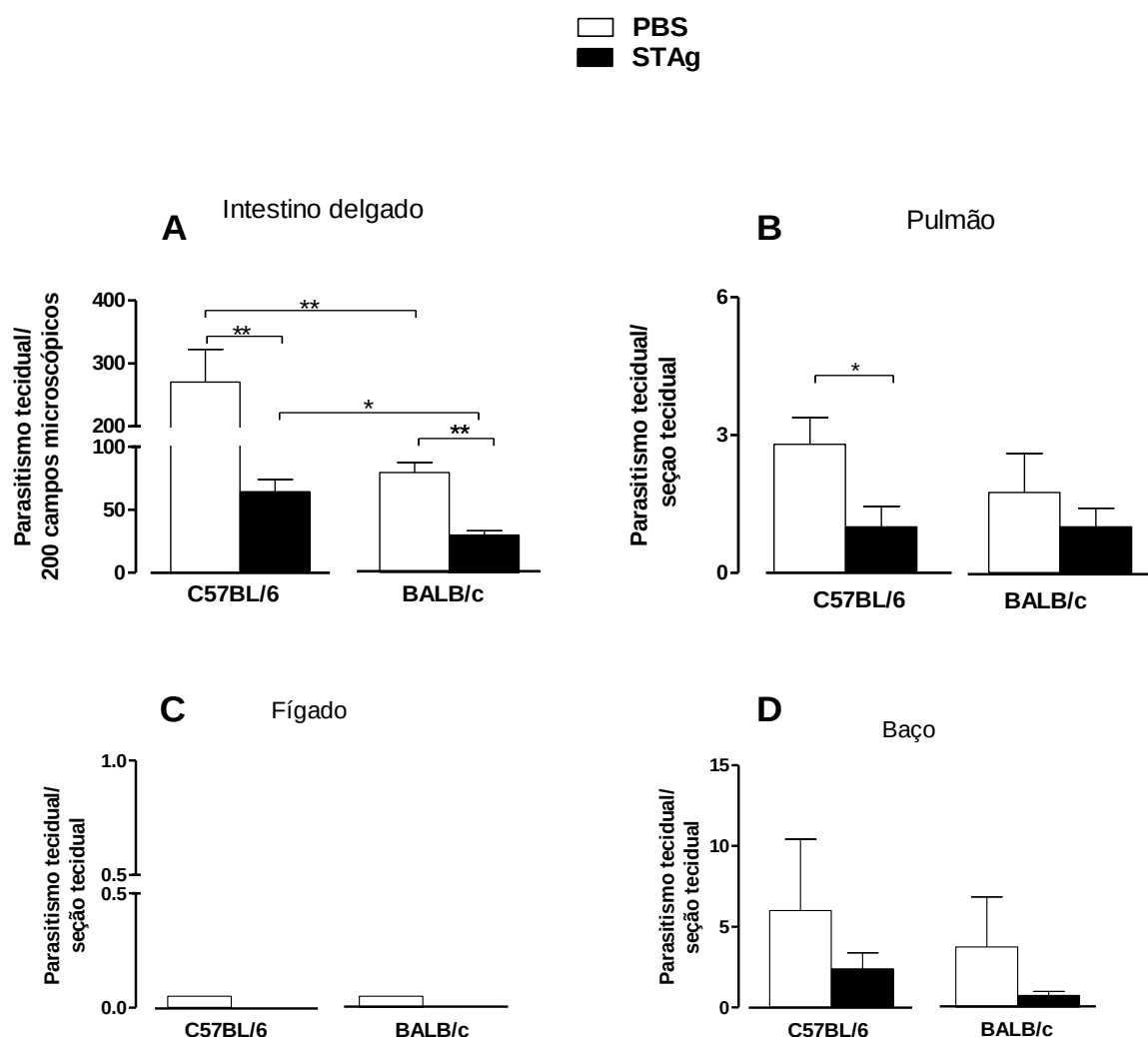


Figura 1. Parasitismo tecidual no intestino delgado (A), pulmão (B), fígado (C) e baço (D) de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 dias após a infecção (d.p.i.). O parasitismo tecidual foi detectado por reação de imunohistoquímica e quantificado através da contagem do número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos em 200 campos microscópicos no intestino delgado e por secção tecidual nos demais órgãos. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. *Diferenças estatísticas significantes entre as condições experimentais (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.2. Análise histológica dos órgãos periféricos de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T.gondii*

Aos 8 dias de infecção oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* os animais C57BL/6 pré-tratados com STAg apresentaram menor processo inflamatório com lesões menos graves no intestino delgado em comparação com os animais controles da mesma linhagem, uma vez que os animais somente tratados com PBS e infectados apresentaram lesões caracterizadas por intenso infiltrado de células mononucleares na lâmina própria, epitélio e submucosa intestinal, além de um aumento da espessura dos vilos intestinais e perda focal das células epiteliais da superfície desses, indicando início de necrose (Figuras 2A e 5A). Em contrapartida, as lesões nos animais pré-tratados com STAg foram mais suaves, caracterizadas por pequenos infiltrados de células mononucleares na lâmina própria e submucosa (Figura 2B). Entre os animais BALB/c foi observado que não houve diferença significativa entre o grupo tratado com STAg ou PBS, porém observa-se uma tendência de menor inflamação no grupo tratado com STAg (Figuras 2C, 2D, 5A). Comparando as duas linhagens, foi observado que os animais C57BL/6 tratados com PBS apresentaram um maior processo inflamatório intestinal do que os animais BALB/c na mesma condição ($p < 0,05$), e apesar de não se observar diferença estatística, foi observada maior inflamação nos animais C57BL/6 tratados com STAg em relação aos animais BALB/c também tratados com STAg (Figura 5A).

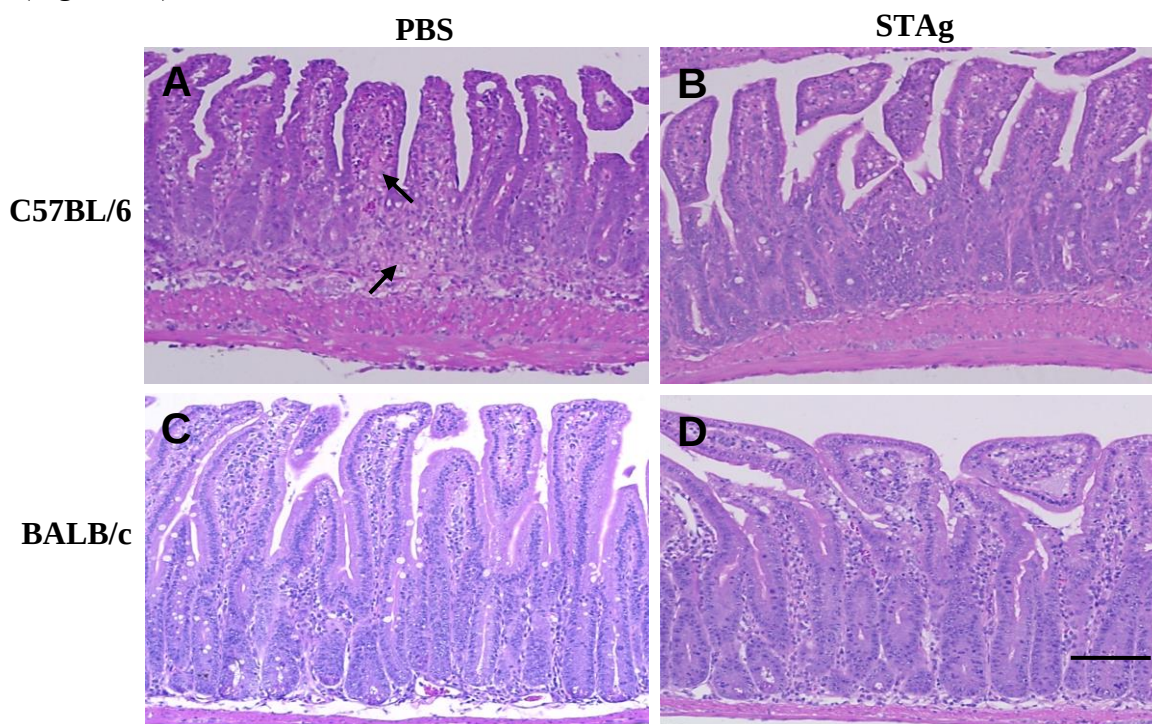


Figura 2. Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. Infiltrados inflamatórios (setas) no intestino delgado de camundongo C57BL/6 (A) pré-tratado com PBS. As lâminas foram coradas por H&E. Barra, 100µm.

O tecido pulmonar apresentou alterações inflamatórias que se caracterizaram pela presença de infiltrados inflamatórios constituídos de células mononucleadas nos septos alveolares (Figura 3). A intensidade da inflamação foi semelhante em ambas as linhagens nos dois tratamentos, porém o tratamento com STAg diminuiu aparentemente o processo inflamatório e consequentemente as lesões no pulmão de ambas as linhagens (Figuras 3, 5B).

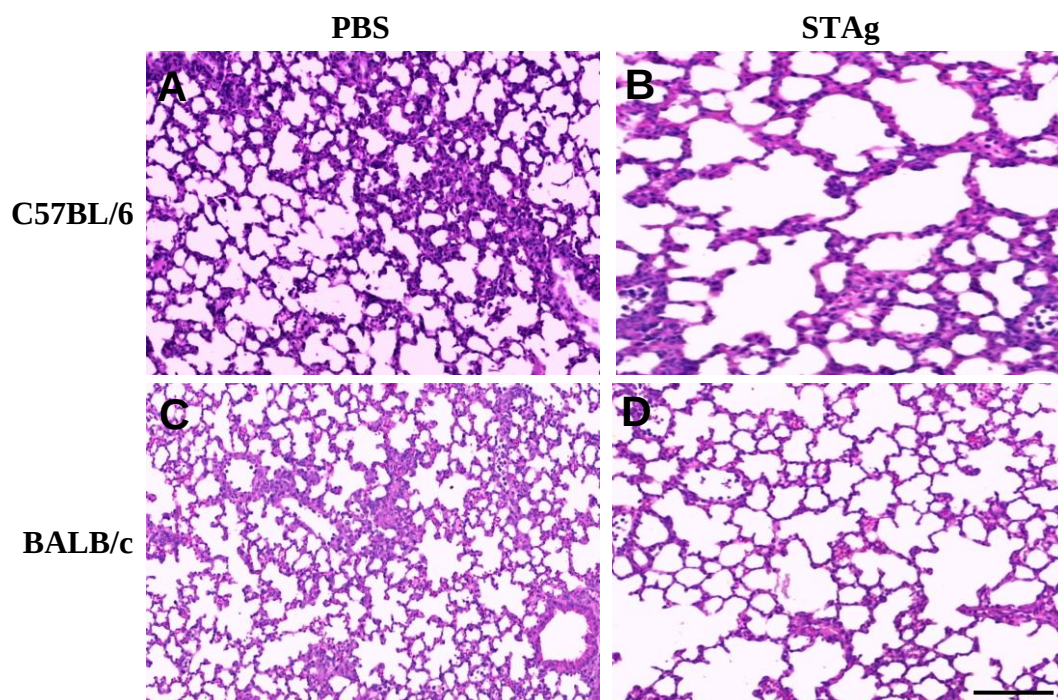


Figura 3. Fotomicrografias representativas do pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As lâminas foram coradas por H&E. Barra, 100µm.

O fígado dos camundongos C57BL/6 tratados com STAg apresentou significativamente menor inflamação em comparação com o grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 5C). As lesões nos camundongos C57BL/6 pré-tratados com PBS foram mais graves e caracterizadas por infiltrados inflamatórios, organizados como focos, constituídos principalmente por células mononucleadas (Figura 4A). As lesões nos camundongos C57BL/6 pré-tratados com STAg foram semelhantes, porém mais suaves e em menor número (Figura 4B). Os camundongos BALB/c apresentaram intensidade semelhante de lesões nos dois grupos de tratamento (Figuras 4C, 4D e 5C). Comparando-se as duas linhagens, observou-se que os camundongos C57BL/6 pré-tratados com PBS apresentaram maior intensidade de inflamação e lesões mais graves em comparação com camundongos BALB/c com o mesmo tratamento ($p < 0,01$) e entre

as linhagens pré-tratadas com STAg não houve diferença significativa no perfil inflamatório (Figura 5C).

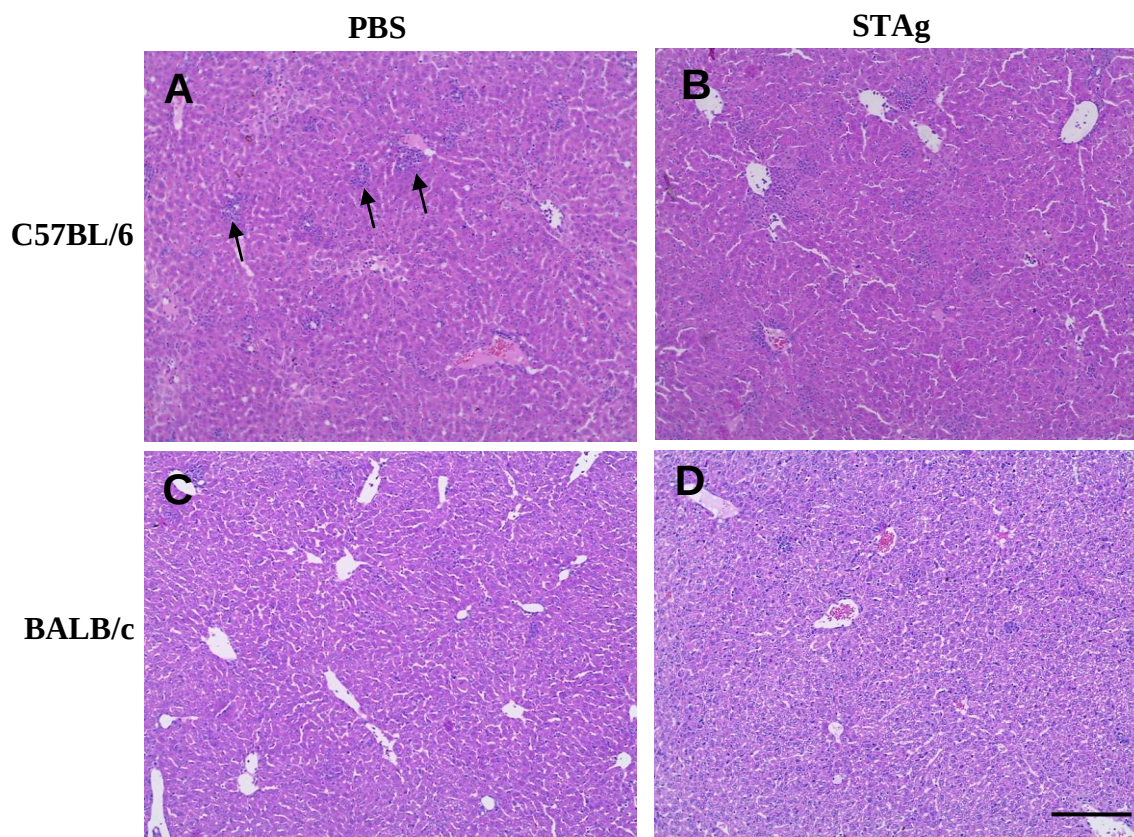


Figura 4. Fotomicrografias representativas do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Infiltrados inflamatórios (setas) no fígado de camundongo C57BL/6 pré-tratado com PBS (A). Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As lâminas foram coradas por H&E. Barra, 100µm.

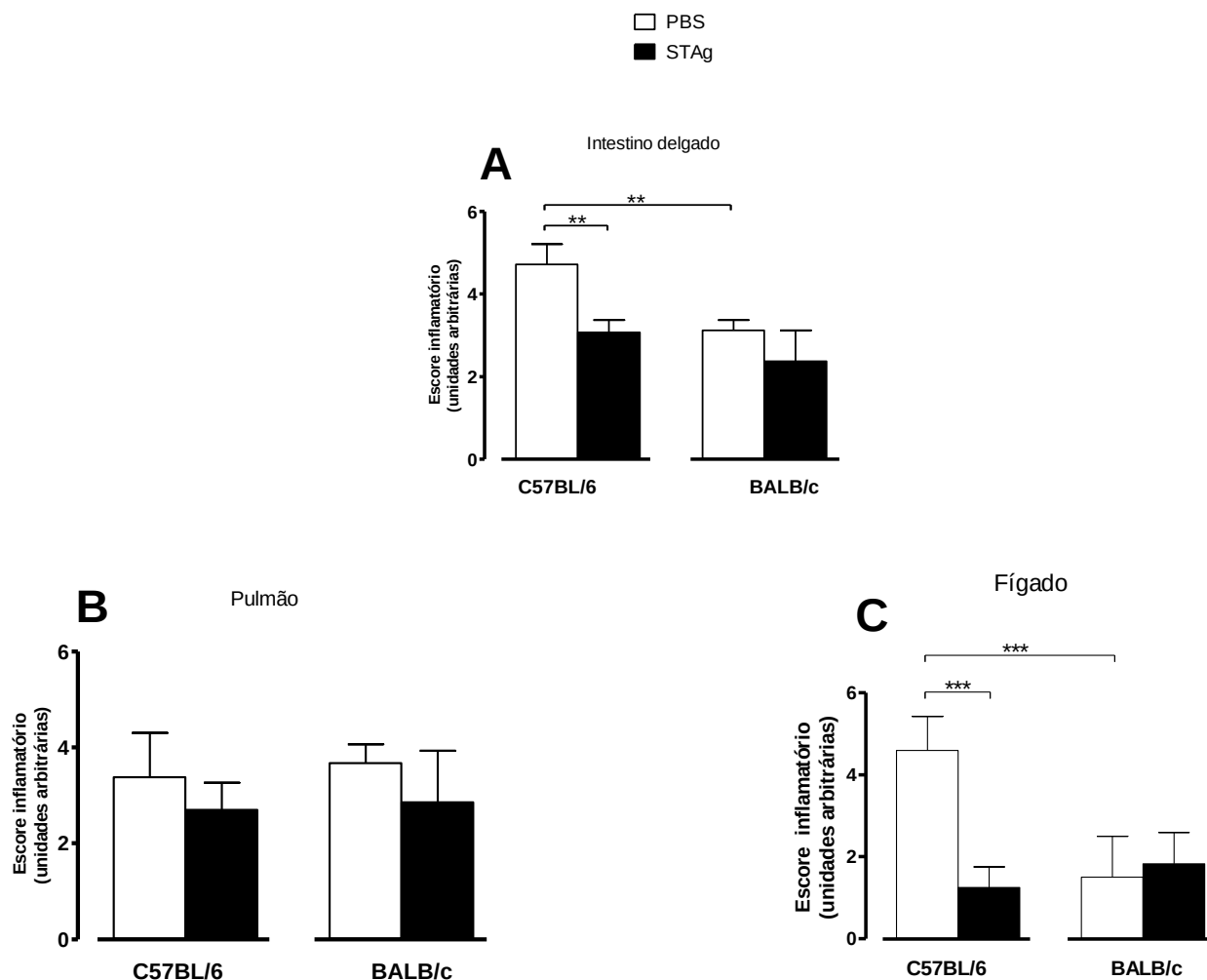


Figura 5. Escore inflamatório no intestino delgado (A), pulmão (B) e fígado (C) de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. *Diferença estatística significativa entre as diferentes condições experimentais (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

5.3. Quantificação de células caliciformes no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T.gondii*

O número de células caliciformes foi analisado em 200 campos microscópicos em todo o intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 tratados com STAg ou PBS e infectados com *T.gondii*. Além disso, foi analisada também a quantidade dessas células em animais não infectados de ambas as linhagens.

Foi observado que os animais não infectados das duas linhagens apresentaram maior quantidade de células caliciformes em comparação com os respectivos animais pré-tratados com PBS e infectados com *T.gondii* ($p < 0,05$) (Figura 6). Além disso, entre os animais

C57BL/6, observou-se que o grupo não infectado também apresentou maior quantidade de células caliciformes em comparação com o grupo pré-tratado com STAg e infectado com *T.gondii* ($p<0,05$) (Figuras 6, 7A, 7C). Ainda nessa linhagem de camundongos não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de células caliciformes entre os grupos pré-tratados com STAg ou PBS e infectados, (Figuras 6, 7B, 7C). Entre os animais BALB/c observou-se que a infecção diminui significativamente o número de células caliciformes ($p<0,05$) (Figuras 6, 7A, 7B) e o tratamento com STAg anterior a infecção foi capaz de manter a quantidade de células observada no grupo não infectado ($p<0,05$), apresentando ainda o grupo pré-tratado com STAg maior número de células caliciformes no intestino em comparação com o grupo pré-tratado apenas com PBS (Figuras 6, 7E, 7F). Comparando as duas linhagens de camundongos, foi observado que os camundongos BALB/c apresentam naturalmente maior quantidade de células caliciformes em comparação com os camundongos C57BL/6 ($p<0,05$) (Figuras 6, 7A, 7D) e além disso o grupo BALB/c pré-tratado com STAg apresentou mais células caliciformes ao longo do intestino delgado em comparação com os animais C57BL/6 com semelhante tratamento ($p<0,05$) (Figuras 6, 7C, 7F).

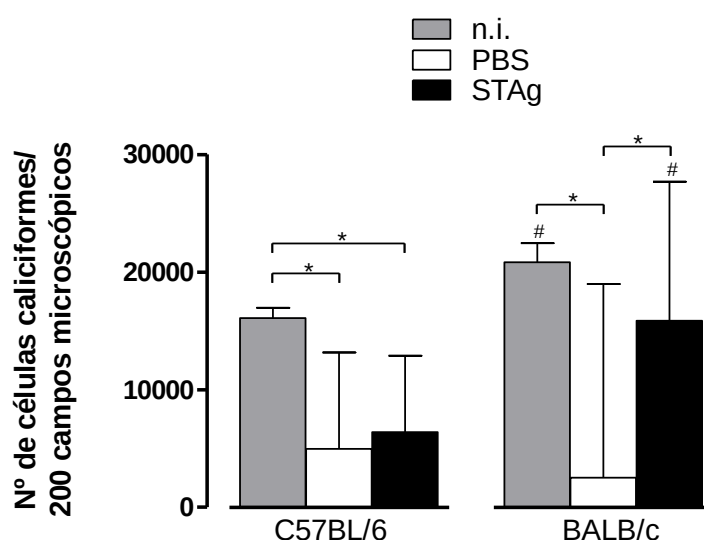


Figura 6. Número de células caliciformes presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados (n.i.) e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As células caliciformes foram quantificadas por meio da análise de 200 campos microscópicos em secções teciduais coradas por Alcian Blue. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. *Diferenças estatísticas significantes entre as condições experimentais de animais da mesma linhagem (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p<0,05$). #Comparação entre ambas as linhagens submetidas às mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, $p<0,05$).

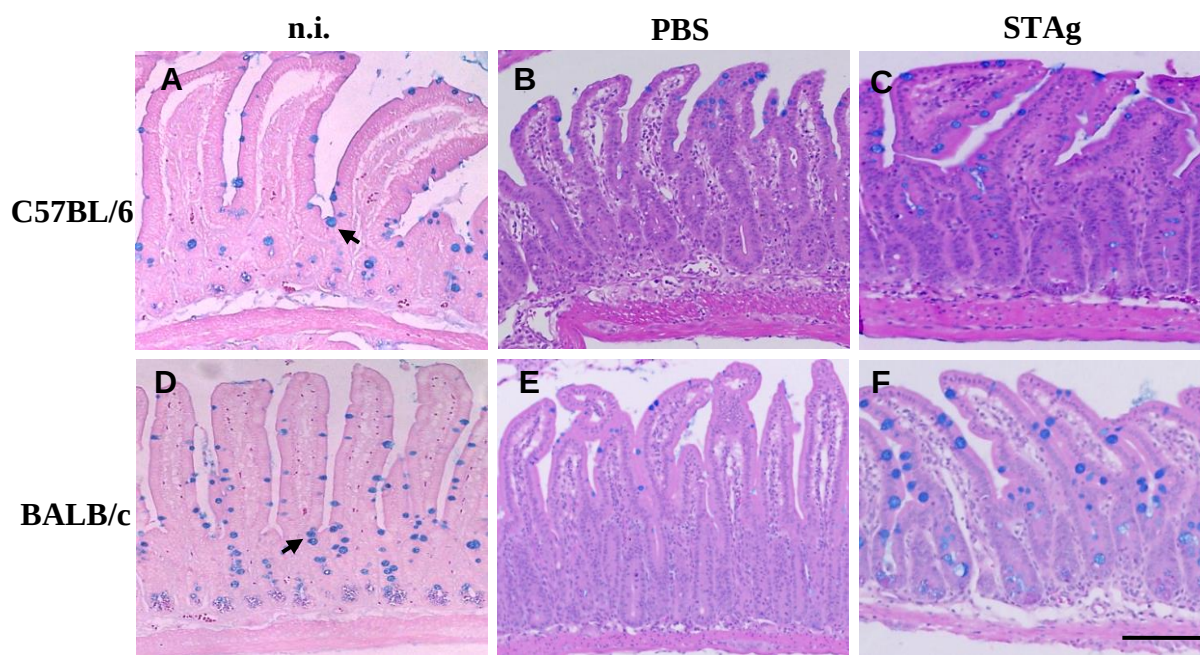


Figura 7. Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c não infectados (n.i.) e de animais pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. Células caliciformes (setas) no intestino delgado de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (D) não infectados. As lâminas foram coradas com Alcian Blue e Eosina. Barra, 100 μ m.

5.4. Quantificação de células positivas para IgA no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T.gondii*

O número de células positivas para IgA no intestino delgado dos animais foi acessado por meio de reação de imunohistoquímica. Foram quantificados 200 campos microscópicos ao longo de todo o intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6. Os resultados mostraram que os animais C57BL/6 apresentaram semelhantes quantidades de células positivas para IgA, entretanto houve uma tendência de maior expressão dessas células no intestino delgado dos grupo pré-tratado com STAg em relação ao grupo controle, somente tratado com PBS e infectado. Entre os animais BALB/c o fenômeno foi semelhante, porem foi mais evidente, uma vez que o pré-tratamento com STAg induziu um aumento de aproximadamente duas vezes na expressão de células IgA positivas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figuras 8A, 8B). Foi observado também que os animais BALB/c com ambos os tratamentos apresentaram maior quantidade de células IgA positivas em relação aos animais C57BL/6 com os respectivos tratamentos, e entre os animais pré-tratados com STAg

esse aumento foi maior, uma vez que o número de células positivas para IgA foi quatro vezes maior no intestino delgado dos animais BALB/c pré-tratados com STAg em relação aos animais C57BL/6 com a mesma condição ($p < 0,05$) (Figura 8A, 8B).

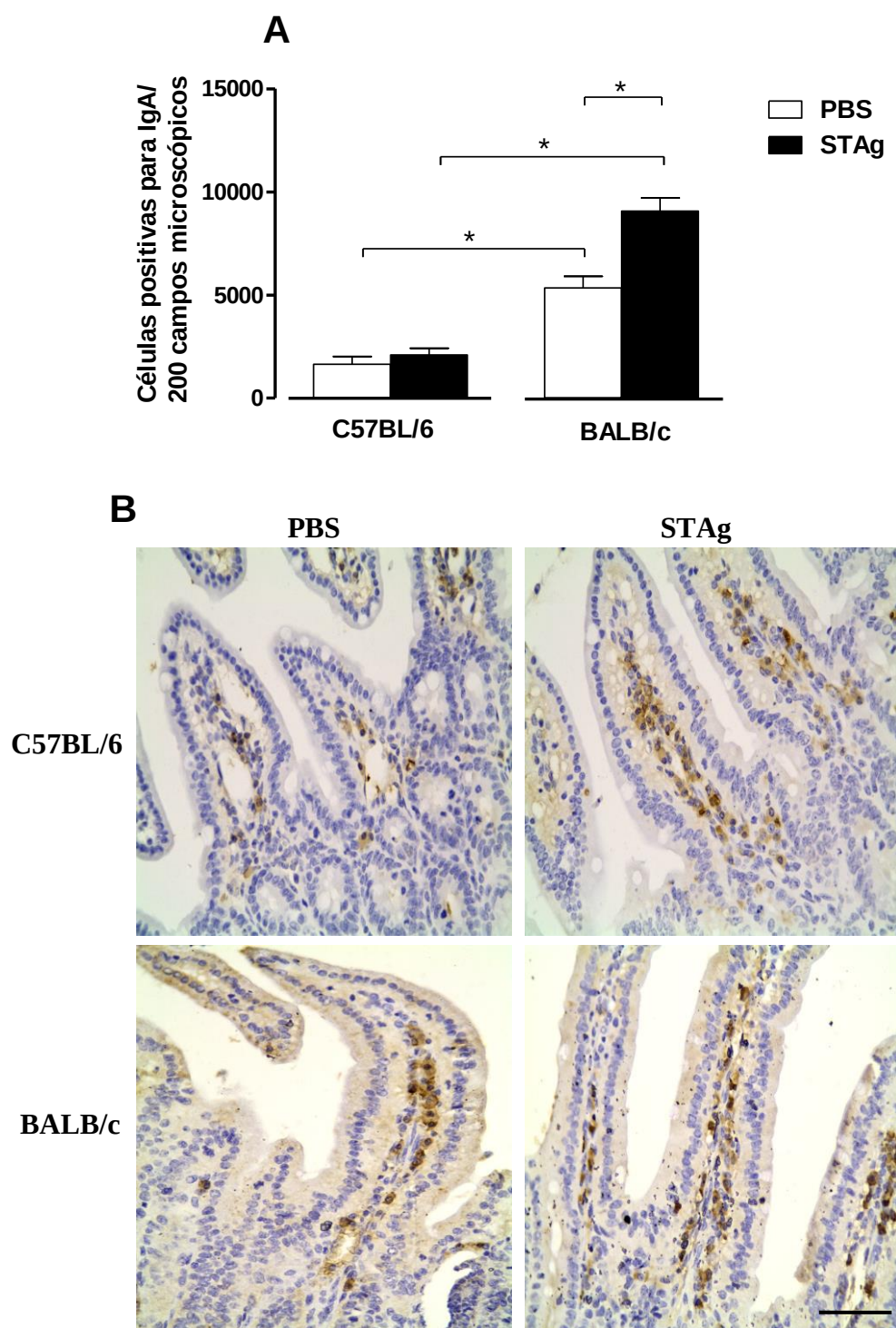


Figura 8. Número de células positivas para IgA presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (A). Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As células positivas para IgA foram quantificadas por meio da análise de 200 campos microscópicos em seções teciduais submetidas a reação de imunohistoquímica. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. * Diferença estatística significativa entre as diferentes condições experimentais (teste *t* de Student, $p < 0,05$). Fotomicrografias representativas da expressão de células positivas para IgA no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6 (B). Barra, 100 μ m.

5.5. Quantificação de células de Paneth e criptidina-5 no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T. gondii*

Com o objetivo de investigar se as células de Paneth estariam envolvidas na proteção mediada pelo tratamento prévio com STAg, o número de células de Paneth foi quantificado em 400 criptas ao longo de todo o intestino delgado dos animais. Foi verificado que a infecção por *T. gondii* diminuiu significativamente o número de células de Paneth no intestino delgado de animais BALB/c, visto que o grupo pré-tratado com PBS e infectado apresentou uma quantidade aproximadamente 2 vezes menor dessas células em comparação com o grupo não infectado ($p < 0,05$) (Figuras 9, 10D, 10E) e o fenômeno foi semelhante entre os animais C57BL/6 apesar de não apresentar diferença estatística (Figura 9). Os animais BALB/c pré-tratados com STAg e infectados apresentaram ainda um número duas vezes maior de células de Paneth em comparação com os animais da mesma linhagem pré-tratados com PBS e infectados ($p < 0,05$) (Figuras 9, 10E, 10F) e interessante foi o resultado de que o grupo pré-tratado com STAg apresentou número semelhante de células de Paneth em comparação com o grupo de animais não infectados, sugerindo que o pré-tratamento com STAg consegue manter o número de células de Paneth durante a fase aguda da infecção e o mesmo ocorreu entre os animais C57BL/6 apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa. Comparando as duas linhagens de camundongos, foi observado que os animais BALB/c não infectados apresentaram naturalmente maior número de células de Paneth em comparação com os animais C57BL/6 nas mesmas condições ($p < 0,05$) e esse número foi duas vezes maior nos animais BALB/c (Figuras 9, 10A, 10D). Além disso, os animais BALB/c pré-tratados com STAg apresentaram também duas vezes mais células de Paneth em comparação com os animais C57BL/6 com o mesmo pré-tratamento ($p < 0,05$) (Figuras 9, 10C, 10F).

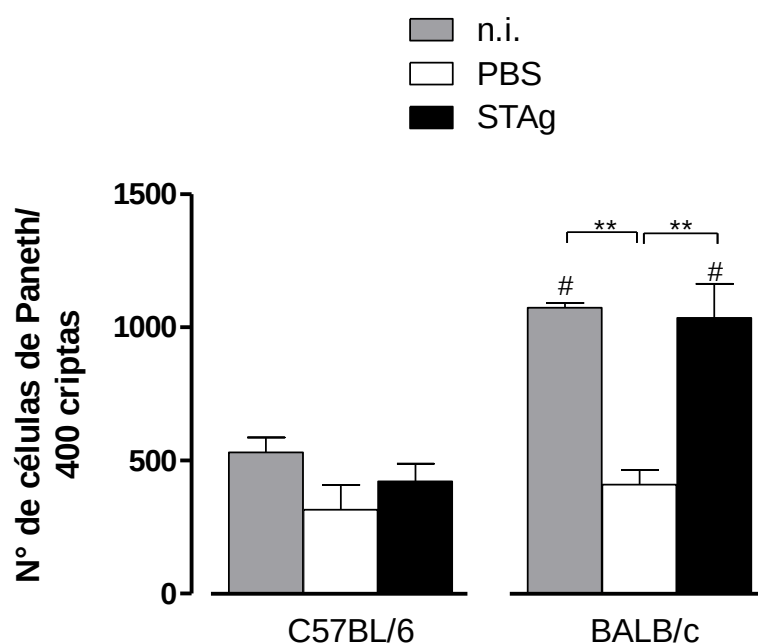


Figura 9. Número de células de Paneth presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados (**n.i.**) e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As células de Paneth foram quantificadas por meio da análise de 200 campos microscópicos em secções teciduais coradas por H&E. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. *Diferenças estatísticas significantes entre as condições experimentais de animais da mesma linhagem (ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$). [#]Comparação entre ambas as linhagens submetidas às mesmas condições de tratamento (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

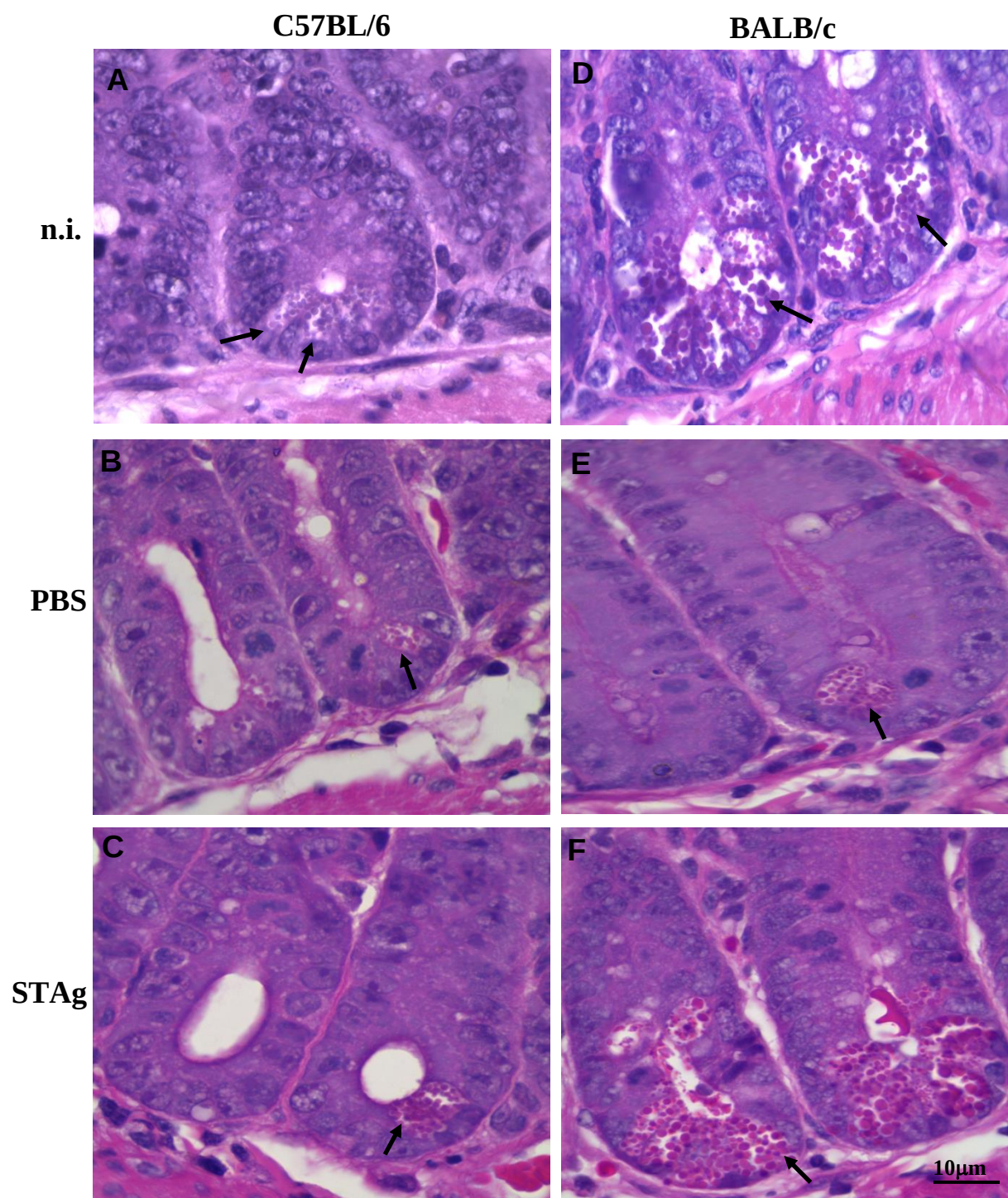


Figura 10. Fotomicrografias representativas do intestino delgado de animais C57BL/6 e BALB/c não infectados (n.i.) e de camundongos pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. Células de Paneth estão evidenciadas por setas. As lâminas foram coradas por H&E. Barra, 10µm.

A expressão de criptidina 5 produzida pelas células de Paneth também foi analisada e os resultados mostraram concordância com a quantificação de células de Paneth, uma vez que em ambas as linhagens o pré-tratamento com STAg induziu um aumento na expressão de criptidina 5 frente a infecção por *T.gondii* ($p<0,05$) (Figuras 11A, 11B, 12), o que foi verificado por meio da análise de células positivas para criptidina-5 e intensidade de fluorescência da reação (Figuras 11A, 11B, 12). Foi observado também que os animais BALB/c tratados com STAg ou PBS apresentaram maior expressão de criptidina-5 no intestino delgado em comparação com os animais C57BL/6 com os respectivos tratamentos (Figuras 11A, 12).

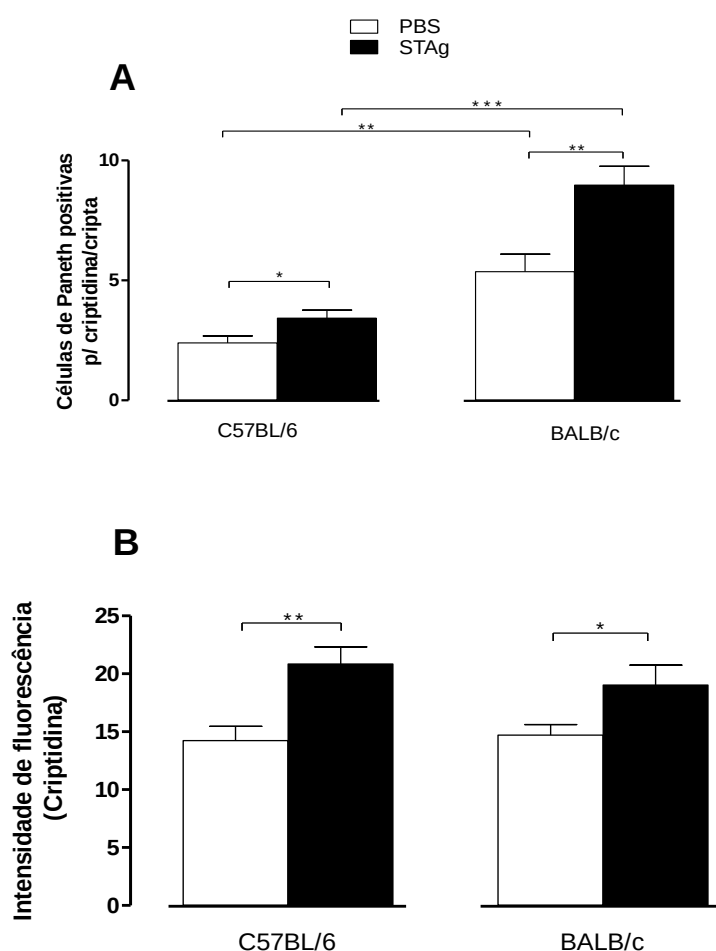


Figura 11. Expressão de criptidina-5 representadas pela quantidade de células de Paneth positivas para criptidina-5 (**A**) e intensidade de fluorescência (**B**) no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. Os dados são representativos de pelo menos 5 animais por grupo. *Diferenças estatísticas significantes entre as condições experimentais (teste *t* de Student, $p<0,05$).

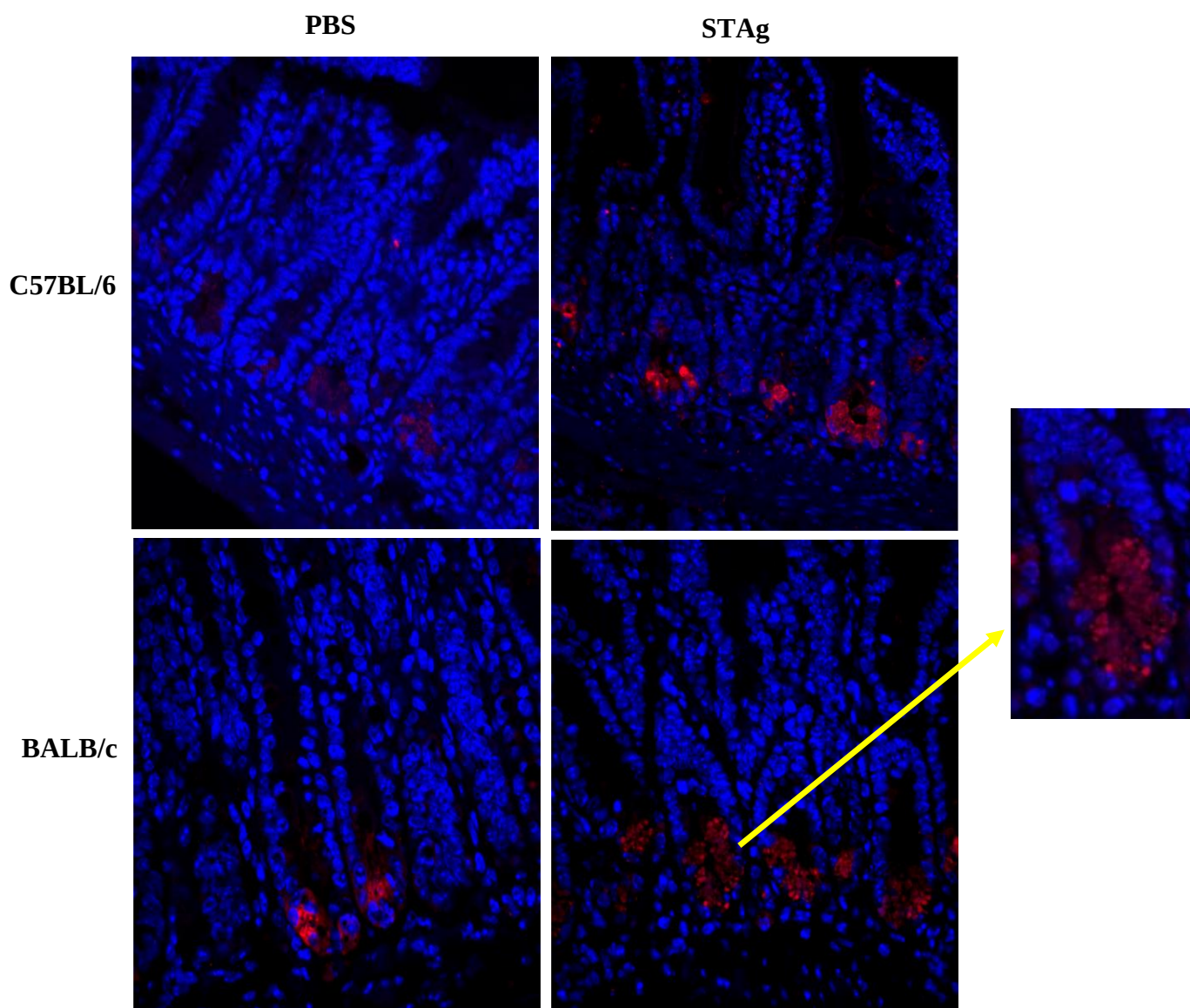


Figura 12. Fotomicrografias representativas da expressão de criptidina-5 no intestino delgado de C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. A análise foi feita por meio de microscopia a laser confocal.

5.6. Análise da proliferação celular no intestino delgado de camundongos BALB/c e C57BL/6 pré-tratados com STAg e infectados com *T.gondii*

A incidência de proliferação celular foi avaliada por meio da expressão de células positivas para PCNA no intestino delgado dos animais, com o intuito de verificar se o pré-tratamento com STAg poderia alterar a proliferação celular. Os resultados mostraram que os animais naturalmente apresentam um alto índice de proliferação celular no intestino delgado, como foi observado nos grupos não infectados das duas linhagens (Figura 13). Quando os animais foram pré-tratados com PBS e infectados esse índice parece diminuir em camundongos BALB/c e C57BL/6, porem essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 13, 14). Interessante foi o resultado de que o pré-tratamento com STAg parece restaurar essa proliferação vista nos animais não infectados, aumentando o índice de proliferação celular, resultado visto para ambas as linhagens, quando os animais pré-tratados com STAg e infectados apresentaram aparentemente um índice de proliferação maior do que os grupos pré-tratados com PBS e infectados (Figura 13, 14).

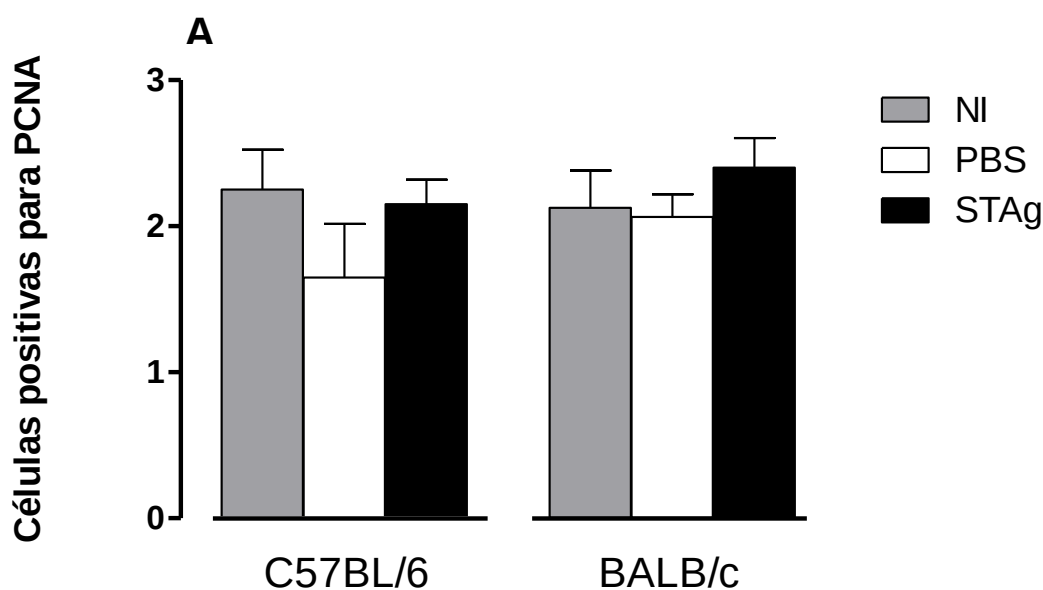


Figura 13. Expressão de células positivas para presentes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e BALB/c não infectados (n.i.) e de camundongos das duas linhagens pré-tratados com PBS ou STAg e infectados por via oral com 30 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Os animais foram sacrificados aos 8 d.p.i. As lâminas foram submetidas a reação de imunohistoquímica.

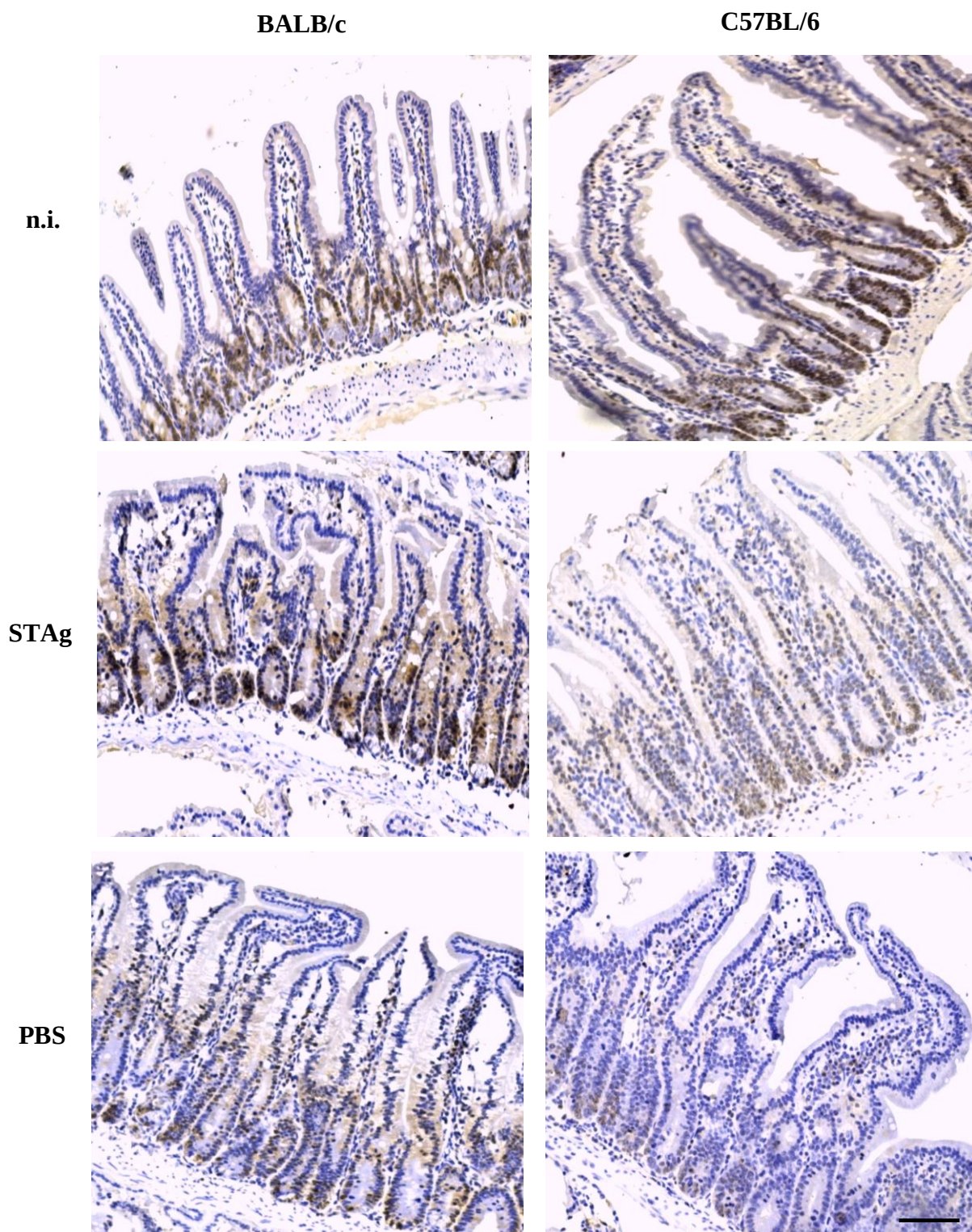


Figura 14. Fotomicrografias representativas da expressão PCNA no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6. Barra, 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

A infecção por *T.gondii* é naturalmente adquirida por via oral (CHARDES *et al.*,1993). Este parasito intracelular entra no hospedeiro via trato gastrointestinal e atravessa diferentes células epiteliais na mucosa intestinal, disseminando para outros órgãos (LIESENFELD, 2002). O epitélio intestinal é a interface entre o hospedeiro e patógenos invasores (MENNECHET *et al.*, 2004) e células como os enterócitos formam uma barreira protetora contra invasão de patógenos (KASPER *et al.*, 2004). A infecção dos enterócitos por *T.gondii* pode desencadear uma série de eventos imunológicos, podendo culminar em um forte processo inflamatório no intestino (KASPER *et al.*,2004).

A carga do inóculo, virulência do parasito, “background” genético, sexo e estado imunológico do hospedeiro afetam o curso da infecção por *T.gondii* em seres humanos e modelos animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). O modelo murino de infecção experimental por *T.gondii* é muito utilizado como ferramenta para o entendimento das alterações patológicas causadas por este parasito, pois a infecção que ocorre em camundongos é muito semelhante da que ocorre em humanos (DENKERS, 1999). Camundongos C57BL/6 infectados por via oral com alta carga parasitária de *T. gondii* são altamente susceptíveis a infecção, apresentando intenso processo inflamatório intestinal culminando em uma ileíte fatal (LIESENFELD *et al.*, 1996). Esta alteração patológica compartilha características morfológicas e histológicas com as doenças inflamatórias intestinais (IBD) em humanos, uma vez que assim como em humanos, os animais apresentam perda da arquitetura epitelial intestinal, influxo maciço de células inflamatórias na lâmina própria e focos de necrose, e a causa do aparecimento dessas lesões é a ativação exacerbada da resposta Th1 (LIESENFELD, 2002; KASPER *et al.*, 2004).

Recentemente nós demonstramos que o tratamento prévio com STAg protege animais C57BL/6 contra patologia intestinal em infecção oral por *T. gondii* (manuscrito submetido). Além disso, estudos anteriores mostraram que o tratamento prévio com STAg protege camundongos deficientes em IL-10 de uma inflamação aguda e morte, e o fenômeno nesse caso foi devido a uma diminuição na produção de IL-12p40 pelas DCs (REIS e SOUSA *et al.*, 1999). Sabendo que STAg é capaz de promover mecanismos protetores frente a infecção por *T.gondii* e que o intestino delgado é um importante sítio de infecção por esse parasito, nós decidimos verificar alguns desses mecanismos, mediado pelo tratamento prévio com STAg na infecção oral por *T.gondii* em animais susceptíveis, C57BL/6, e resistentes, BALB/c, focando em células do intestino delgado, incluindo células de Paneth, caliciformes e secreção local de

IgA.

Primeiramente foi avaliado o parasitismo tecidual no intestino delgado, bem como no pulmão, fígado e baço de animais C57BL/6 e BALB/c pré-tratados com STAg ou PBS e infectados com *T.gondii*. Os resultados mostraram que os animais das duas linhagens apresentaram menor parasitismo nos órgãos quando pré-tratados com STAg e infectados, mostrando que o tratamento prévio com STAg induz mecanismos importantes para controlar o parasitismo nesses sítios de infecção. Foi observado ainda que os animais C57BL/6 apresentaram maior parasitismo principalmente no intestino delgado em comparação com os animais BALB/c em ambos os pré-tratamentos. Estudos prévios envolvendo camundongos BALB/c (H2^d) e C57BL/6 (H2^b) mostram que as linhagens de camundongos que expressam o haplotipo 'd' são mais resistentes à infecção pela cepa ME49 de *T. gondii* do que camundongos que expressam o haplotipo 'b' (RESENDE *et al.*, 2008). Estudos anteriores mostraram que os camundongos C57BL/6 apresentam maior parasitismo em órgãos como o cérebro e apresentam maiores alterações inflamatórias em comparação com camundongos BALB/c (SUZUKI *et al.*, 1991). Analisando a quantidade de parasitos nos órgãos, os resultados mostraram que o intestino delgado apresentou maior carga de parasitos em comparação com os outros órgãos aos 8 dias após a infecção e o fígado de ambas as linhagens apresentou uma baixa carga parasitária. Essa diferença de parasitismo pode ser explicada pelo fato de que a resposta imune contra *T.gondii* é compartimentalizada e cada tecido infectado tem sua resposta imune específica (FILISETTI; CANDOLFI, 2004), além disso, o maior parasitismo observado no intestino delgado pode ser explicado pelo fato de que o intestino delgado é um importante sítio de infecção de *T.gondii*, uma vez que na infecção por via oral, o primeiro contato do parasito com o sistema imune do hospedeiro é nesse órgão.

Com o resultado de que STAg é capaz de induzir mecanismos que diminuem o parasitismo em diferentes órgãos, foi avaliada também as alterações histológicas nos órgãos dos animais infectados das duas linhagens. Os resultados mostraram que de acordo com o fenômeno observado no parasitismo, os animais das duas linhagens tratados previamente com STAg e infectados apresentaram menor inflamação e lesões mais suaves no intestino delgado, pulmão e fígado em comparação com os animais controles. Este resultado está de acordo com os resultados previamente observados pelo nosso grupo, onde o tratamento prévio com STAg protegeu animais C57BL/6 contra patologia no intestino delgado e além disso, estudos anteriores mostraram que o pré-tratamento com STAg foi capaz de diminuir a patologia promovendo proteção de camundongos deficientes para IL-10, uma citocina com importante papel anti-inflamatório (REIS e SOUSA *et al.*, 1999). Foi observado também quanto à

patologia que os animais C57BL/6 infectados apresentaram mais inflamação e consequentemente maior quantidade de lesões especialmente no intestino delgado e fígado em comparação com os animais BALB/c. Este resultado está de acordo com nossos experimentos prévios onde a infecção por *T.gondii* induziu alterações histológicas mais acentuadas nos órgãos de animais C57BL/6 em comparação com animais BALB/c (SILVA *et al.*, 2010). Além disso, Liesenfeld *et al.*, 1996 mostraram que camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis a infecção com alta carga parasitária de *T.gondii* em comparação com os camundongos BALB/c, e um dos motivos dessa alta susceptibilidade foi o fato de que os animais C57BL/6 apresentaram maiores alterações histopatológicas intestinais, caracterizando uma ileíte letal. Os resultados do presente trabalho sugerem que o tratamento prévio com STAg é capaz de promover mecanismos protetores, diminuindo o parasitismo e patologia em importantes sítios de infecção por *T.gondii* em animais BALB/c e C57BL/6 e esse resultado foi mais evidente no intestino delgado. Com esses resultados prévios, decidimos investigar mecanismos induzidos nesse órgão e para isso foram investigadas algumas células do epitélio intestinal.

Ao quantificar as células caliciformes presentes no intestino delgado foi observado que a infecção por *T.gondii* diminuiu o número de células no órgão de ambas as linhagens. Resultados semelhantes foram vistos por Santana *et al.*, 2012, onde a infecção oral de ratos por *T.gondii* causou uma alteração na homeostase intestinal devido a uma redução no número de células caliciformes. Infecção com *Eimeria pragensis* causou hipoplasia de células caliciformes em camundongos, semelhante ao resultado observado no presente trabalho (YUNNUS *et al.*, 2004). Além disso, foi anteriormente observado que a infecção por *T.gondii*, diminuiu o número de células caliciformes que é induzida pela infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* um parasito que induz uma resposta tipo 2 (LIESENFELD *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos mostram que a infecção experimental por helmintos aumenta a secreção de mucinas e causa hiperplasia de células caliciformes (BOGERS *et al.*, 2000; MARILLIER *et al.*, 2008). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que os parasitos usados nos trabalhos são distintos e a resposta imune induzida pela infecção por *T.gondii* é predominantemente Th1 (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006), diferente da resposta Th2 induzida pela infecção por helmintos, que regula positivamente as células caliciformes (BERGSTROM *et al.*, 2008). Os resultados mostraram também que o tratamento prévio com STAg foi capaz de aumentar o número de células caliciformes que diminui devido à infecção por *T.gondii*, no intestino delgado de animais resistentes, BALB/c. Os resultados mostraram ainda que os animais BALB/c não infectados e os animais pré-tratados com STAg apresentam

maior número de células caliciformes do que os animais C57BL/6 nas mesmas condições. Os resultados sugerem que essa maior quantidade de células caliciformes observada nos animais BALB/c pode ter refletido o menor parasitismo e patologia observados nesses animais em comparação com os animais C57BL/6, ressaltando que as células caliciformes produzem mucinas que protegem o epitélio intestinal contra agentes patogênicos (FOONG; BORNSTEIN, 2009), e isso pode ter proporcionado a proteção dos animais BALB/c frente à infecção oral por *T.gondii*.

A defesa do hospedeiro na superfície de mucosa inclui a secreção de IgA, defensinas, citocinas e quimiocinas (JU; CHOCKALINGAM; LEIFER, 2009). IgA é a imunoglobulina mais importante na mucosa intestinal, e sua forma secretada é sintetizada por plasmócitos na lâmina própria, conferindo proteção contra patógenos invasores, neutralizando bactérias patogênicas e controlando comensais (MONTILLA *et al.*, 2004; SANTAOLALLA; ABREU, 2012). A infecção por via oral com *T.gondii* induz resposta de IgA específica (CHARDES *et al.*, 1993). Ao investigar a expressão de células positivas para IgA os resultados mostraram que a infecção induz secreção de IgA no intestino delgado e interessante foi o fato de que o tratamento prévio com STAg induziu um aumento na secreção de IgA intestinal nos animais BALB/c infectados por *T.gondii*. Trabalhos anteriores mostraram que a imunização intranasal com STAg em camundongos infectados por *T.gondii* induziu um aumento na expressão de IgA no jejuno e íleo dos animais, aumentando a barreira de mucosa no intestino delgado desses animais (SHEN *et al.*, 2010). Além disso, infecção por *Giardia intestinalis* aumentou a expressão de células positivas para IgA na lâmina própria de camundongos BALB/c alimentados com probióticos e infectados com a bactéria, reduzindo os danos de mucosa e promovendo uma diminuição das bactérias em camundongos infectados (GOYAL; SHUKLA, 2012). O presente estudo mostrou ainda que os animais BALB/c apresentaram maior expressão de células positivas para IgA em ambas as condições em comparação com os animais C57BL/6. Os resultados sugerem que o aumento na expressão de IgA juntamente com o aumento das células caliciformes pode ter conferido a maior proteção observada nos animais BALB/c e além disso o aumento de IgA pode ser um dos mecanismos que causaram a proteção dos animais pré-tratados com STAg.

As células de Paneth são células secretórias do epitélio intestinal, residem nas criptas de Lieberkun e contribuem para a proteção da mucosa intestinal por liberar grânulos contendo uma variedade de produtos antimicrobianos, incluindo lisozimas e α defensinas (também chamadas de criptidinas em camundongos) (OUELLETTE; SELSTED, 1996). Sabe-se que as criptidinas tem papel microbicida e estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra bactérias,

fungos, protozoários e vírus (GANZ, 2003). Nesse sentido, o presente estudo investigou se as células de Paneth e a expressão de criptidina estaria ligada com a proteção mediada pelo tratamento prévio com STAg frente a infecção por *T.gondii*. Os resultados mostraram que a infecção por *T.gondii* diminuiu significativamente a quantidade de células de Paneth no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6, porém esse fenômeno foi mais evidente para os animais BALB/c. Recentemente foi demonstrado que a infecção por *T.gondii* resultou em disbiose e eliminação das células de Paneth, as quais não foram detectadas aos 7 dias de infecção em animais C57BL/6. Uma observação importante foi que a eliminação das células de Paneth observada foi transitória, segundo os autores (RAETZ *et al.*, 2013). Em contrapartida, os resultados do presente estudo mostraram que a infecção por *T.gondii* diminuiu as células de Paneth, mas não as eliminou aos 8 dias de infecção. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que no trabalho de Raetz *et al.*, 2013 foram analisadas apenas porções do intestino delgado, as quais poderiam não ter células de Paneth detectáveis, e além disso a análise foi feita aos 7 dias de infecção, diferentemente do nosso trabalho, uma vez que analisamos toda a extensão do intestino delgado aos 8 dias de infecção. Estudos com infecção com outros patógenos mostraram resultados contrários aos observados no presente estudo. Infecção com *Trichinella spirallis* induziu um aumento do número de células de Paneth intestinais (KAMAL *et al.*, 2001), e modelo experimental de infecção por *Salmonella tiphimurium* mostrou que o número de células de Paneth aumentou em camundongos infectados com a bactéria (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Uma explicação para essa diferença seria o fato de que os patógenos utilizados são diferentes, promovendo diferentes mecanismos frente à infecção.

Foi observado também no presente estudo que o tratamento prévio com STAg foi capaz de manter o número de células de Paneth durante a infecção por *T.gondii* a níveis semelhantes aos observados nos animais não infectados, e esse fenômeno foi visto principalmente nos animais BALB/c. Além disso, os animais BALB/c não infectados apresentaram duas vezes mais células de Paneth do que os animais C57BL/6, e perante ao pré-tratamento com STAg e infecção esse número também foi duas vezes maior do que o observado nos animais susceptíveis. O pré-tratamento com STAg também foi capaz de aumentar a expressão de criptidina-5 no intestino delgado de ambas as linhagens, e os animais BALB/c apresentaram ainda maior expressão frente a infecção em comparação com os animais C57BL/6, corroborando com os resultados vistos na quantificação de células de Paneth. Foi previamente demonstrado que perante desafio oral de camundongos C57BL/6 com a cepa 76K de *T.gondii* ocorreu uma regulação positiva de mRNA de criptidina-3 e

criptidina-5 e a infecção levou a desgranulação de células de Paneth (FOUREAU *et al.*, 2010). Sabe-se que criptidina-4 e criptidina-5 são os peptídeos mais catiônicos e tem melhor atividade bactericida contra *Escherichia coli* (OUELETTE *et al.*, 1994), além disso, essas criptidinas também são capazes de matar protozoários, como o protozoário *Giardia lamblia* (ALEY *et al.*, 1994).

Uma hipótese para os resultados apresentados quanto às células de Paneth e criptidina seria que a infecção por *T.gondii* causou uma ruptura no balanço intestinal, diminuindo as células de Paneth ou, por exemplo, fazendo com que elas liberassem os grânulos, e o tratamento com STAg pode ter promovido mecanismos que aumentaram o número destas e consequentemente, os grânulos microbicidas contendo criptidina. Nesse sentido, o aumento de células de Paneth combinado com o aumento da expressão de criptidina-5 pode ter contribuído para o controle do parasitismo e consequentemente das lesões inflamatórias nos animais pré-tratados com STAg e infectados por *T.gondii*.

As células - tronco intestinais residem entre as células de Paneth na base das criptas e estão constantemente se dividindo e se diferenciando em diversos tipos celulares para manter a população celular intestinal (SNIPPERT *et al.*, 2010). Com o resultado de que animais pré-tratados com STAg apresentam maior quantidade de células caliciformes e de células de Paneth em infecção por *T.gondii*, foi investigado o nível de proliferação celular, por meio da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), para verificar o efeito do tratamento prévio com STAg na proliferação celular no intestino delgado. Os resultados mostraram que naturalmente ocorrem altos níveis de proliferação celular no intestino de ambas as linhagens de animais. A infecção por *T. gondii* parece interferir minimamente na taxa de proliferação celular, entretanto uma pequena diminuição foi observada, e ainda o tratamento com STAg antes da infecção parece promover mecanismos que restauram o nível de proliferação visto nos animais não infectados. De maneira interessante, as marcações positivas para PCNA foram vistas ao longo de todo o epitélio intestinal, porém foram observadas mais marcações na base das criptas intestinais onde estão localizadas as células tronco intestinais. Nesse sentido, pode ser que o tratamento com STAg tenha induzido mecanismos que levaram a um aumento dos eventos de proliferação celular que culminaram com o aumento de células caliciformes e de células de Paneth no intestino delgado dos animais infectados. Modelo de infecção por *Salmonella* mostrou que a infecção pela bactéria aumentou os eventos de proliferação celular intestinais, e esses eventos foram mais observados na base das criptas e os autores correlacionaram o aumento das células de Paneth com o aumento de proliferação nas criptas (RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados mostram que animais BALB/c naturalmente apresentam mecanismos protetores mais evidentes na mucosa intestinal em comparação com animais C57BL/6, como maior quantidade de células caliciformes e de Paneth e apresentam também maior expressão de IgA, que podem melhor controlar *T.gondii* em uma infecção intestinal. Além disso, STAg é capaz de promover mecanismos protetores, evidenciados pelo menor parasitismo e patologia vistos nos animais BALB/c e C57BL/6, e esses mecanismos eficazes induzidos pelo extrato antigênico de *T.gondii*, podem ser em parte, mediados pelo aumento de células caliciformes produtoras de muco, pelo aumento de células de Paneth e seus peptídeos antimicrobianos, como as criptidinas e também pelo aumento na secreção de IgA no intestino delgado de ambas as linhagens de camundongos infectados oralmente por *T.gondii*.

7. CONCLUSÕES

- O tratamento prévio com STAg induz uma diminuição do parasitismo e patologia nos órgãos periféricos de animais BALB/c e C57BL/6, e os animais BALB/c apresentam menor patologia e parasitismo principalmente no intestino delgado em comparação com os animais C57BL/6 em infecção por *T.gondii*;
- O tratamento prévio com STAg induz um aumento do número de células caliciformes nos animais BALB/c e C57BL/6, e esse aumento é mais evidente nos animais BALB/c. Os animais BALB/c naturalmente apresentam maior quantidade de células caliciformes em comparação com os animais C57BL/6;
- O tratamento prévio com STAg induz um aumento do número de células positivas para IgA no intestino delgado de animais BALB/c e esses animais apresentam maior expressão de IgA em comparação com os animais C57BL/6 em infecção por *T.gondii*;
- O tratamento prévio com STAg induz um aumento do número de células de Paneth nos animais BALB/c e C57BL/6 e esse aumento é mais evidente nos animais BALB/c. Os animais BALB/c apresentam naturalmente maior quantidade de células de Paneth em comparação com os animais C57BL/6;

- O tratamento prévio com STAg induz um aumento da expressão de criptidina-5 no intestino delgado de animais BALB/c e C57BL/6. Os animais BALB/c apresentam maior expressão de criptidina em comparação com os animais C57BL/6 em infecção por *T.gondii*;
- O índice de proliferação celular no intestino delgado parece diminuir frente a infecção por *T.gondii* e o tratamento prévio com STAg parece promover aumento dessa proliferação.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**. v.144, p. 2725–2729, 1990.

AHUJA, S. S.; PALIOGIANNI, F.; YAMADA, H.; BALOW, J. E.; BOUMPAS, D. T. Effect of transforming growth factor-beta on early and late activation events in human T cells. **The Journal of Immunology**. v. 150, p. 3109-18, 1993.

ALEY, S. B.; ZIMMERMAN, M.; HETSKO, M. E.; SELSTED, F. D.; GILLIN. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. **Infection and Immunity**.v. 62, p. 5397–5403, 1994.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature reviews Immunology**, v.5, n. 2, p.162-170, 2005.

ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; SHER, A. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. **Immunology Reviews**.v.201, p. 26–34, 2004.

BARKER, N.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes & Development**. v.22, p. 1856-1864, 2008.

BENSON, A.; PIFER, R.; BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V.; YAROVINSKY, F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host & Microbe**. v. 6, p.187–196, 2009.

BERGSTROM, K.S.B.; GUTTMAN, J.A.; RUM, I. M.. Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. **Infection and Immunity**. v. 76, p.12–20, 2008.

BEVINS, C.L.; SALZMAN, N.H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature reviews Microbiology**. v. 9, n. 356-368, 2011.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p. 213-222, 2003.

BOGERS, I.; MOREELS, T.; MAND, J.; VROLIX, G.; JACOBS, W.; PELCKMANS, P.; VAN MARCK, E. *Shistosoma mansoni* infection causing diffuse enteric inflammation and damage of the enteric nervous system in the mouse small intestine. **Neurogastroenterology and Motility**. v.12, p.431–440, 2000.

BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 535-544, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.7; p.72:248-54, 1976.

BUZONI-GATEL, D.; WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in Parasitology**.v. 22,p. 448-52, 2006.

CAMARGO, M.E. Toxoplasmosis. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**, v., n., p.165-174, 1996.

CARRUTHERS, V. B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitology International**. v. 48, n. 1, p. 1-10, 1999.

CHARDES, F.; VELGE-ROUSSEL, P.; MEVELEC, M.N.; MEVELEC, D.; BUZONI-GATEL.; BOUT, D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. **Immunology**, v. 78, p. 421-429, 1993.

CHARDES, T.; BUZONI-GATEL, D.; LEPAGE A.; BERNARD, F.; BOUT, D.T. *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut

nteraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. **The Journal of Immunology**. v. 153, p.4596–603, 1994.

COUTINHO, L.B.; GOMES, A.O.; ARAÚJO, E.C.; BARENCO, P.V.; SANTOS, J.L.; CAIXETA, D.R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; FERRO, E.A.; SILVA, N.M. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **International Journal for Parasitology**. v.42, p. 341-352, 2012.

DENKERS, E. Y. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**. v. 1, p. 699-708, 1999.

DOGRUMAN-AL, F.; FIDAN, I.; CELEBI, B.; YESILYURT, E.; ERDAL1, B.; BABUR, C.; KUSTIMUR, S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.1, p.16-19, 2011.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57 – 72, 2004.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. **CRC Press**, 1988.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachizoites, bradizoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 209-213, 2008.

EGAN, C.E.; CRAVEN, M.D.; LENG, J.; MACK, M.; SIMPSON, K.W.; DENKERS, E.Y. CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during *Toxoplasma gondii* infection. **Mucosal Immunology**. v. 6, n.527–535, 2009.

ELMORE, A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY. D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 355 – 359, 2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annals Institute Super Sanita**. v.40, p. 71–80, 2004.

FOONG, J.P.P.; BORNSTEIN, J.C. mGluR1 receptors contribute to non-purinergic slow excitatory transmission to submucosal VIP neurons of guinea-pig ileum. **Frontiers in Neuroscience**. v.3, 2009.

FOUREAU, D.M.; MIELCARZ, D.W.; MENARD, L.C.; SCHULTHESS, J.; WERTS, C.; VASSEUR, V.; RYFFEL, B.; KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. v.184, p.7022 7029, 2010.

FRANCISCO, F.M.; DE SOUZA, S.L.; GENNARI, S.M.; PINHEIRO, S.R.; MURADIAN, V.; SOARES, R.M. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the Sao Paulo municipality, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p. 167-170, 2006.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 3, p.710–720, 2003.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, p.286–292, 1991.

GOYAL, N.; SHUKLA, G. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-Infected BALB/c Mice. **Digestive Diseases and Science**, 2012.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p.634-640, 2002.

JU, C.H.; CHOCKALINGAM, A.; LEIFER, C.A. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infection Immunology**. v. 183,p. 7420–7427, 2009.

KAMAL, M.; WAKELIN, D.; OUELLETTE, A.J.; SMITH, A.; PODOLSKY, D.K.; MAHIDA, Y.R. Mucosal T cells regulate Paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of *T. spiralis*-infected mice. **Clinical Experimental Immunology**. v.126, p.117-25, 2001.

KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S., LUANGSAY, S.; MENNECHET, F.; MINNS, L.; RACHINEL, N.; RONET, C;UZONI-GATEL, D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Internation Journal for Parasitology**. v.34, p. 401-409, 2004.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Ed.: Atheneu. 11^a ed. São Paulo, p. 147-156, 2005.

KHAN, I.A.; SCHWARTZMAN, J.D.; MATSUURA, T.; KASPER, L.H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 13955-13960, 1997.

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. **Microbes and Infection**, v.10, p. 978-984, 2008.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI,C.; GARWEG, J.G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**. v. 23, p. 272-274, 2004.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v.12, n 3, p.292-300, 2010.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG,mB. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE. F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LIESENFELD, O.; DUNAY, I.R.; KLAUS., Infection with *Toxoplasma gondii* Reduces Established and Developing Th2 Responses Induced by *Nippostrongylus brasiliensis* Infection. **Infection and immunity**. v. 72, n. 7, p.. 3812–3822, 2004.

LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.; NGUYEN, T.A.; PARKHE, C.V.; WATANABE, H.; ABO, T.; SHER, A.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. 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, p. 365-376, 1999.

LIESENFELD, O.; KOSEKFL, J.; REMINGTON, J.S.; SUZUKI, Y. Association of CD4 + T Cell-dependent, interferon-y-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.597-607,1996.

LIESENFELD, O.Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease?. **The Journal of Infectious Diseases**. v.185, 2002.

LUANGSAY, S.; KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; MINNS, L. A.; MENNECHET, F. J.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**. v. 125, p. 491-500, 2003.

MAIA, L.P.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; OLIVEIRA, K.R.; NOMELINE, Q.S.S.; AIDAR, F.L.M.; FERREIRA, G.L.S. Soroprevalência de toxoplasmose na região do pontal do triângulo mineiro, Minas Gerais, Brasil. **Revista de patologia tropical**, v. 41, n.4, p. 457-464, 2012.

MARILLIER, R.G.; MICHELS, C.; SMITH, E.M. IL-4 / IL-13 independ goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections. **BMC Immunology** v.9, p.231–237, 2008.

MARTINEZ RODRIGUEZ, N.R.; ELO, I. M. D.; HUYNH, A.; DOMINGUEZ, T.; LAM, A.H.; CARCAMO-MOLINA, D.; NASER, Z.; DESHARNAIS, R.; SALZMAN, N.H.; PORTER, E. Expansion of Paneth cell population in response to enteric *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. **The Journal of Infectious Immunology**.v. 80, p. 266-75, 2012.

.

MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M. P.; DARDÉ, M. L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis?. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 299–303, 2008.

MELAMED, J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 358-363, 2009.

MENNECHET, F.J.D.; KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; MINNS, L.A.; LUANGSAY, S.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4⁺ T cells. **European Journal of Immunology**. v. 34, p.1059–1067, 2004.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**. v.27, n. 2, p. 283-287,1980.

MONTILLA, N.A.; BLAS, M.P.; SANTALLA,M.L.; VILLA, J.M.M. Mucosal immune system: A brief review. **Revisión Inmunología**. v.23, n.2, p. 207-216, 2004.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v. 363, p. 1965–76, 2004.

MORRISSETTE, N.S.; SIBLEY, L.S. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 21–38, 2002.

MÜLLER, C.A.; AUTENRIETHB, I.B.; PESCHELB, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. **Cellular and Molecular Life Science**. v.62, p.1297–1307, 2005.

MUÑOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological reviews**. v. 240, p.269-285, 2011.

NICOLLE, C.; MANCEUX, L. Sur une infection à corps de *Leishman* (ou organismes voisins) du *gondi*. Les **Comptes Rendus de l Academy des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

OUELLETTE, A.J.; HSIEH, M.M.; NOSEK, M.T.; CANO-GAUCI, D.; HUTTNER, K.M.; BUICK, R.N.; SELSTED. primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. **Infection and Immunity**. V. 62, p.5040–5047

OUELLETTE, A.J.; SELSTED, M.E. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. **The Faseb Journal**. v.10, p.1280-1289, 1996.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.1385-1394, 2009.

RAETZ, M.; HWANG, S.H.; WILHELM, C.L.; KIRKLAND, D.; BENSON, A.; STURGE, C.R.; MIRPURI, J.; VAISHNAVA, SOU B.; DEFRANCO, A.L.; GILPIN, C.J.; HOOPER, L.V.; YAROVINSKY, F. Parasite-induced T(H)1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**. v. 14,p. 136-142, 2013.

RAFFATELLU, M.; SANTOS, R.L.; VERHOEVEN, D.E.; GEORGE, M.; WILSON, R.P.; WINTER, S.E. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. **Nature medicine** . v.14, p.421-428, 2008.

REIS E SOUSA, C.; YAP, G.; SCHULZ, O.; ROGERS, N.; SCHITO, M.; ALIBERTI, J.; HIENY, S.; SHER, A. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. **Immunity**. v. 11, p.637-647, 1999.

RESENDE, M. G.; FUX, B.; CAETANO, B. C.; MENDES, E. A.; SILVA, N. M.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T. The role of MHC h2^d/h2^b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v 80, p. 85 – 99, 2008.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v.21, p.458-472, 2006.

SANT'ANA, D.M.; GÓIS, M.B.; ZANONI, J.N.; DA SILVA, A.V.; DA SILVA, C.J.; ARAÚJO, E.J. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Internation Journal of Experimental Pathology**. v.93,p. 279-286, 2012.

SANTAOLALLA, R.; ABREU, M.T. Innate immunity in the small intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.28, p.124-129, 2012.

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

SEGUNDO, G.R.S.; SILVA, D.A.O.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13 – 17, 2004.

SHANAHAN, M.T.; VIDRICH, A.; SHIRAFUJI, Y.; DUBOIS, C.L.; HENSCHEN-EDMAN A.; HAGEN, S. J. Elevated expression of Paneth cell CRS4C in ileitis-prone SAMP1/YitFc mice: regional distribution, subcellular localization, and mechanism of action. The **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, p.7493-7504, 2010.

SHEN, J.Y.; YIN, G.R.; LIU, H.L.; YIN L.T.; MENG, X.L.; WANG, H. L. Kinetics of IgA secreting cells and sIgA in small intestine of mice induced by intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* STAg. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**. v. 28p.411-415, 2010.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.364, p.2749–2761, 2009.

SILVA, N. M.; MANZAN, R. M.; CARNEIRO, W. P.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, 2010.

SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C. M.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: The role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v.123, p. 65-72, 2009.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v.107, n.2, p, 253-260, 2010.

SNIPPER, T. H. J.; VAN DER FLIER, L. G.; SATO T.; VAN ES, J. H.; VAN DEN BORN, M.; KROON-VEENBOER, C., BARKER, N., KLEIN A. M.; VAN RHEENEN, J, SIMONS, B. D.; CLEVERS, H. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. **The Cell**. v.143, p.134-44, 2010.

SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA, M. R.; TEVA, A.; PATEL, B. N.; KLEIN, C. H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine Hyg**, v.72, p. 37-41, 2005.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. In contrasto nelle lesioni anatomiche d una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista Academia Ciência**, v.3, n. 109, p. 109-112, 1908.

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L. E.; LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLI, E. 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, p. 5375-82, 2000.

SUZUKI, Y.; JOH, K.; ORELLANA, M. A.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology**. v.74, n.4, p.732-739, 1999.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 364-369, 2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

VARELLA, I.S.; WAGNER, M.B.; DARELA, A.C.; NUNES, L.M.; MULLER, R.W. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women. **Journal of Pediatrics**. v. 79, p. 69-74, 2003.

WEISS, L.M.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**.v. 39, p.95-901, 2009.

YUNUS, M.; HORII, Y.; MAKIMURA, S.; SMITH, A.L. Murine goblet cell hypoplasia during *Eimeria pragensis* infection is ameliorated by clindamycin treatment. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.. 67, 311–315, 2004

9. ANEXO I

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 120/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 047/10**

Projeto Pesquisa: "Mecanismos imunoreguladores de ácido retinóico e frações antigênicas do Antígeno Solúvel de Taquizoítas (STAg) em infecção oral por *Toxoplasma gondii*".

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 18 de agosto de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente do CEUA/UFU