



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

MARCELO BIONDARO GÓIS

Toxoplasma gondii causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos

Maringá
2015

MARCELO BIONDARO GÓIS

Toxoplasma gondii causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientadora: Professora Doutora Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana

Co-orientador: Professor Doutor Marcílio Hubner de Miranda Neto

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Góis, Marcelo Biondaro.

G616t *Toxoplasma gondii* causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos / Marcelo Biondaro Góis. -- Maringá, 2015.

115 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana.

Coorientador: Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto

Tese (doutor em Biologia) - Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.

1. Doenças infecciosas. 2. Zoonose. 3. Sistema Nervoso Entérico - Plexo submuso. 4. Toxoplasmose experimental. 5. Infecção Crônica. I. Sant'Ana, Débora de Melo Gonçalves, orient. II. Miranda Neto, Marcílio Hubner, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada.

616.614 CDD 21.ed.

616.614

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO BIONDARO GÓIS

Toxoplasma gondii causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana
Universidade Estadual de Maringá(Presidente)

Prof. Dr. Aristeu Vieira Da Silva
Universidade Estadual de Feira de Santana

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Sônia Trannin de Mello
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2015.

Local de defesa: Sala 08, bloco H 79, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao grande amigo e
incentivador Marcelo Carmona (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desta tese. Desejo aqui, manifestar minha gratidão a todos eles e de forma particular:

A minha orientadora, Professora Doutora Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, uma pessoa exemplar com o Dom de ensinar. Pelo apoio, disponibilidade, saberes que transmitiu, opiniões e críticas. Agradeço, em especial, a confiança depositada e por honrar-me com diversas responsabilidades que favoreceram ainda mais meu desenvolvimento profissional.

Ao meu Co-orientador Prof. Marcílio Hubner de Miranda Neto, mestre e amigo, obrigado pelos conselhos, incentivo na busca pelo crescimento, e pelo exemplo de garra, determinação.

Aos amigos do grupo de pesquisa que contribuíram para a construção deste trabalho, em especial: Aline Rosa Trevizan, Cristina Lorena Massocato, Suellen Laís Vecentino Vieira, LainyLeiny de Lima, Larissa Renata Oliveira Bianchi, Larissa Schnaider, Eliane Muniz, Elen Paula Leatte, Barbara Fonseca e Almeida Silva, Leticia Sarturi Pereira Severi, Ellen Pollyanna Alexandre Fernandes, Neide Martins Moreira, Caroline Felício Braga, Paulo da Silva Watanabe e Marcelo Alberto Elias.

Aos meus amigos do Museu Dinâmico Interdisciplinar MUDI pela contribuição para o meu aprimoramento enquanto extensionista, em especial ao Gilberto Gumieri, Joao Batista Alves de Assis, José Ribeiro da Costa, Margarete Lopes Iung, Marilaine Correa Tenório Calvi, Cleonice Aparecida Tenório, Eneias Ramos de Oliveira, Reinaldo de Castro Soriani, André Schmidt, Prof. Celso Ivam Conegero, Profa. Idalina Diair Regla, Profa. Carmem Patrícia Barbosa e todos os colegas monitores.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada (PGB) pela oportunidade de cursar doutorado, em especial as servidoras Maria Estela Afonso e Márcia Helena Leonel, pela atenção e apoio.

Aos servidores do Departamento de Ciências Morfológicas:

- Maria Vilma Moraes de Sarro, Marcelo Vlademir Piloto e Liana Ribeiro Zanzarini pela colaboração durante meus estudos de anatomia humana e estágio de docência;
- Cleonira Sarro, Maria dos Anjos Moreira Fortunato, Maria Euride Carlos Cancino e Maria

AngelaMoreira da Costa pelo auxílio no processamento dos materiais para microscopia;

- José Antônio de Souza pelo auxílio na captura de imagens e utilização dos programas de análise;

- WaldmerReccanelloFacina, Antonio Paulo Merceno, pelos encaminhamentos de documentos;

- As professoras Sônia Trannin de Mello e Larissa Renata de Oliveira Bianchi pela supervisão e ensinamentos durante meu estágio de Docência na Disciplina de Anatomia Humana.

Aos meus colegas da pós-graduação em Biologia Comparada pelos conhecimentos compartilhados na preparação e apresentação de seminários, durante as disciplinas e também pelos momentos de confraternização.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, pelas excelentes disciplinas oferecidas durante o curso de pós-graduação. Em especial ao Professor Luiz Antonio de Souza que gentilmente permitiu que usasse o micrótomo de seu laboratório.

Aos amigos Prof. Dr. Eder Paulo Belato Alves e Profa. Dra. Angela Maria Pereira Alves, pela ajuda com a captura das fotos no microscópio confocal e pelas sugestões no momento da apresentação do projeto e cronograma para defesa da tese, que muito contribuíram para o bom andamento da pesquisa.

A Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali e ao Prof. Eder Paulo Belato Alves pelas valiosas contribuições no momento do Exame Geral de Qualificação.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu realização deste projeto.

A minha amiga Catchia Hermes-Uliana, pela valiosa contribuição a este trabalho e pela ajuda em todas as horas que foram necessárias.

Aos meus familiares pelo apoio oferecido durante toda minha vida acadêmica, aos meus pais pela educação de berço e estímulo para o bom aproveitamento dos ensinamentos dos professores que se fizeram presentes em todas etapas de minha formação, e em especial a minha filha Maria Isabel Monfardini Góis, motivo maior de todo o meu propósito nesta tarefa.

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo".

O Pequeno, Saint-Exupéry

Toxoplasma gondii causa alterações na túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos

RESUMO

Introdução: Doenças inflamatórias do intestino são caracterizadas por alterações que afetam as células da mucosa intestinal, as células caliciformes, células do sistema imune local, além de causar danos às células do sistema nervoso entérico. A secreção no epitélio intestinal é coordenada pela ação do plexo submucoso do sistema nervoso entérico, por meio de mediadores químicos produzidos e liberados por enterócitos, linfócitos e células caliciformes, que interagem com neurônios e células da glia entérica regulando a mucosa intestinal no intuito de ampliar a resposta imunobiológica, facilitar o trânsito intestinal e promover uma ação direta contra agentes infecciosos, dentre eles, o *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, zoonose de distribuição mundial. **Objetivo:** Investigar os efeitos da infecção crônica causada pelo *T. gondii* sobre a túnica mucosa, tela submucosa e o plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus*, distribuídos em grupo controle (GC), que receberam um mL de solução salina estéril por via oral e grupo infectado (GI), inoculados com solução contendo 500 oocistos da cepa ME-49 de *T. gondii* em um mL de água destilada pela mesma via. Trinta e seis dias após, foram submetidos ao procedimento anestésico, seguido pela eutanásia. Amostras do jejuno e do cólon proximal foram coletadas, fixadas e submetidas ao processamento histológico para avaliação da túnica mucosa e tela submucosa, coradas pelas técnicas de Hematoxilina eosina, Periodic Acid Schiff e Alcian Blue. Foram elaborados preparados totais do plexo submucoso para evidenciar neurônios e células da glia entérica através das técnicas de Giemsa, histoquímica para enzima NADH-diaforase e imunohistoquímica para evidenciar o polipeptídeo intestinal vasoativo e a proteína pan glial S-100 β , respectivamente. Foram coletados órgãos para realização de bioprova em camundongos. **Resultados:** O protocolo experimental foi eficaz na indução da infecção nos ratos do GI, nos quais anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em exame sorológico e cistos teciduais foram isolados por meio da bioprova. No jejuno observamos: redução de 12,3% da espessura da túnica mucosa; aumento de 7,9% da espessura da tela submucosa; 7,10% na altura dos vilos e 17,37% da profundidade das criptas. O número de neurônios evidenciados pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase positivos sofreu redução de 15,38 e 40,71%, enquanto as áreas dos corpos celulares aumentaram 5,57 e 23,60%, respectivamente. Houve redução de 19% de células da glia entérica no plexo submucoso do jejuno. No cólon proximal, houve aumento na espessura da túnica mucosa e da profundidade das criptas em 48,14 e 43,02%, respectivamente. A população total de neurônios submucosos evidenciados pela técnica de Giemsa reduziu em 16,20%. Já os neurônios evidenciados pela imunohistoquímica para polipeptídeo intestinal vasoativo aumentaram em 25,95%. Os linfócitos intra-epiteliais aumentaram 62,86%. As células caliciformes produtoras de sulfomucinas reduziram em 22,87%. **Conclusão:** A infecção crônica provocada pelo *Toxoplasma gondii* causou alterações significativas na túnica mucosa e tela submucosa, provocou a morte de células da glia entérica no plexo submucoso do jejuno e em neurônios submucosos do jejuno e do cólon proximal de ratos.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Sistema Nervoso Entérico. Células da Glia Entérica. Bioprova.

Toxoplasma gondii causes alterations in tunica mucosa and submucosal plexus of the jejunum and proximal colon of rats

ABSTRACT

Introduction: Intestinal inflammatory diseases are characterized by alterations that affect the intestinal mucosal cells, goblet cells, local immune system cells and enteric nervous system cells. The secretion of the intestinal epithelium is coordinated by the action of the submucosal plexus through chemical mediators, produced and released by enterocytes, lymphocytes and goblet cells that interact with neurons and enteric glial cells (EGCs), regulating the intestinal mucosa to amplify the immunobiological response, facilitate the intestinal transit and provide a direct action against infectious agents, among them *Toxoplasma gondii*, an etiological agent of toxoplasmosis, a worldwide-spread zoonosis.

Objective: To investigate the effects of the chronic infection caused by *T. gondii* on the mucosal tunica, tela submucosa and submucosal plexus of the jejunum and proximal colon of rats. **Methodology:** 20 *Rattus norvegicus* were utilized, and distributed into a control group (CG), which received one mL of sterile saline solution orally, and an infected group (IG), orally inoculated with a solution containing 500 oocysts of ME-49 strain of *T. gondii* in one mL of distilled water. Thirty-six days later, they were submitted to anesthetic procedure and euthanized. Samples of the jejunum and the proximal colon were harvested, fixed and submitted to histological processing to evaluate the submucosal tela and tunica using Hematoxylin eosin, Periodic Acid Schiff and Alcian Blue staining techniques. Total preparations of the submucosal plexus were also done with Giemsa, histochemistry for NADH-diaphorase enzyme and immunohistochemistry to stain nervous and enteric glial cells, vasoactive intestinal polypeptide and S-100 β pan glial proteins, respectively. Organs were harvested to perform bioassays in mice. **Results:** The experimental protocol was efficient to induce infection in rats of IG in which anti-*T. gondii* antibodies were detected in a serum exam and tissue cysts were isolated by bioassay. The following was observed in the jejunum: decrease of 12.3% of the tunica mucosa thickness, increase of 7.9% of the submucosal tela, 7.10% of villus height and 17.37% of crypt depths. The number of stained neurons by Giemsa and NADH-diaphorase decreased 15.38% and 40.71%, whereas the areas of the cell bodies increased 5.57 and 23.60%, respectively. There was a 19% reduction in the number of EGCs in the jejunum submucosal plexus. In the proximal colon, the tunica mucosa thickened 48.14% and the crypts deepened 43.02%. The total population of submucosal neurons stained by Giemsa decreased 16.20%. However, the neurons stained by immunohistochemistry for vasoactive intestinal polypeptide increased 25.95%. Intra-epithelial lymphocytes increased 62.86%. Goblet cells capable of producing sulfomucins were reduced by 22.87%. **Conclusion:** The chronic infection caused by *T. gondii* significantly altered the tunica mucosa, submucosal tela and induced the death of neurons in the submucosal plexus of the jejunum and proximal colon of rats.

Keywords: Toxoplasmosis. Enteric Nervous System. Enteric glial cells. Bioassay.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.2 Toxoplasmose.....	21
2.3 Estratos que compõe a parede do intestino delgado, grosso e Sistema Nervoso Entérico: breve descrição	22
2.3.1 Túnica mucosa	22
2.3.2 Células do epitélio intestinal.....	23
2.3.2.1 Enterócitos	23
2.3.2.2 Células caliciformes	24
2.3.2.3 Linfócitos intra-epiteliais (LIEs).....	24
2.3.3 Tela submucosa.....	25
2.3.4 Sistema Nervoso Entérico	26
2.3.5 Plexo submucoso.....	27
2.3.6 Túnica muscular	29
2.3.7 Túnica serosa	30
2.4 Respostas intestinais a diferentes modelos experimentais de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	30
3. Referências	34
CAPÍTULO 2	44
Infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> induz morte de neurônios entéricos submucosos e alterações na túnica mucosa no cólon proximal de ratos	45
1 Introdução	46
2 Material e métodos	47
3 Resultados	51
4 Discussão	55
Referências.....	60
CAPÍTULO 3	65
Toxoplasmose causa alterações na túnica mucosa, tela submucosa e no plexo submucoso do jejuno de ratos	66
1 Introdução	67
2 Material e métodos	68

3 Resultados	73
4 Discussão	79
Referências.....	87
ANEXO 1.....	94
<i>Guidelines for Author - International Journal of Experimental Pathology</i>	94
ANEXO 2.....	103
Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal.	103
ANEXO 3.....	104
<i>Guidelines for Author - Acta Tropica</i>	104

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Tese apresentada segundo normas aprovadas pelo Conselho Acadêmico do Curso de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da UEM.

Resolução n°. 068/2012-PGB aprovada em 04/09/2012.

1. Introdução

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), agente etiológico da toxoplasmose, é um membro do filo Apicomplexa que inclui outros protozoários, parasitos intracelulares obrigatórios que compartilham várias características estruturais e funcionais. Está entre os parasitos de maior sucesso, infecta 10-50% da população humana e diversos animais homeotermos. Embora a infecção seja muitas vezes considerada como assintomática, a toxoplasmose aguda é caracterizada pela rápida reprodução e disseminação de taquizoítos em células de diferentes tecidos do corpo do hospedeiro, podendo causar febre, fadiga e dor de cabeça. Quando adquirida durante a gestação pode trazer graves complicações para o feto incluindo malformações e aborto.

Os seres humanos infectam-se pela ingestão de cistos contidos em carne crua ou mal cozida. Podem também infectar-se com água ou alimentos contaminados por oocistos eliminados por felídeos. Quando ingeridos, ao chegar no trato gastrintestinal (TGI), o parasito encontra a barreira epitelial constituída por enterócitos, linfócitos intra-epiteliais (LIEs) e as células caliciformes que desempenham um importante papel mecânico e imunobiológico. Todo esse aparato, na maioria das vezes, não é capaz de evitar a progressão da infecção e o parasito se instala, multiplica e invade células vizinhas disseminando-se via sanguínea e linfática para todo o hospedeiro.

No interior dos cistos, bradizoítos se reproduzem lentamente e sobrevivem em diversos órgãos do corpo, incluindo o cérebro, músculos e vísceras intestinais. A presença destes cistos induz à inflamação local causando a produção de anticorpos e citocinas que recrutam células do sistema imune as quais mobilizam respostas celulares que muitas vezes, além de neutralizar o parasito, causam danos no próprio hospedeiro.

Evidências indicam que doenças inflamatórias do intestino são caracterizadas por alterações que afetam as células epiteliais, imunológicas, neurônios e células da glia entérica (EGCs).

Vários autores demonstraram que a toxoplasmose modifica o TGI, porém ainda são poucos os estudos sobre as alterações morfológicas e quantitativas dos estratos que compõem a parede intestinal e dos neurônios entéricos tanto em situações de infecção aguda quanto crônica.

Desta forma, buscamos compreender os danos causados pelo parasito e as respostas locais frente à infecção pelo *T. gondii*, com o objetivo de avaliar os danos apresentados na fase crônica nos componentes da túnica mucosa, tela submucosa e plexo submucoso do jejuno e do cólon proximal de ratos infectados por oocistos de *T. gondii* por meio de análises quantitativa e morfométricas.

Esta tese é apresentada em três capítulos, sendo uma breve introdução seguida por revisão bibliográfica no primeiro capítulo, e dois artigos originais apresentados no segundo e terceiro capítulos.

2.RevisãoBibliográfica

2.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe *Sporozoa*, Subclasse *Coccidia*, Ordem *Eucoccidiida*, Família *Sarcocystidae* Subfamília *Toxoplasmatinae* (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004) foi descrito primeiramente no Brasil por Splendore (1908) em coelho e por Nicolle e Manceaux (1908) no Norte da África em um roedor (*Ctenodactylus gundi*). É um parasito intracelular obrigatório e está entre os de maior sucesso, com 10-50% da população humana infectada (TENTER et al., 2000; HALL et al., 2001; KIM; WEISS, 2004; DUBEY, 2007; DUBEY, 2010; COHEN; DENKERS, 2014; FLEGR et al., 2014). É capaz de infectar todas as espécies de animais homeotérmicos, incluindo seres humanos e animais de importância econômica (TENTER et al., 2000; CARRUTHERS, 2002; SIBLEY et al., 2009; DUBEY, 2010; FLEGR et al., 2014).

Ajioka et al. (2001) descreveram a estrutura populacional do *T. gondii*, concluíram que é altamente clonal, indicando que na natureza a reprodução assexuada é predominante e a divergência genômica entre os genótipos é de cerca de 1% apenas. Utilizando técnicas moleculares Howe e Sibley (1995) descreveram um sistema de tipificação de cepas, baseado na diferenciação *multilocus* por PCR-RFLP, que possibilitou subdividir a população deste parasito em três linhagens clonais distintas, denominadas I, II e III. Após esta definição, as classificações passaram a ser realizadas com apenas um *locus*, o gene SAG2, localizado no cromossomo VIII e que codifica entre outros, o antígeno de superfície p22 do parasito (MONDRAGON et al., 1998; AJIOKA et al., 2001; da SILVA et al., 2005; SABAJ et al., 2010). Freyre et al. (2001) classificaram os genótipos de acordo com o fenótipo para virulência, sendo as cepas do genótipo I altamente virulentas, genótipo II de virulência intermediária e genótipo III de baixa virulência. As cepas do genótipo II e III levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em ratos e camundongos, enquanto as do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, causando níveis significativos de mortalidade (HOWE; SIBLEY, 1995; DUBEY, 2010).

Durante o ciclo de vida, o *T. gondii* pode se alternar em hospedeiros definitivos e intermediários. Os definitivos são membros da família *Felidae* e os intermediários outros animais homeotérmicos (BARRAGAN; SIBLEY, 2003) como demonstrado na figura 1. Nos Felídeos, após a ingestão de alimentos contendo cistos teciduais ou oocistos, os bradizoítos ou

esporozoítos liberados no intestino infectam os enterócitos, multiplicam-se por uma série de esquizogonias e diferenciam-se em gametas masculinos e femininos (WEISS; KIM, 2007; DUBEY, 2010). A fusão desses gametas resulta na formação de um zigoto diplóide (oocisto) não esporulado. O oocisto é liberado no ambiente nas fezes do animal, esporula formando dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. Portanto, para cada oocisto, oito progênies haplóides são formadas podendo resultar em oito esporozoítos (WONG; REMINGTON, 1994; SIBLEY et al., 2009).

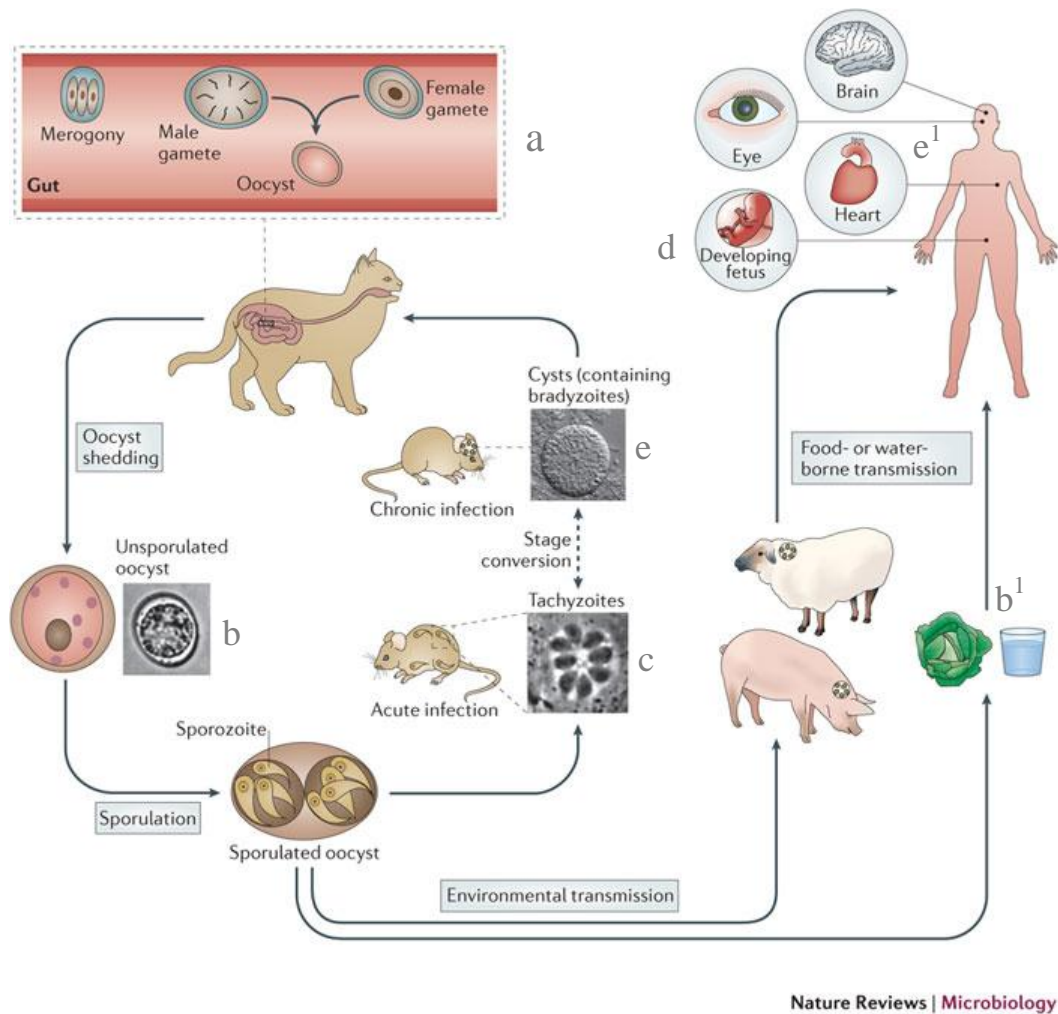


Figura 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. A reprodução sexuada ocorre em enterócitos da túnica mucosa do intestino de felídeos (a) e resulta na eliminação de oocistos (b), que esporulam naturalmente no ambiente originando esporozoítos, estes podem contaminar água e alimentos (b¹). Durante a fase aguda da infecção (c), taquizoítos replicam-se rapidamente por endodiogenia e podem ser transmitidos da mãe para o feto (d). Na fase crônica cistos (e) contendo bradizoítos são formados nos tecidos de vários órgãos do hospedeiro (e¹). (adaptado de HUNTER; SIBLEY, 2012).

Na reprodução assexuada (endodiogenia) duas células-filhas são formadas no interior da célula-mãe que lisa ao final do processo liberando as células-filhas. Esta forma de divisão ocorre durante a formação de taquizoítos e bradizoítos do parasito (WEISS; KIM, 2007; DUBEY, 2010). O ciclo celular do parasito durante a endodiogenia possui quatro fases facilmente detectadas por marcadores de ciclo celular: G1, S, M e C. A fase G1 é marcada pela replicação do complexo de Golgi, seguido da translocação do centróssomo da parte anterior para a posterior do núcleo. A fase S é iniciada com a duplicação do centróssomo, coincidindo com o início da duplicação do material genético. Na fase M ocorre a formação de dois novos complexos apicais rudimentares, que irão guiar o complexo interno de membrana, definindo desta forma, as duas células-filhas dentro da célula-mãe. Progressivamente, na fase C, o núcleo termina o processo de replicação e as células-filhas estendem-se, consumindo toda a célula-mãe, dando origem a dois novos parasitos (GAJI et al., 2001; FRANCIA; STRIEPEN, 2014) (Figura 2). De acordo com Soldati e Meissner (2004) e Dos Santos et al. (2011), taquizoítos de *T. gondii* invadem e egressam de células hospedeiras, preferencialmente, na fase G1 do ciclo celular do parasito. Este fato se dá pelo controle de sua expressão gênica. Na fase G1, genes responsáveis pela adesão, invasão e resistência ao ambiente extracelular são fortemente expressos. Nas fases S e M/C, os parasitos mostraram-se menos invasivos, visto que a demanda de energia é voltada para o processo de divisão.

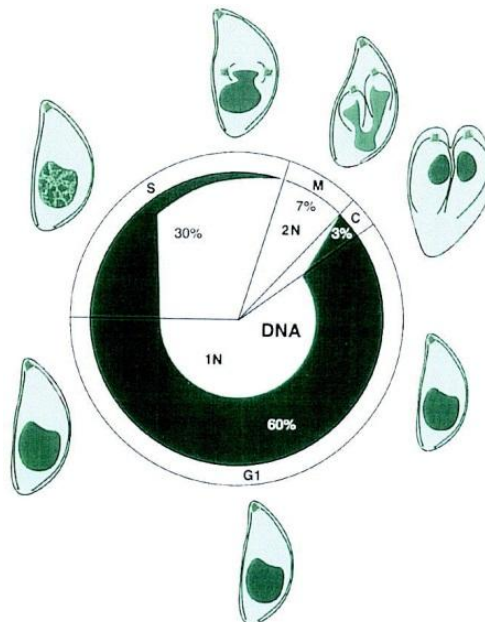


Figura 2: Fases do ciclo celular de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Fase G1: início do processo de replicação. Fase S: duplicação do material genético e do centróssomo. Fase M: formação de complexos apicais rudimentares. Fase C: citocinese (RADKE et al., 2001).

Morisaki et al. (1995) descreveram duas maneiras distintas que o *T. gondii* utiliza para invadir as células, as quais resultam em respostas imunológicas diferentes: 1 - a penetração ativa e 2 - fagocitose. Na penetração ativa a invasão das células hospedeiras é coordenada pelo próprio parasito, característica dos membros do filo Apicomplexa que apresentam um conjunto de organelas caracterizadas por vesículas secretoras na região apical (BLACKMAN; BANNISTER, 2001). Estas organelas secretoras como as róprias, micronema e grânulos densos são fundamentais para que a invasão ocorra (DUBREMETZ et al., 1993; BECKERS et al., 1994; CARRUTHERS; SIBLEY, 1997; SIBLEY; ANDREWS, 2000; BLACKMAN; BANNISTER, 2001; HAJJ et al., 2007). Segundo Soldati e Meissner (2004) o processo inicia-se com a adesão, a seguir o *T. gondii* desliza sobre a membrana da célula alvo, momento no qual ocorre a secreção de proteínas provenientes do micronema (MICs) que se ligam à célula hospedeira (DUBREMETZ et al., 1998; SIBLEY; ANDREWS, 2000; SINAI; JOINER, 2001; BROSSIER et al., 2003).

Durante o processo de penetração ativa, o *T. gondii* pode inibir vias de sinalização na célula hospedeira envolvidas na proteção contra a infecção. O parasito consegue evadir-se das defesas celulares do hospedeiro bloqueando fatores de transcrição como o STAT1 e NF- κ B (HUNTER; SIBLEY, 2012). Culturas de fibroblastos infectados com cepas dos três genótipos de *T. gondii*, não respondem aos efeitos do interferon-gama IFN- γ isto parece ser devido à falha na sinalização da via mediada por STAT1 (KIM et al., 2007). Segundo Hunter e Sibley (2012) o sucesso do parasito encontra-se nas estratégias desenvolvidas para enfraquecer importantes vias imunológicas da célula hospedeira.

A medida que o parasito se evade e subverte à resposta imune (BUZONI-GATEL; WERTS, 2006), um vacúolo rente ao seu corpo, denominado vacúolo parasitóforo (VP) é formado. Este vacúolo possui composição membranar diferenciada, tornando-se não-fusogênico ao sistema endomembranar da célula hospedeira. O vacúolo é essencial para a sobrevivência do parasito, pois, assim, enzimas lisossomais da célula hospedeira não chegam até ele (SIBLEY et al., 1985; MORDUE et al., 1999). A membrana do VP é formada por componentes produzidos pelo parasito e pela célula hospedeira. Esta membrana possui a capacidade de selecionar a passagem de nutrientes da célula hospedeira para o interior do VP atuando como “peneira molecular” (termo original molecular sieve), permitindo, assim, a nutrição do parasito durante seu desenvolvimento. Isto se dá através de poros localizados na

membrana do VP, que permitem a passagem de solutos de baixo peso molecular (SCHWAB et al., 1994).

Mercier et al. (2002) descreveram uma rede tubulovesicular que interliga a membrana do parasito à membrana do VP, funcionando como uma via de transporte de moléculas entre a célula hospedeira e *T. gondii*. A estabilidade estrutural da rede túbulo vesicular é dada por proteínas provenientes dos grânulos densos, entre outras ainda não descritas (MERCIER et al., 2005). A proteína ROP2, secretada pelo parasito e presente na membrana do VP, tem sua cauda N-terminal exposta através do VP, esta insere-se na membrana externa da mitocôndria da célula hospedeira. A associação vacúolo parasitóforo-mitocôndria, disponibiliza energia para manutenção e desenvolvimento do parasito (BECKERS et al., 1994).

T. gondii é capaz ainda, de entrar em células hospedeiras através do mecanismo fagocítico. A invasão por fagocitose para *Trypanosoma cruzi* e *T. gondii* foi descrita por Sibley; Andrews, (2000) e ocorre em macrófagos, células dendríticas e monócitos. Segundo os autores, os mecanismos fagocíticos são semelhantes entre os patógenos intracelulares. Durante a fagocitose, o *T. gondii* é envolvido e interiorizado pela célula hospedeira e não ocorre a secreção de proteínas pelo parasito (MORISAKI et al., 1995). Após a ingestão, forma-se um vacúolo ao redor do parasito que se converte em fagossomo ao qual, posteriormente, fundem-se lisossomos originando uma organela denominada fagolisossomo (DESJARDINS, 1995), que libera diversas enzimas hidrolíticas capazes de destruir o parasito (SIBLEY et al., 1985; MORISAKI et al., 1995; MORDUE; SIBLEY, 1997).

Os estágios parasitários infectantes são os oocistos, os bradizoítos e os taquizoítos. Humanos naturalmente infectam-se pela ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida ou crua e/ou pela ingestão de oocistos presentes na água ou alimentos contaminados (DUBEY, 2010). Após a ingestão, os bradizoítos são liberados dos cistos teciduais e os esporozoítos dos oocistos, a seguir invadem a túnica mucosa do TGI infectando enterócitos, células caliciformes e linfócitos intra-epiteliais (LIEs) (SPEER; DUBEY, 1998). Estas duas formas de contrair a toxoplasmose fazem da via oral a principal via de infecção (LIESENFELD, 2002; BARRAGAN; SIBLEY, 2003; SANT'ANA et al., 2012).

O *T. gondii* pode também ser transmitido pela via transplacentária ao feto durante a infecção aguda de fêmeas no período de gestação (WEISS; KIM, 2007; BLADER; SAEIJ, 2009) neste caso, taquizoítos multiplicam-se assexuadamente, invadem células, e

disseminam-se pelo sangue e linfa para todo o hospedeiro (FRENKEL, 1973; BLADER; SAEIJ, 2009; SIBLEY et al., 2009).

Courret et al. (2006) afirmam que taquizoítos também são lançados na corrente sanguínea após o rompimento da membrana da célula invadida e carreados por leucócitos possibilitando a disseminação do parasito para outros tecidos do hospedeiro. Esta infecção inicial caracteriza a fase aguda da toxoplasmose. Quando o sistema imune do hospedeiro inicia a resposta contra os taquizoítos, o parasito sofre diferenciação e forma cistos teciduais. A ausência de taquizoítos circulantes e a presença de cistos caracteriza a fase crônica da doença (FRENKEL, 1973; BLADER; SAEIJ, 2009; SIBLEY et al., 2009).

2.2 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial (TENTER et al., 2000; FLEGR et al., 2014). Estima-se que 10 - 50% da população mundial seja soropositivos para *T. gondii* (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). No Brasil, a soroprevalência varia entre 50 e 80% da população (CANTO et al., 2000), em gestantes a prevalência atinge 50% (FONSECA et al., 2012) chegando a 65% no noroeste do Paraná (FEREZIN et al., 2013).

Segundo Wong e Remington (1993) a maioria das infecções primárias pelo parasito é assintomática. Frenkel (1973) relata toxoplasmose aguda febre, fadiga, dor de cabeça, e linfadenopatia cervical como sintomas típicos. Quando adquirida durante a gestação pode trazer graves complicações ao feto, incluindo malformações e aborto (WONG; REMINGTON, 1994; LIESENFELD, 2002; DUBEY, 2010).

A presença do parasito ativa o sistema imune do hospedeiro que reage por meio de citocinas expressadas pelas células de defesa. Isto promove a transição da toxoplasmose aguda em latente. Neste estágio da doença, cistos teciduais são formados e podem persistir até o final da vida do hospedeiro sendo um sítio de reativação muito importante (LIESENFELD, 2002; DUBEY, 2010). Em pacientes imunocomprometidos (transplantados, portadores de câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a toxoplasmose pode ser fatal (LUFT et al. 1993; ISRAELSKI; REMINGTON, 1993).

De acordo com Liesenfeld (2002) e Barragan e Sibley (2003) os bradizoítos, no interior de cistos, se reproduzem lentamente e sobrevivem em diversos tecidos do hospedeiro, incluindo encéfalo, músculos e vísceras intestinais. A presença dos cistos induz à inflamação

local (FLEGR, 2013) causando a produção de anticorpos e citocinas que recrutam células do sistema imune as quais mobilizam resposta celular do tipo Th1. Macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos são ativados e constituem a primeira linha celular de defesa contra *T. gondii*. Monócitos e macrófagos secretam interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-12, óxido nítrico e TNF- α . Já as células dendríticas ao reconhecerem este patógeno, secretam IL-12. Estas respostas estimulam a produção de IFN- γ por células Natural Killer (NK). O IFN- γ é responsável por desencadear a atividade celular microbicida, sendo reconhecido por um receptor específico ligado à membrana de macrófagos, monócitos e neutrófilos. A presença destas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-12) podem além de neutralizar o parasito (LIESENFELD, 2002; BUZONI-GATEL; WERTS, 2006; EGAN et al., 2012; HUNTER; SIBLEY, 2012; COHEN; DENKERS, 2014), resultar em lesões no tecido adjacente (FLEGR, 2013).

A infecção por *T. gondii* em células de mamíferos, induz muitas alterações na transcrição de genes na célula hospedeira, incluindo os genes envolvidos no metabolismo de energia e as respostas imunológicas (HUNTER; SIBLEY, 2012). Egan et al. (2012) demonstraram que a infecção oral por *T. gondii*, desencadeia injúria inflamatória assemelhando-se as lesões observadas durante a doença inflamatória intestinal (DII) humana (doença de Crohn e a Colite ulcerativa) e por outro lado a doença de Crohn desencadeia resposta similar a do *T. gondii*.

2.3 Estratos que compõe a parede do intestino delgado, grosso e Sistema Nervoso Entérico: breve descrição

Constituindo a parede do intestino delgado e grosso podemos citar a túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa. Histologicamente, cada um desses estratos apresenta particularidades e evidências de que o intestino de modo geral, desenvolve uma barreira com complexas funções de seleção e defesa, tanto de caráter morfológico como fisiológico. Dessa relação, decorre nossa própria sobrevivência (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.3.1 Túnica mucosa

A túnica mucosa é altamente vascularizada e composta por epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa (limite entre a túnica mucosa e a tela submucosa) em ambos os órgãos. No jejuno, é possível observar projeções digitiformes da lâmina própria em direção ao lúmen

intestinal, denominados vilos. Estes são recobertos por epitélio de revestimento simples prismático, conferem ao órgão papel fundamental na absorção de nutrientes. Em função desta particularidade em relação ao cólon, é sensato ao descrever o epitélio de revestimento do jejuno, dividi-lo em: epitélio de revestimento das criptas e epitélio de revestimento presente nas vilosidades (WOLSKI et al., 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O epitélio de revestimento das criptas está em contato com a lâmina própria no jejuno e no cólon proximal. A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo frouxo, sendo contínua ao redor das criptas e nódulos linfáticos e abrigando diversos vasos sanguíneos e linfáticos de pequeno calibre e EGCs (subepiteliais, Figura 4b) (WOLSKI et al., 1999; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). A túnica mucosa do cólon proximal apresenta diversas pregas visíveis a olho nu. (MELLO et al., 1996). Nos espaços entre os vilos (intervilares) do jejuno encontram-se numerosas glândulas, normalmente denominadas de criptas intestinais (WOLSKI et al., 1999). Contudo, no cólon não existem descrições de vilos para ratos (MELLO et al., 1996). Em ambos os órgãos, as criptas têm constituição e funções semelhantes, são glândulas simples tubulares que circundam a base dos vilos no jejuno e contínuas com as pregas observadas no cólon e se abrem como perfurações do revestimento interno do intestino; as criptas respondem pela proliferação celular do epitélio intestinal, devido à atividade mitótica. A maior profundidade da cripta reflete uma maior atividade proliferativa, visando garantir adequada taxa de renovação epitelial (PLUSKE et al., 1997; MELLO et al., 1996; WOLSKI et al., 1999; RÜHL et al., 2001; NEUNLIST et al., 2007; BACH-NGOHOU et al., 2010).

O epitélio de revestimento das vilosidades na túnica mucosa no jejuno difere daquele existente no cólon proximal, pelo fato de não existir vilos no cólon e a distribuição de enterócitos e células caliciformes se alternarem nos dois órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.3.2 Células do epitélio intestinal

2.3.2.1 Enterócitos

No epitélio de revestimento das vilosidades, as células mais numerosas são os enterócitos. Entretanto, no cólon a distribuição é mais equilibrada. Os enterócitos apresentam-se unidos por complexos juncionais denominados complexo unitivo. Este é constituído por três tipos de junções: a junção de oclusão, a junção aderente e os desmossomos. Essas células são responsáveis pela digestão terminal de macromoléculas e absorção de água e nutrientes,

além de modificar ácidos graxos em triglicerídeos, carregam nutrientes para vasos sanguíneos e linfáticos localizados na lâmina própria (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os enterócitos também desempenham importante papel na resposta imune diante de processos inflamatórios e infecciosos podendo funcionar como células apresentadoras de antígenos ou ainda atuar na produção e secreção de citocinas com atividade quimiotática e pró-inflamatória no epitélio intestinal (ELIA; SOUZA, 2001; SANTAOLALLA; ABREU, 2012).

Em algumas regiões, a túnica mucosa do cólon é invadida por folículos linfáticos que se estendem desde a submucosa e se projetam em direção ao lúmen, apresentando áreas recobertas apenas pelo epitélio intestinal, que nestes locais é constituído por células diferenciadas, nas quais não se identifica forma colunar típica, tampouco a borda em escova comum nos enterócitos funcionais (MELLO et al., 1996).

2.3.2.2 Células caliciformes

O segundo tipo celular mais abundante na túnica mucosa do jejuno são as células caliciformes, glândulas unicelulares com formato de cálice, com sua base apoiada na lâmina basal e com seu polo apical repleto de vesículas secretoras revestidas por membranas voltadas para o lúmen intestinal, de modo a deslocar o citoplasma para a periferia da célula e o núcleo para o polo basal. No cólon, encontram-se distribuídas na mesma proporção que os enterócitos. Essas células possuem a função de produzir e secretar mucinas, cuja forma hidratada é o componente fundamental do muco que reveste o lúmen intestinal. O muco lubrifica e protege o epitélio contra a abrasão e ação da microbiota intestinal, embora também sirva como fonte de nutrientes para esses microrganismos (ELIA; SOUZA, 2001). As células caliciformes exercem um papel importante na manutenção da integridade do epitélio intestinal, pois além das mucinas, produzem peptídeos antibacterianos, peptídeo TFF3 (trefoilfactor3) resistin-likemolecule β (RELM β), and Fc- γ binding protein (Fcgbp) que atuam no combate a antígenos luminiais (BERGSTROM, et al., 2008).

2.3.2.3 Linfócitos intra-epiteliais (LIEs)

LIEs representam um dos componentes do tecido linfóide difuso mais extensivamente estudado, tendo sido objeto de numerosas revisões. Os LIEs estão presentes no epitélio das mucosas e expressam uma diversidade ilimitada de receptores antigênicos. Estes linfócitos são considerados células efetoras da imunidade inata, atuam na defesa do hospedeiro secretando citocinas para o recrutamento e sinalização celular (ELIA; SOUZA, 2001).

Ocorrem distribuídos entre os enterócitos ou ainda entre enterócitos e células caliciformes ao longo da túnica mucosa. Quando estimulados migram a partir da lâmina própria para o lúmen (ELIA; SOUZA, 2001; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SANT'ANA et al., 2012).

Luangsay et al. (2003) relataram que a infecção oral provocada pelo *T. gondii* induz a migração de LIEs no intestino de camundongos, como parte dos mecanismos protetores da infecção e da resposta inflamatória. A expressão de receptores específicos para *T. gondii* pelos LIEs, como o CCR5 ocorre a partir do 7º dia após a infecção.

Fenotipicamente LIEs são linfócitos T CD8⁺, o contrário daqueles residentes na lâmina própria que são predominantemente CD4⁺ (JOURET et al. 1999). A ligação seletiva dos LIEs através de seus receptores à proteínas CD8 indicam a apresentação de antígenos via MHC de classe II caracterizando a resposta a microrganismos luminiais (BJORKMAN et al., 1997). Existem evidências da citotoxicidade dos LIEs contra alguns tumores de linhagem epitelial, através da produção de TNF-β1. O papel supressor dos LIEs é mediado por citocinas que tanto contribuem para a resposta imune inata (IL-4, IL-6, IL-10) quanto para a resposta imune celular (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α e INF-γ) (KLEIN, 1995). A presença de LIEs qualifica os processos infecciosos do sistema digestório (ELIA; SOUZA, 2001; COHEN; DENKERS, 2014). Cerca de 50% dos linfócitos da mucosa intestinal de camundongos e aves são LIEs e expressam os receptores γδ. Essa observação não é válida para humanos, em que somente 10% dos LIEs expressam estes receptores (JOURET et al., 1999).

2.3.3 Tela submucosa

A tela submucosa apresenta-se como uma lâmina delgada, constituída predominantemente por feixes de fibras colágenas associados com pequenos feixes de fibras elásticas, em geral com a presença de numerosos vasos sanguíneos e linfáticos de maior calibre (arteríolas e vênulas) em ambos os órgãos. Nas áreas em que estão presentes pregas na túnica mucosa, a tela submucosa espessa-se indo em direção ao ápice das pregas e, geralmente, na base destas é permeada por vasos e gânglios nervosos. Próximo ao ápice das pregas, as fibras colágenas e elásticas estendem-se em direção à túnica mucosa e envolvem a base das glândulas intestinais. Em algumas regiões, são encontrados folículos linfáticos isolados ou agregados (mais frequentes no cólon) (MELLO et al., 1996). Na tela submucosa,

tanto no jejuno quanto no cólon, são encontrados neurônios e células da glia entérica (EGCs) isolados e/ou reunidos em gânglios formando o plexo submucoso.

2.3.4 Sistema Nervoso Entérico

O plexo submucoso é proeminente no intestino delgado e grosso de grandes mamíferos, como suínos e humanos, os gânglios submucosos apresentam-se interligados e distribuídos em dois ou três níveis: plexo submucoso interno (de Meissner) logo abaixo da túnica mucosa, plexo submucoso externo (plexo de Schabadash) junto à camada muscular circular e o plexo intermediário localizado entre os dois (SCHABADASCH, 1930; GUNN, 1968; HOYLE; BURNSTOCK, 1989; LOMAX, 2010; TIMMERMANS et al., 2001; FURNESS, 2006). Em pequenos roedores, apresenta-se em um único nível, provavelmente devido à menor espessura da tela submucosa (GUNN, 1968; FURNESS; COSTA, 1987; BREHMER et al., 2010).

Juntos, o plexo mientérico presente na túnica muscular e o plexo submucoso presente na tela submucosa formam a parte ganglionar do sistema nervoso entérico (SNE) (FURNESS, 2006) que segundo Langley (1921), é o terceiro componente do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Figura 3).

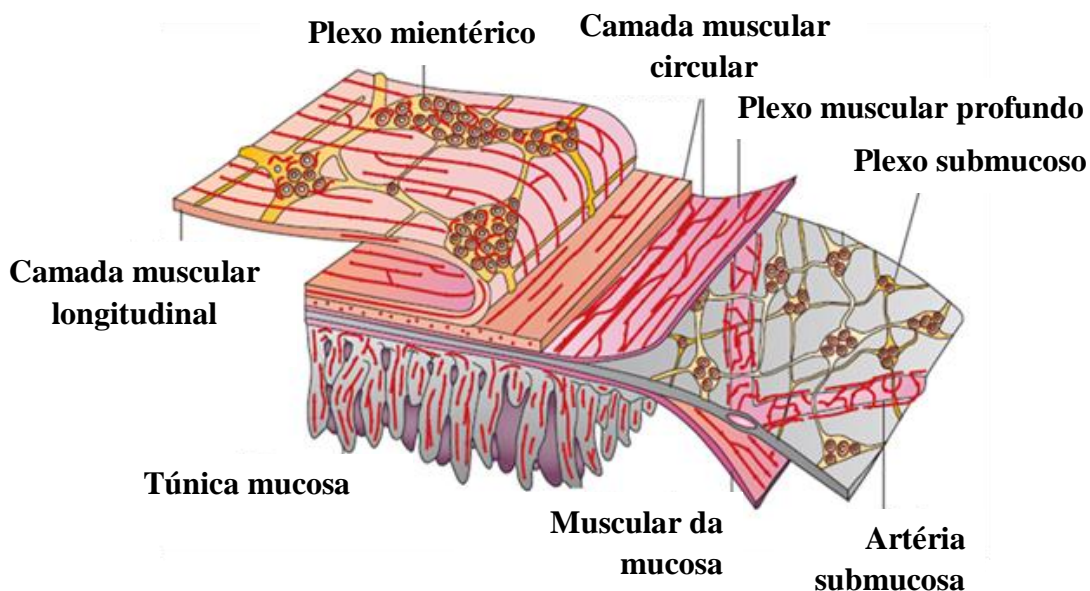


Figura 3. Esquema explicando a disposição dos neurônios em gânglios e plexos na parede do trato gastrointestinal (adaptado de FURNESS, 2012).

2.3.5 Plexo submucoso

O plexo submucoso possui fibras mais finas, com gânglios menores que os encontrados no plexo mientérico, contudo, são interconectados, tanto nas suas subdivisões quanto em relação ao plexo mientérico.

Relatos detalhados da morfologia, tamanho e a distribuição dos gânglios do plexo submucoso são descritos nos trabalhos de Dogiel (DOGIEL, 1899*apud*FURNESS, 2006); Schabadasch (1930) e Irwin (1931) para diferentes espécies, como cobaia, ovelha e gato. Apesar da semelhança filogenética entre os mamíferos, Hoyle e Burnstock (1989); Timmermans et al. (2001) sugerem que o arranjo dos neurônios submucosos seja espécie específica.

Os tipos funcionais de neurônios submucosos são: neurônios motores (excitatórios e inibitórios), interneurônios, neurônios intrínsecos primários (IPANs) e neurônios intestino fugais (IFANs). Com base no código químico, vários neurotransmissores foram descritos. Dentre eles destacam-se adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), Substância P e o Polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (FURNESS, 2006).

O VIP liga-se a receptores presentes em células musculares, células imunológicas, enterócitos e células caliciformes, modulando a vasodilatação, inflamação, proliferação celular e liberação de mucinas, respectivamente (WEBER et al., 2001; NEUNLIST et al., 2003; EKBLAD et al., 2004; TOUMI et al., 2004; FURNESS, 2006; SAVIDGE et al., 2007; NEUNLIST et al., 2013). Os neurônios VIPérgicos representam 45% da população neuronal submucosa (FURNESS; COSTA, 1987) atuam ainda sobre outros neurônios (FURNESS, 2006) e células da glia entérica (EGCs) (NEUNLIST et al., 2013).

À semelhança do plexo mientérico, o plexo submucoso é constituído por neurônios e EGCs (FURNESS, 2006; SAVIDGE et al., 2007; GULBRANSEN; SHARKEY 2012; NEUNLIST et al., 2013).

Hanani e Reichenbach, (1994) foram os primeiros a propor uma única classificação para a população de EGCs baseando-se em diferenças morfológicas com os astrócitos. Descreveram tipo I e tipo II. O primeiro representa aquelas presentes dentro dos gânglios dos plexos mientérico e submucoso - intraganglionares. O tipo II refere-se àquelas dispostas dentro dos feixes de fibras nervosas que conectam os plexos entéricos - interganglionares.

Gulbransen e Sharkey (2012), revisando os estudos de Savidge et al. (2007) e Vanderwinden et al. (2003) sugeriram os tipos III e IV baseando-se na morfologia e também em aspectos bioquímicos e moleculares. O tipo III representa as EGCs localizadas na túnica mucosa. Consideradas subepiteliais e o tipo IV refere-se àquelas associadas às fibras nervosas dentro das camadas longitudinal e circular na túnica muscular (Figura 4).

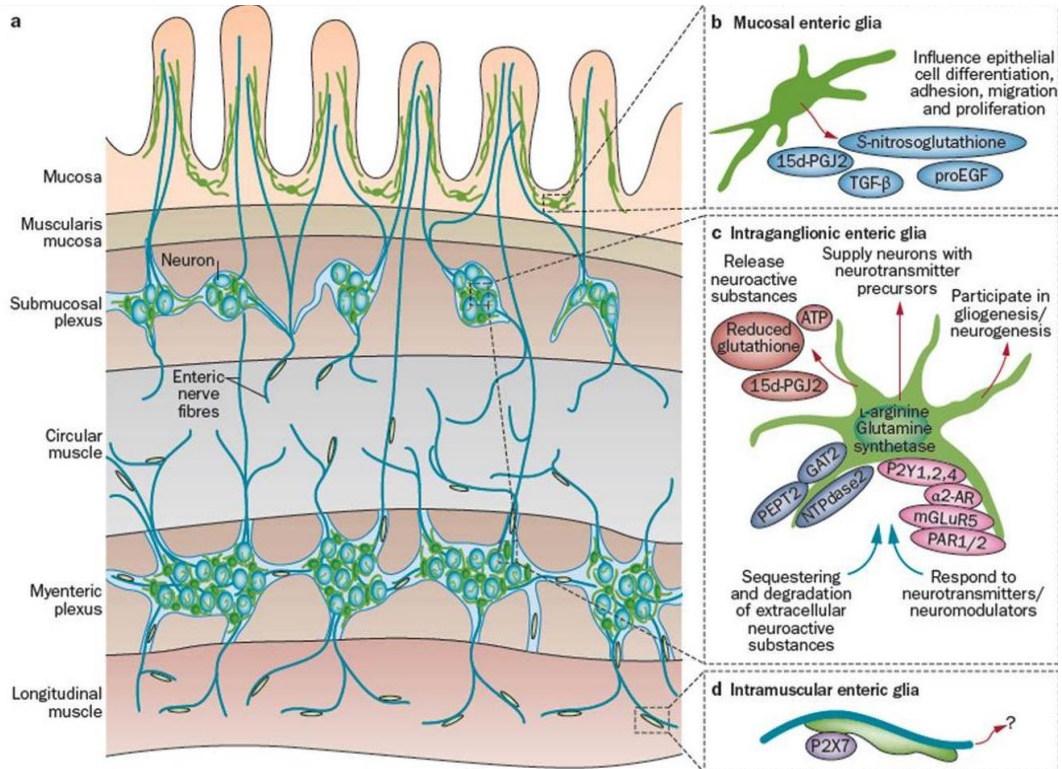


Figura 4. Esquema mostrando a disposição e classificação das células da glia entérica. Subpopulações de células da glia entérica dispostas na parede do trato gastrointestinal (a), população de células de glia entérica na lâmina própria da túnica mucosa (b) também denominadas subepiteliais; Em (c) células da glia entérica presentes em gânglios nervosos e (d) células da glia entérica entre as fibras musculares lisas (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

Esta classificação nos auxilia a compreender suas funções. Como cada subpopulação reside em compartimentos distintos da parede do intestino, este provavelmente determina o fenótipo destas células (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

Vários autores demonstraram que há diferença na expressão de receptores (NASSER et al., 2006; COSTAGLIOLA et al., 2009) e funções (MAUDLEJ; HANANI, 1992; RÜHL et al., 2004) mesmo entre EGCs intraganglionares em ambos os plexos e em diferentes regiões do intestino. As EGCs são semelhantes aos astrócitos em aspectos morfológicos e funcionais (RÜHL et al., 2004; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Ambos expressam a proteína glial

fibrilar ácida, avimentina, a glutamina sintetase (De WINTER; De MAN, 2010) e a proteína estrutural S-100 β (marcador pan glial) (FERRI et al., 1982), possuem receptores e produzem citocinas como IL-1 β , IL-10 (RÜHL et al., 2001), TGF- β 1 (NEUNLIST et al., 2007).

Atuam na defesa da túnica mucosa, interagem com a microbiota intestinal (NEUNLIST et al., 2013; COHEN; DENKERS, 2014) participam na motilidade (BASSOTTI et al., 2007), na inflamação (BUSH et al., 1998; SAVIDGE et al., 2007; VON BOYEN et al., 2011), na neuroproteção (CABARROCAS et al., 2003; DE GIORGIO et al., 2012), gliogênese, neurogênese e neuromodulação (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

As EGCs formam junto com neurônios submucosos e células epiteliais uma unidade glial-neuronal-epitelial (NEUNLIST et al., 2013). Desempenham papel decisivo na manutenção da integridade da barreira epitelial, regulação da resposta imune e proliferação celular na túnica mucosa (BUSH et al., 1998; RÜHL et al., 2001; CABARROCAS et al., 2003; NEUNLIST et al., 2003; NEUNLIST et al., 2007; SAVIDGE et al., 2007; VAN LANDEGHEM et al., 2009; BACH-NGOHOU et al., 2010; NEUNLIST et al., 2013; YU; LI, 2014).

A depleção de EGCs em camundongos provoca um quadro de jejunoileíte fulminante em apenas duas semanas. Esse quadro é independente de processos infecciosos, sendo o mesmo caracterizado por degeneração de neurônios mientéricos e hemorragia intestinal (BUSH et al., 1998). A redução de EGCs ou sua menor atividade está relacionada às características histopatológicas da enterocolite necrosante (CORNET et al., 2001; SAVIDGE et al., 2007), doença inflamatória intestinal (CABARROCAS et al., 2003), síndrome do intestino irritável, diabetes e doenças autoimunes (SAVIDGE et al., 2007).

2.3.6 Túnica muscular

A túnica muscular no jejuno é formada por duas camadas de músculo liso: uma camada orientada no sentido longitudinal (externa) e outra no sentido circular (interna). Essas fibras musculares são inervadas por neurônios organizados em gânglios formando o plexo mientérico, situado entre suas duas camadas (FURNESS, 2006). No cólon, a túnica muscular voltada para a face mesocólica, possui uma única camada constituída por fibras musculares com disposição circular. Entre as fibras musculares observa-se feixes de fibras colágenas dispostas obliquamente e muitas fibras elásticas praticamente transversais em relação às fibras musculares. No extremo oposto, ou seja, na face antimesocólica, a túnica muscular também se apresenta constituída apenas pela camada circular. Lateralmente às faces mesocólica e

antimesocólica (regiões intermediárias), a túnica muscular apresenta duas camadas distintas, uma orientada no sentido longitudinal (externo) e outra no sentido circular (interna). Os gânglios do plexo mientérico, nas faces mesocólica e antimesocólica, localizam-se entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo subseroso. Nas regiões intermediárias, os gânglios são encontrados entre as duas camadas de músculo liso e por vezes, entre as fibras musculares do estrato circular (MELLO et al., 1996; FURNESS, 2006).

2.3.7 Túnica serosa

A túnica serosa a partir da flexura duodeno-jejunal é formada por duas lâminas de tecido conjuntivo que recobre externamente todo o órgão e permite que artérias, veias e nervos penetrem sua estrutura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No cólon a parte proximal encontra-se presa a parede abdominal pelo mesocolo, sendo histologicamente identificados dois folhetos externos delgados, onde são observados feixes de fibras colágenas e elásticas. Infiltrados adiposos são encontrados permeando os folhetos. Em meio ao tecido adiposo, são encontradas artérias, veias e nervos (MELLO et al., 1996).

2.4 Respostas intestinais a diferentes modelos experimentais de infecção por *Toxoplasma gondii*

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que a infecção oral pelo *T. gondii* pode causar alterações quantitativas e morfométricas em neurônios entéricos bem como na estrutura da parede intestinal.

Sugauara et al. (2008) demonstraram que não houve perda neuronal no plexo mientérico do íleo e no cólon de ratos inoculados com 10 mil taquizoítos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii* por via oral mantidos por 24 horas e 30 dias. No íleo, os neurônios sofreram atrofia na fase crônica (30 dias) da infecção, enquanto que nenhuma alteração ocorreu na fase aguda (24 horas). Já no cólon descendente, os neurônios tornaram-se hipertróficos na fase crônica da infecção, em oposição à atrofia observada na fase aguda.

Utilizando outro estágio parasitário e genótipo deste parasito, Sugauara et al. (2009) relataram hipertrofia em neurônios no plexo mientérico do íleo, enquanto nenhuma alteração morfométrica foi observada no cólon descendente de ratos infectados com 20 cistos teciduais da cepa ME-49 de *T. gondii* (genótipo II). Contudo, não foram descritas perdas neuronais em ambos os órgãos após 24 horas de infecção.

Shiraishi et al. (2009) estudando os efeitos da toxoplasmose sobre a morfometria da parede intestinal e a dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos de corte inoculados com cistos teciduais da cepa ME-49 (genótipo II) e com 1000 oocistos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii* durante 60 dias, observaram aumento da espessura da parede intestinal, sobretudo na túnica mucosa, túnica muscular e muscular da mucosa, além de aumento na secreção de mucinas neutras (PAS⁺) nos animais infectados com da cepa de genótipo II. Naqueles inoculados com a cepa do genótipo III, os autores relataram redução da espessura da túnica mucosa e aumento na secreção de mucinas neutras.

Bonapaz et al. (2010) investigando o duodeno de frangos de corte inoculados por via oral com 1000 oocistos da cepa M7741 de *T. gondii* (genótipo III) e mantidos por 60 dias, relataram que estes apresentaram diarreia e infiltrados inflamatórios na túnica mucosa, redução da espessura da parede intestinal e aumento do número das células caliciformes. Redução de 70% da densidade dos neurônios no plexo mientérico evidenciados com a técnica de Giemsa e atrofia da área do corpo celular, citoplasma e núcleo dos remanescentes.

Braga et al. (2011) com a mesma condição experimental adotada por Shiraishi et al. (2009), descreveram alterações na túnica mucosa, tela submucosa e túnica muscular do cólon de frangos de corte. Os autores destacaram que os frangos inoculados com a cepa do genótipo II foram os que apresentaram maiores alterações. Os autores demonstraram através de cortes histológica presença de cisto tecidual do parasito na tela submucosa 60 dias após a inoculação.

No jejuno de suínos inoculados com 5000 oocistos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii*, Silva et al. (2010) descreveram atrofia aos 30 dias e hipertrofia da parede deste órgão aos 60 dias após a infecção. Tanto na atrofia quanto na hipertrofia, a túnica mucosa foi o estrato que mais sofreu com a infecção. Não foram observadas alterações na dinâmica da produção e liberação de mucinas. Por outro lado, a infecção toxoplásmica provocou redução no número de LIEs aos 60 dias.

Com esta mesma condição experimental, Odorizzi et al. (2010) demonstraram alterações quantitativas e morfométricas em subpopulações neuronais no plexo mientérico do jejuno destes animais. Os autores relataram o aumento do número de neurônios NADPH-dp (nitrérgicos) acompanhado por hipertrofiada área do corpo celular, citoplasma e núcleo. Por outro lado, os autores demonstraram redução de cerca de 50% do número de neurônios

NADH-d(metabolicamente mais ativos) e redução de sua área nuclear após 30 dias de infecção. Os autores relatam também presença de sinais clínicos como a diarreia nos animais infectados a partir do 13º dia.

Pereira et al. (2010) estudando a população neuronal metabolicamente mais ativa NADH-d (NADH-diaforase) no plexo mientérico do jejuno de ratos inoculados com 500 oocistos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii*, relataram que após 24 horas (infecção aguda) análise macroscópica não demonstrou alterações no órgão. Análise quantitativa demonstrou que a inoculação de 500 oocistos deste parasito não foi capaz de provocar alterações em neurônios NADH-d no plexo mientérico em um período de 24 horas. Por outro lado, foi suficiente para provocar alterações morfométricas no corpo celular (hipertrofia), no núcleo (atrofia) e no citoplasma (hipertrofia) destes neurônios.

Hermes-Uliana et al. (2011) demonstraram que a infecção crônica induzida por *T. gondii* causa alterações neuroplásticas no plexo mientérico do jejuno em ratos. Os autores inocularam em ratos 500 oocistos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii* e os mantiveram por 30 e 90 dias infectados. Não foram encontradas alterações quantitativas na população neuronal total evidenciada com a técnica de Giemsa e na subpopulação de neurônios nitrérgicos NADPH-diaforase (NADPH-d). Entretanto, ambas as populações neuronais sofreram alterações plásticas, com atrofia nos neurônios evidenciados pelas duas técnicas nos ratos do grupo inoculado e mantido por 30 dias, e uma tendência para a hipertrofia neuronal naqueles inoculados e mantidos por 90 dias. Contudo, os ratos não apresentaram sinais clínicos da toxoplasmose ou lesões macroscópicas e microscópicas na parede do jejuno.

Zaniolo et al. (2012) demonstraram que a infecção toxoplásmica provoca alterações morfológicas nos neurônios mientéricos do ceco de ratos. Ratos foram inoculados oralmente com 100 mil taquizoítos da cepa BTU IV (genótipo I) ou com a mesma quantidade de taquizoítos da cepa BTU II (genótipo III). Os autores demonstraram que ambas as cepas foram capazes de provocar alterações morfométricas nos neurônios mientéricos do ceco. Entretanto, somente a cepa do genótipo I foi capaz de provocar perda neuronal no segmento estudado.

Sant'ana et al. (2012) relataram que infecção crônica induzida por *T. gondii* causou redução de 28,3% dos neurônios VIP-IR submucosos e atrofia da área dos corpos celulares dos remanescentes. Segundo os autores, a infecção toxoplásmica promove alterações na

túnica mucosa de ratos. Ao avaliar a túnica mucosa, os autores relataram redução 12,7% de células caliciformes que produzem mucinas neutras (PAS⁺), as que produzem e secretam mucinas ácidas (sulfomucinas - AB pH 1,0⁺) diminuíram 18,3%. Os autores atribuíram estes achados à infecção causada pelo protozoário. Não houve alterações quantitativas nos LIEs da túnica mucosa do jejuno de ratos infectados com 500 oocistos da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii* por 36 dias.

Diante destes resultados, observamos que as alterações na morfologia da parede intestinal e em neurônios entéricos são correlacionadas entre si e dependentes da virulência do parasito, estágio parasitário utilizado, da duração da infecção e da espécie de hospedeiro.

3. Referências

- AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 6, p. 1-19, 2001.
- BACH-NGOHO, K.; MAHÉ, M. M.; AUBERT, P.; ABDO, H.; BONI, S.; BOURREILLE, A.; MASSON, D. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2. **The Journal of Physiology**. 588, 2533–2544. 2010.
- BARRAGAN A.; SIBLEY L.D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**. v. 11, p. 426-30, 2003.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A.; SALERNI, B. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Laboratory Investigation**. v. 87, p. 628-632, 2007.
- BECKERS, C. J. M.; DUBREMETZ, J. F.; PUIJALON, O. M.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the cell cytoplasm. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, p. 947-961, 1994.
- BERGSTROM, K. S. B.; GUTTMAN, J. A.; RUMI, M.; MA, C.; BOUZARI, S.; KHAN MA.; GIBSON, D. L.; VOGL, A. W.; VALANCE, B. A. Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. **Infection and Immunity**. v. 76, p. 796-811, 2008.
- BJORKMAN, P. J. MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions. **Cell**. v. 89, p. 167-170, 1997.
- BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 117, p. 11-25, 2001.
- BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 117, p. 458–476, 2009.
- BONAPAZ, R. S.; HERMES-ULIANA, C.; SANTOS, F. N.; DA SILVA, A. V.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, p. 787-792, 2010.
- BRAGA, C. F.; DA SILVA, A. V.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, p. 340-347, 2011.
- BREHMER, A.; RUPPRECHT, H.; NEUHUBER, W. Two submucosal nerveplexus in

human intestines. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 133, p. 149-161, 2010.

BROSSIER, F.; JEWETT, T. J.; LOVET, J. L.; SIBLEY, L. D. C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. **The Journal of Biological Chemistry**.v. 278, p. 6229–6234, 2003.

BUSH, T. G.; SAVIDGE, T. C.; FREEMAN, T. C.; COX, H. J.; CAMPBELL, E. A.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**.v. 93, p. 189–201, 1998.

BUZONI-GATEL, D.; LEPAGE, A. C.; DIMIER-POISSON, I. H.; BOUT, D. T.; KASPER, L. H. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. v. 158, p. 5883-9, 1997.

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

CABARROCAS, J.; SAVIDGE, T. C.; LIBLAU, R. S. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease.**Glia**. v. 41, p. 81-93, 2003.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 46, p. 4, 2000.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**. v. 81, p. 111–122, 2002.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**.v. 73, p. 114–123, 1997.

COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. **Mucosal Immunology**. v. 7, p. 744-52, 2014.

CORNET, A.; SAVIDGE, T. C.; CABARROCAS, J.; DENG, W. L.; COLOMBEL, J. F.; LASSMANN, H.; LIBLAU, R. S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, p. 13306–13311, 2001.

COSTAGLIOLA, A.; VAN NASSAUW, L.; SNYDERS, D.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J. P. Voltage-gated delayed rectifier K v 1subunits may serve as distinctive markers for enteroglial cells with different phenotypes in the murine ileum. **Neuroscience Letters**. v. 461, p. 80–84, 2009.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GÂTEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**. v. 107, p. 309–316, 2006.

DA SILVA, A. V.; MENDONÇA, A. O.; PEZERICO, S. B.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitología Latinoamericana**. v. 60, p. 65-68, 2005.

DE GIORGIO, R.; GIANCOLA, F.; BOSCHETTI, E.; ABDO, H.; LARDEUX, B.; NEUNLIST, M. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**.v. 303, p. 887-893, 2012.

DE WINTER B. Y.; DE MAN J. G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. **World Journal of Gastroenterology**. v. 16, p. 5523-5535, 2010.

DESJARDINS, M. Biogenesis of phagolysosomes: the ‘kiss and run’ hypothesis, **Trends in Cell Biology**. v. 5, p. 183-186, 1995.

DOGIEL, A. S. Uber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der SaugeSaugetiere.**Arch Anat Physiol Leipzig** 130–158, 1898 *apud* FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing.274 p. 2006.

DOS SANTOS, T. A. T.; PORTES, J. D. A.; DAMASCENO-SAJ.C.; CALDAS, L. A.; DE SOUZA, W. Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host. **PLoS ONE**. v. 6, p. e27867, 2011.

DUBEY, J. P. The history and life-cycle of *Toxoplasma gondii*. In: WEISS, L. M.; KIM, K. (editors). ***Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspective and Methods**. Academic Press; San Diego.v. p. 1-17, 2007.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. CRC Press. 2010.

DUBREMETZ, J. F.; ACHBAROU, A.; BERMUDEZ, D.; JOINER, K. A. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. **Parasitology Research**. v. 79, p. 402–408, 1993.

DUBREMETZ, J. F.; GARCIA-REGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M. N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexan.**International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 1007–1013, 1998.

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology Cell Biology**. v. 90, p. 668-75, 2012.

EKBLAD, E.; BAUER, A. J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity.**Neurogastroenterology and Motility**.v.16, p. 123-128, 2004.

ELIA, C. C. S.; SOUZA, H. S. P. (Orgs) **Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

FEREZIN, R. J.; BERTOLINI, D. A.; DEMARCHI, J. G. Prevalência de sorologia positiva para HIV, hepatite B, toxoplasmose e rubéola em gestantes do noroeste paranaense. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 35, p. 66-70, 2013.

FERRI, G. L.; PROBERT, L.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; MARANGOS, P. J.; POLAK, J. M. Evidence for the presence of S-100 β protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**. v. 297, p. 409–10, 1982.

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**. v. 29, p. 156–163, 2013.

FLEGR, J.; PRANDOTA, J.; SOVIČKOVÁ, M.; ISRAILI, Z. H. Toxoplasmosis – A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**. v. 9, p. e90203, 2014.

FONSECA, A. L.; SILVA, R.A.; FUX, B.; MADUREIRA, A.; DE SOUSA, F. F. Epidemiologic aspects of toxoplasmosis and evaluation of its seroprevalence in pregnant women. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, p. 357–364, 2012.

FRANCIA, M. E.; STRIEPEN, B. Cell division in apicomplexan parasites. **Nature Reviews Microbiology**. v. 12, p. 125–136, 2014.

FRENKEL, J. K. **Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology**. In **The Coccidia**. University Park Press. p. 410, 1973.

FREYRE, A.; CORREA, O.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J. M. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. **Parasitology Research**. v. 87, p. 941–944, 2001.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v. 38, p. 286–94, 2012.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system. New York: **Churchill Livingstone**. p. 1–28, 2006.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. Edinburgy: Churchill Livingstone. p. 340, 1987.

GAJI, R. Y.; BEHNKE, M. S.; LEHMANN, M. M.; WHITE, M. W.; CARRUTHERS, V. B. Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression. **Molecular Microbiology**. v. 79, p. 192–204, 2001.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v. 9, p. 625–632, 2012.

GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexus of mammals. **Journal of Anatomy**. v. 102, p. 223–239, 1968.

HAJJ, H. E. L.; LEBRUN, M.; FOURMAUX, M. N.; VIAL, H.; DRUBREMETZ, J. F. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 Rhopty protein provides new insights into

the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. **Cellular Microbiology**. v. 9, p. 54-64, 2007.

HALL, S.; RYAN, K. A. BUXTON, D. The epidemiology of *Toxoplasma* infection. In: JOYNSON DHWREGHITT T. J. (editors). **Toxoplasmosis: a Comprehensive Clinical Guide**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 58–124, 2001.

HANANI, M.; REICHENBACH, A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the *Guinea pig*. **Cell Tissue Research**. v. 278, p. 153–160, 1994.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HOYLE, C. H.; BURNSTOCK, G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **Journal of Anatomy**. v. 166, p. 7-22, 1989.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, p. 766–778, 2012.

IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **American Journal of Anatomy**. v. 49, p. 141–166, 1931.

ISRAELSKI, D. M.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. **Current Clinical Topics in Infectious Diseases**. v. 13, p. 322–356, 1993.

JOURET, A.; WEYNAND, B.; MAINGUET, P.; HAOT, J. Aspects immunologiques de la gastrite lymphocytaire. **Acta Gastro-Enterologica Belgica**. v. 52, p. 304-8, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p. 423–432, 2004.

KIM, S. K.; FOUTS, A. E.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. **Journal of Immunology**. v. 178, p. 5154-65, 2007.

KLEIN, J. R. Advances in intestinal T-cell development and function. **Immunology today**. v. 16, p. 322-24, 1995.

LANGLEY, J. N. **The Autonomic nervous system**. Cambridge: Heffer & Sons. Part 1, 96 p, 1921.

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, p. 96-101, 2002.

LOMAX, A. E.; SHARKEY, K. A.; FURNESS, J. B. The participation of the sympathetic

innervation of the gastrointestinal tract in disease states. **Neurogastroenterology and Motility**. v.22, p. 7–18, 2010.

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.

LUFT, B. J.; HAFNER, R.; KORZUN, A. H.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D.; BOSLER, E. M.; BOURLAND, D. D.; UTTAMCHANDANI, R.; FUHRER, J.; JACOBSON, J.; MORLAT, P.; VILDE, J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine**. v. 329, p. 995-1000, 1993.

MAUDLEJ, N.; HANANI, M. Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. **Brain Research**. v. 578, p. 94–98, 1992.

MELLO, E. V. S. L.; MIRANDA, NETO, M. H.; NATALI, M. R. M. Morfologia Do Colo Proximal De Ratos. **Unimar**. v. 18, p. 369-386, 1996.

MERCIER, C.; ADJOGBLE, K. D. Z.; DÄUBENER, W.; DELAUW, M. F. C. Dense granules: Are they Key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? **International Journal for Parasitology**. v. 35, p. 829-849, 2005.

MERCIER, C.; DUBREMETZ, J. F.; RAUSCHER, B.; LECORDIER, L.; SIBLEY, L. D.; DELAUW, M. F. C. Biogenesis of Nanotubular Network in *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. **Molecular Biology of the Cell**. v. 13, p. 2397-2409, 2002.

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 639–641, 1998.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. v.12, p. 1965–1976, 2004.

MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M.; SIBLEY, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring. **Journal Experimental Medicine**. v. 190, p. 1783-1792, 1999.

MORDUE, D. G.; SIBLEY, L. D. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. **The Journal of Immunology**. v. 159, p. 4452–4459, 1997.

MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**. v. 108, p. 2457-2464, 1995.

NASSER, Y.; HO, W.; SHARKEY, K. A. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. **Journal of Comparative Neurology**. v. 495, p. 529–553, 2006.

NEUNLIST, M.; ALBERT, P.; BONNAUD, S.; LANDEGHEM, L. V.; CORON, E.;

WEDEL, T.; NAVEILHAN, P.; RUHL, A.; LARDEUX, B.; SAVIDGE, T.; PARIS, F.; GALMICHE, J. P. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. **The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 292, p.231-241, 2007.

NEUNLIST, M.; BAROUK, J.; MICHEL, K.; JUST, I.; ORESHKOVA, T.; SCHEMANN, M.; GALMICHE, J. P. Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1 β -dependent pathway. **The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 285, p. 1049-55, 2003.

NEUNLIST, M.; LANDEGHEM L. V.; MAHÉ, M. M.; DERKINDEREN, P. DES VARANNES, STANISLAS B.; ROLLI-DERKINDEREN, M. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v. 10,p. 90-100, 2013.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisons) du gondi. **Comptes Rendus de l' Académie des Sciences** v. 147, p. 736, 1908.

ODORIZZI, L.; MOREIRA, N. M., GONÇALVES, G. F.; DA SILVA, A. V.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in Swines with toxoplasmosis. **Autonomic Neuroscience**. v. 155, p. 68-72, 2010.

PEREIRA, L.S.; da SILVA, A. V.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Hypertrophy of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in rat jejunum after acute infection caused by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 16, p. 298-310, 2010.

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, J. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**. v. 51, p. 215-236, 1997.

RADKE, J. R.; STRIEPEN, B.; GUERINI, M. N.; JEROME, E.; ROOS, M.; WHITE, D. S.; M. W. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 115, p. 165-175, 2001.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric Glia. **Neurogastroenterology and Motility**. v. 16, p. 44-49, 2004.

RÜHL, A.; TROTTER, J.; STREMMEL, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterology and Motility**.v. 13, p. 95–106, 2001.

SABAJ, V.; GALINDO, M.; SILVA, D.; SANDOVAL, L.; RODRÍGUEZ, J. C. Analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 gene (SAG2). Relevance of genotype I in clinical toxoplasmosis. **Molecular Biology Reports**. v. 37, p. 2927-2933, 2010.

SANT'ANA, D. M. G.; GÓIS, M. B.; ZANONI, J. N.; DA SILVA, A. V.; DA SILVA, C. J. T.; ARAÚJO, E. J. A. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 93, p. 279–86, 2012.

SANTAOLALLA, R.; ABREU, M. T. Innate immunity in the small intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 28, p. 124-9, 2012.

SAVIDGE, T. C.; NEWMAN, P.; POTHOUKAKIS, C.; RÜHL, A.; NEUNLIST, M.; BOURREILLE, A.; HURST, R.; SOFRONIEW, M. V. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology**. v. 132, p. 1344–1358, 2007.

SCHABADASCH, A. Intramurale Nervengeflechtes Darmrohrs. **Z Zellforsch Mikrosk Anat journal**. v. 10, p. 320–385, 1930.

SCHWAB, J. C.; BECKRS, C. J. M.; JOINER, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions a molecular sieve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, p. 509-513, 1994.

SHIRAISHI, C. S.; AZEVEDO, J. F.; DA SILVA, A. V.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**. v. 39, p. 2146-53, 2009.

SIBLEY, L. D.; ANDREWS, N. W. Cell Invasion by Un-Palatable Parasites. **Traffic**. v. 1, p. 100-106, 2000.

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 of London. Biological sciences**. v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SIBLEY, L. D.; WEIDNER, E.; KRAHENBUHL, J. L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature**. v. 315, p. 416–419, 1985.

SILVA, P. C.; SHIRAISHI, C. S.; DA SILVA, A. V.; GONÇALVES, G. F.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. *Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. **Experimental Parasitology**. v. 125, p. 380-386, 2010.

SINAI, A. P.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **The Journal of Cell Biology**. v. 154, p. 95-108, 2001.

SOLDATI, D.; MEISSNER, M. *Toxoplasma*: as a novel system for motility. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, p. 32-40, 2004.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Parasitology**. v. 116, p. 35-42, 1998.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia ricordata in moltipunti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 3, p. 109-112, 1908.

SUGAUARA, E. Y. Y.; SANT'ANA, D. M. G.; DA SILVA, A. V.; SOUZA, E. A.; ARAÚJO, E. J. A Hypertrophy of the neurons in the ileum from rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (Genotype II). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 31, p. 195-201, 2009.

- SUGAUARA, E. Y.Y.; SANT'ANA, D. M. G.; ALMEIDA, E. C.; REIS, A. B.; DA SILVA, A. V.; ARAÚJO, E. J. A. Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 66, p. 516-523, 2008.
- TENTER, A. M.; HEUCKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animal to humans. **International Journal of Parasitology**. v. 30, p. 1217-58, 2000.
- TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **Anatomical record**.v. 262, p. 71–8, 2001.
- TOUMI, F.; NEULIST, M.; DENIS, M. G.; ORESHKOVA, T.; LABOISSE, C. L.; GALMICHE, J. P.; JARRY, A. Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 317, p. 187-91, 2004.
- VAN LANDEGHEM, L.; MAHÉ, M. M.; TEUSAN, R.; LÉGER, J.; GUIBLE, I.; HOULGATTE, R.; NEUNLIS, M. Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. **BMC Genomics**.v.10, p. 507, 2009.
- VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Research**. v. 312, p. 149–154, 2003.
- VON BOYEN, G. B. T.; SCHULTE1, N.; PFLÜGER1, C.; SPANIOL, U.; HARTMANN, C.; STEINKAMP, M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterology**. v. 11, p. 3, 2011.
- WEBER, E.; NEUNLIST, M.; SCHEMANN, M.; FRIELING, T. Neural components of distension-evoked secretory responses in the *Guinea-Pig* distal colon.**Journal of Physiology**. v. 536, p. 741-51, 2001.
- WEISS, L. M.; KIM, K. (Orgs) *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Perspectives and methods.Alterations in host-cell biology due to Toxoplasma gondii**.First edition, London: Elsevier. 752 p. 2007.
- WOLSKI, T.; MELLO, E. V. S. L.; MARÇAL-NATALI, M. R. Morfologia do epitélio intestinal de ratos adultos utilizando-se como meio de inclusão o paraplast e o glicometacrilato. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**. v. 3, p. 111-115, 1999.
- WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**. v. 7, p. 299-316, 1993.
- WONG, S.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy.**Clinical of Infect Disease**. v.18, p. 853–862, 1994.
- YU, Y. B.; LI, Y. Q. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier.**World Journal of Gastroenterology**. v. 20, p. 11273–11280, 2014.

ZANIOLO, L. M.; DA SILVA, A. V.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. *Toxoplasma gondii* infection causes morphological changes in cecal myenteric neurons. **Experimental Parasitology**. v. 130, p. 103-109, 2012.

CAPÍTULO 2

Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induz morte de neurônios entéricos submucosos e alterações na túnica mucosa no cólon proximal de ratos

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *International Journal of Experimental Pathology* (anexo 1).

Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induz morte de neurônios entéricos submucosos e alterações na túnica mucosa no cólon proximal de ratos

Marcelo Biondaro Góis¹; Catchia Hermes-Uliana²; Maísa Cristina Barreto Zago¹; Jacqueline Nelisis Zanoni¹; Aristeu Vieira da Silva³; Marcílio Hubner de Miranda Neto¹; Eduardo José de Almeida Araújo⁴; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana¹

*Universidade Estadual de Maringá*¹; *Universidade Federal de Mato Grosso do Sul*²; *Universidade Estadual de Feira de Santana*³ and *Universidade Estadual de Londrina*⁴, Brasil.

Resumo

A secreção no epitélio intestinal é coordenada pela ação do plexo submucoso sob a produção de mediadores químicos que regulam a mucosa intestinal no intuito de ampliar a resposta imunobiológica, facilitar o trânsito intestinal e promover uma ação direta a agentes infecciosos, dentre eles o *Toxoplasma gondii*, agente da toxoplasmose, que se encontra distribuído mundialmente. No presente estudo objetivou-se analisar os efeitos da infecção crônica pelo *T. gondii* sobre a morfologia da túnica mucosa e de neurônios entéricos submucosos do cólon proximal de ratos. Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus* com 60 dias de idade, distribuídos em grupo controle (GC) e grupo infectado (GI). Os animais receberam por via oral 500 oocistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Após 36 dias, os animais foram mortos e amostras dos cólons proximais foram fixadas e submetidas ao processamento histológico para avaliação da túnica mucosa, e as técnicas de Giemsa e imunorreatividade ao VIP (VIP-IR) para evidenciação neuronal. Após 36 dias, a população total de neurônios evidenciados por Giemsa reduziu em 16,20%. Os neurônios VIP-IR aumentaram em 25,95% e os linfócitos intra-epiteliais aumentaram em 62,86%. As células caliciformes produtoras de sulfomucinas reduziram em 22,87%. Houve aumento na espessura da túnica mucosa e das profundidades das criptas em 48,14% e 43,02%, respectivamente. Conclui-se que a infecção crônica pelo *T. gondii* induz morte e hipertrofia em neurônios entéricos submucosos remanescentes e alterações na túnica mucosa no cólon proximal de ratos.

Palavras-chave

mucinas, plexo submucoso, polipeptídeo intestinal vasoativo, sistema nervoso entérico, toxoplasmose

Autor para correspondência:

Marcelo Biondaro Góis
Departamento de Ciências Morfológicas
Universidade Estadual de Maringá, Brasil.
Tel.: +55 (44) 3011 4963
Fax: +55 (44) 3011 5988
E-mail: marcelobiondaro@gmail.com

1 Introdução

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns, tanto no homem, como nos animais, apresentando ampla distribuição geográfica. Estima-se que mais de um terço da população humana já foi infectada pelo parasito *Toxoplasma gondii*, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa e causador dessa doença (Sibley 2003; Weiss e Kim 2007; Flegr *et al.* 2014). A principal forma de infecção dos hospedeiros intermediários se dá por via oral, pela ingestão de oocistos liberados pelas fezes de felídeos, que podem estar presentes no solo, na água e nos alimentos (Dubey *et al.* 1997; Speer e Dubey 1998). Após a ingestão, os oocistos chegam ao trato gastrointestinal e encontram a superfície da mucosa intestinal (Jackson e Hutchison 1989; Weiss e Kim 2007), constituída de células epiteliais que desempenham um importante papel na função de barreira mecânica às agressões do meio externo (Neunlist *et al.* 2013; Cohen e Denkers 2014).

No epitélio intestinal, destacam-se entre os enterócitos, linfócitos intra-epiteliais (LIEs) que por estarem muito próximos da superfície mucosa exercem um papel inicial na imunidade das mucosas contra patógenos e outros antígenos (Elia e Souza 2001; Cohen e Denkers 2014). Também neste epitélio estão as células caliciformes, responsáveis pela produção e liberação de mucinas, que em contato com o lúmen formam um filme que lubrifica e protege o epitélio intestinal contra patógenos (Deplancke e Gaskins 2001; Foong e Bornstein 2009; Gwynne *et al.* 2009). Estas células e a composição das mucinas secretadas sofrem alterações em resposta à infecção por microrganismos e parasitos incluindo o *T. gondii* (Deplancke e Gaskins 2001; Moal e Servin 2006; Shiraishi *et al.* 2009; Sant'Ana *et al.* 2012).

Nossos estudos anteriores demonstraram que a infecção pelo *T. gondii* induz diversas alterações morfométricas na parede intestinal e em neurônios entéricos correlacionados entre si e em diferentes animais como: gatos (Da Silva *et al.* 2010); suínos (Odorizzi *et al.* 2010; Silva *et al.* 2010); frangos (Shiraishi *et al.* 2009; Bonapaz *et al.* 2010; Braga *et al.* 2011); e ratos (Hermes-Uliana *et al.* 2011; Sant'Ana *et al.* 2012).

O sistema nervos entérico (SNE) é formado por dois plexos ganglionados: o mientérico e o submucoso (Furness 2012). Ambos são constituídos por neurônios e células da glia (Neunlist *et al.* 2013). O primeiro controla a motilidade intestinal, o segundo coordena o fluxo sanguíneo e a secreção da túnica mucosa (Furness 2012). As funções do plexo submucoso dependem de alguns neuromediadores, dentre eles, o polipeptídeo intestinal

vasoativo (VIP) o qual induz a vasodilatação e modula a liberação de mucinas, controla a proliferação de células caliciformes, enterócitos e linfócitos na lâmina própria e na tela submucosa. Os neurônios VIPérgicos representam 45% da população neuronal submucosa. No entanto, são poucos os estudos que avaliam as alterações quantitativas e morfométricas da túnica mucosa, da tela submucosa e de neurônios do plexo submucoso em integração com parâmetros quantitativos referentes a células caliciformes, enterócitos, LIEs, população total de neurônios e subpopulação VIPérgica em infecções crônicas provocada por oocistos de *T. gondii* os existentes são restritos ao intestino delgado (Sant'Ana *et al.* 2012).

Diante do interesse em compreender os danos causados pelo parasito e as respostas locais frente à infecção pelo *T. gondii* realizamos este trabalho com o objetivo de avaliar os danos apresentados na fase crônica pela túnica mucosa, tela submucosa e neurônios do plexo submucoso do cólon. Buscamos também avaliar e compreender as respostas adaptativas e de defesa de natureza morfológica e quantitativa presentes na população total de neurônios e na subpopulação VIPérgica, em integração com os LIEs, células caliciformes e enterócitos.

2 Material e métodos

Delineamento experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense (Protocolo nº 12361/2008) (Anexo 1).

Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus* Wistar machos, com 60 dias de idade e massa corporal de $258,58 \pm 13,64$ g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=10): grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) experimentalmente com oocistos do *Toxoplasma gondii*, da cepa ME-49 (genótipo II).

Para obtermos os oocistos, três gatos (*Felis catus*) foram inoculados por via oral com cistos teciduais de *T. gondii* cepa ME-49 (genótipo II) isolados de camundongos (*Mus musculus*) infectados. Fezes dos gatos foram coletadas durante os sete primeiros dias após inoculação. Os oocistos foram concentrados utilizando o método de Sheather e esporulados em solução de ácido sulfúrico a 2% (Sloss *et al.* 1999).

Inoculação

Os ratos do GC receberam por via oral, um mL de solução salina estéril. Os ratos de GI receberam pela mesma via 500 oocistos esporulados do *T. gondii* ressuspendidos em um mL de solução salina estéril. Ambos os grupos foram mantidos por 36 dias em um biotério setorial com temperatura e luminosidade controladas, recebendo ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

Eutanásia e coleta do cólon proximal

Trinta e seis dias após a infecção (dpi) os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano (Vivas *et al.* 2007). Após a necrópsia, o cólon proximal foi retirado, mensurado, lavado e fixado.

Detecção de anticorpos séricos

Coletou-se sangue de todos os animais no início e fim do experimento. O soro foi submetido ao método de aglutinação direta (MAD) (Desmonts e Remington 1980), com objetivo de detectar a presença de anticorpos IgG anti - *T. gondii*.

Técnica de Giemsa

Um segmento de cinco cm do cólon proximal de cada rato foi lavado com solução salina a 0,9% (pH 7,2), preenchidos e imersos em solução fixadora de formol acético por 48 horas para evidenciação da população neuronal total. Após, foram dissecados, com auxílio de estereomicroscópio com transiluminação, retirando as túnicas mucosa e muscular, restando apenas a tela submucosa para a exposição do plexo submucoso. Os preparados totais de tela submucosa foram corados com solução corante de Giemsa em tampão fosfato de Sorensen (Barbosa 1978).

Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios submucosos

Foram contados todos os neurônios evidenciados em 50 campos microscópicos (0,14mm²/campo) para cada rato. A contagem foi realizada diretamente ao microscópio fotônico (Motic BL) com ampliação de 400X.

Foram mensuradas as áreas do corpo celular e do núcleo de 100 neurônios, de cada rato. A área do citoplasma foi calculada a partir da diferença entre essas áreas. Além disso, determinou-se a razão entre a área do núcleo e a área do corpo celular. A mensuração foi realizada com o auxílio de um microscópio fotônico, com objetiva de 100X, acoplado ao sistema de análise de imagem Motic Images Plus, versão 2,0.

Técnica imunohistoquímica para neurônios VIP

Outro segmento de cinco cm do cólon proximal foi lavado com tampão fosfato salinado (PBS) 0,1M pH 7,4. O segmento foi preenchido com fixador de Zamboni (Stefanini *et al.* 1967) e fixado por 18 horas a 4°C. Após fixação, o segmento foi aberto ao longo da borda mesocólica e sucessivamente lavado em solução aquosa de etanol 80° para remoção completa do fixador. Realizou-se a desidratação em série ascendente de etanol (95° e 100°), diafanização em xilol e reidratação em série descendente de etanol (99,2°, 90°, 80°, 50°) e estocado em PBS com azida sódica 0,04% a 4°C. Os segmentos foram fracionados em amostras de um cm e dissecados com auxílio de estereomicroscópio com transiluminação, retirando as túnicas mucosa e muscular, mantendo apenas a tela submucosa para a exposição do plexo submucoso. Os preparados totais foram lavados com PBS 0,1M mais Triton 0,3% por cinco minutos, e incubados em solução de bloqueio de soro de cabra mais BSA 2% por duas horas. Em seguida foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-VIP produzido por coelho (1:200, Península Labs, USA), permanecendo sob agitação em temperatura ambiente por 48 horas. Depois deste período os preparados foram lavados três vezes com PBS 0,1M por cinco minutos, realizou-se a incubação em solução com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fluoresceína (1:500, Alexia fluor 488; Molecular Probes) sob agitação em temperatura ambiente protegidos da luz durante duas horas. Em seguida, foram lavados três vezes em PBS 0,1M por cinco minutos, e montados em lâminas e lamínula com anti-Fade e armazenados em refrigerador (Costa *et al.* 1980).

Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios VIP-IR

Foram contados todos os neurônios VIP imunorreativos (VIP-IR) presentes em 20 campos microscópicos (0,084mm²/campo) em imagens capturadas por câmera de alta resolução (AxioCam Zeiss, Jena, Alemanha[®]) acoplada a microscópio de luz (Axioskop Plus Zeiss[®]) com filtros para imunofluorescência (FITC) e objetiva de 20X e 40X. Foram mensuradas as áreas (µm²) de 100 corpos celulares dos neurônios VIP-IR (Alves *et al.* 2010)

A partir do cálculo da área do corpo celular dos neurônios evidenciados pelas diferentes técnicas foi possível dividi-los em classes. As imagens foram transferidas para microcomputador e analisadas com o software *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA[®]). Fotomicrografias foram elaborados através de imagens obtidas em microscópio Confocal (LSM 5 Pascal, Zeiss[®]).

Processamento e análise histológica

Um anel de dois centímetros do cólon proximal de cada rato foi fixado em Bouin e submetido à rotina histológica. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados de 4µm, corados com Hematoxilina e eosina (HE) para quantificação dos enterócitos e linfócitos intra-epiteliais; Periodic acid shiff (PAS) + solução de diástase para detecção de mucinas neutras e sialomucinas lábeis; alcian-blue (AB) pH 2,5 para detecção de sialomucinas e sulfomucinas; e alcian-blue (AB) pH 1,0 para detecção de sulfomucinas (Myers *et al.* 2008).

Contagem de LIEs e células caliciformes

Foram contadas 2500 células epiteliais na túnica mucosa de cada rato e os LIEs presentes entre estas células. A partir do número de LIEs neste intervalo, calculou-se a proporção de LIEs/100 células epiteliais. Para isso, foram necessárias 16 imagens da túnica mucosa de quatro lâminas, sendo uma imagem/quadrante/lâmina coradas por HE (Chott *et al.* 1997). Este mesmo procedimento foi adotado para quantificar as células caliciformes (Hernandes *et al.* 2003) coradas por diferentes técnicas (PAS, AB pH 2,5 e AB pH 1,0).

Análise morfológica da túnica mucosa

Com imagens ampliadas com a objetiva de 20X mediu-se a espessura da túnica mucosa e profundidade das criptas, e com a objetiva de 100X mensurou-se a altura e a larguras enterócitos mensurados em três pontos (ápice, meio e base). Foram realizadas 80 medidas de cada estrutura, distribuídas uniformemente em toda a circunferência do cólon proximal de cada rato.

Imagens foram obtidas e analisadas através de uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel[®]) acoplada a um microscópio de luz trinocular, equipado com sistema de análise de imagem (Motic Image Plus, versão 2.0[®]).

Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos ao teste D'Agostino-Pearson e/ou de Shapiro-Wilk para verificar o tipo de distribuição. Dados com distribuição normal são apresentados como média \pm desvio padrão. Neste caso, para comparar os grupos, utilizou-se teste-*t* de Student, para a comparação entre dois grupos considerando $\alpha=0,05$. Foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

3 Resultados

A efetividade da infecção foi confirmada pela presença de anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii*. Os animais do GC mantiveram-se susceptíveis a infecção. Além disso, foi observado ao longo do experimento que os animais infectados apresentaram fezes pastosas.

No GI, os neurônios submucosos evidenciados por Giemsa sofreram redução de 16,20% em seu número, porém aumentaram as áreas dos corpos celulares em 11,81%, do citoplasma em 13,89% e do núcleo em 9,05%. Os neurônios submucosos VIP-IR aumentaram sua densidade em 25,95% e as áreas dos corpos celulares em 15,70% (Tabela 1).

O número de neurônios distribuídos por classes de acordo com a área do corpo celular estão apresentados nas Figuras 1 e 2 para neurônios evidenciados por Giemsa e VIP, respectivamente.

Os LIEs apresentaram aumento na proporção de 62,86% presentes na túnica mucosa do GI. As células caliciformes produtoras de sulfomucinas sofreram redução significativa em sua proporção (22,87%) enquanto as produtoras de sialomucinas e mucinas neutras tiveram seu número aumentado sem, contudo, alcançar significância estatística (Tabela 2).

No GI, a espessura da túnica mucosa e a profundidade das criptas tiveram aumento significativo de 48,14% e 43,02%, respectivamente. Os enterócitos não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 1. Média \pm desvio padrão da densidade de neurônios do plexo submucoso por mm^2 , das áreas do corpo celular, citoplasma, núcleo e da razão entre a área do núcleo e do corpo celular de neurônios submucosos evidenciados pela técnica de Giemsa e imunorreativos ao Polipetídeo Intestinal Vasoativo (VIP-IR) do cólon proximal de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

Técnicas/ Grupos	GIEMSA		VIP-IR	
	GC	GI	GC	GI
Neurônios/ mm^2	331,55 \pm 46,65 ^a	277,84 \pm 55,31 ^b	155,01 \pm 14,73 ^a	195,35 \pm 40,05 ^b
Corpo celular (μm^2)	178,87 \pm 73,79 ^a	200,01 \pm 80,66 ^b	420,88 \pm 133,32 ^a	486,98 \pm 137,79 ^b
Citoplasma (μm^2)	102,30 \pm 44,46 ^a	116,51 \pm 50,22 ^b	-	-
Núcleo (μm^2)	76,57 \pm 29,61 ^a	83,50 \pm 30,98 ^b	-	-
Razão	0,75 \pm 0,05 ^a	0,72 \pm 0,07 ^b	-	-

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão da proporção de linfócitos intra-epiteliais (LIEs) e células caliciformes/100 células epiteliais presentes na túnica mucosa do cólon proximal de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

Cells	Técnicas	GC	GI
LIEs	HE	11,39 \pm 0,64 ^a	18,55 \pm 2,06 ^b
	PAS	22,61 \pm 1,43 ^a	26,57 \pm 3,04 ^a
Células caliciformes	AB pH 1,0	24,57 \pm 3,05 ^a	18,95 \pm 2,36 ^b
	AB pH 2,5	23,23 \pm 6,58 ^a	26,54 \pm 2,74 ^a

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 3. Média \pm desvio padrão de mensurações da túnica mucosa do cólon proximal de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

Parâmetros (μm)	CG	GI
Túnica Mucosa	164,89 \pm 20,04 ^a	244,27 \pm 28,98 ^b
Profundidade de Cripta	58,85 \pm 10,43 ^a	84,17 \pm 18,00 ^b
Altura de Enterócitos	20,12 \pm 1,86 ^a	20,41 \pm 3,36 ^a
Largura de Enterócitos	6,54 \pm 0,36 ^a	6,35 \pm 0,62 ^a

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

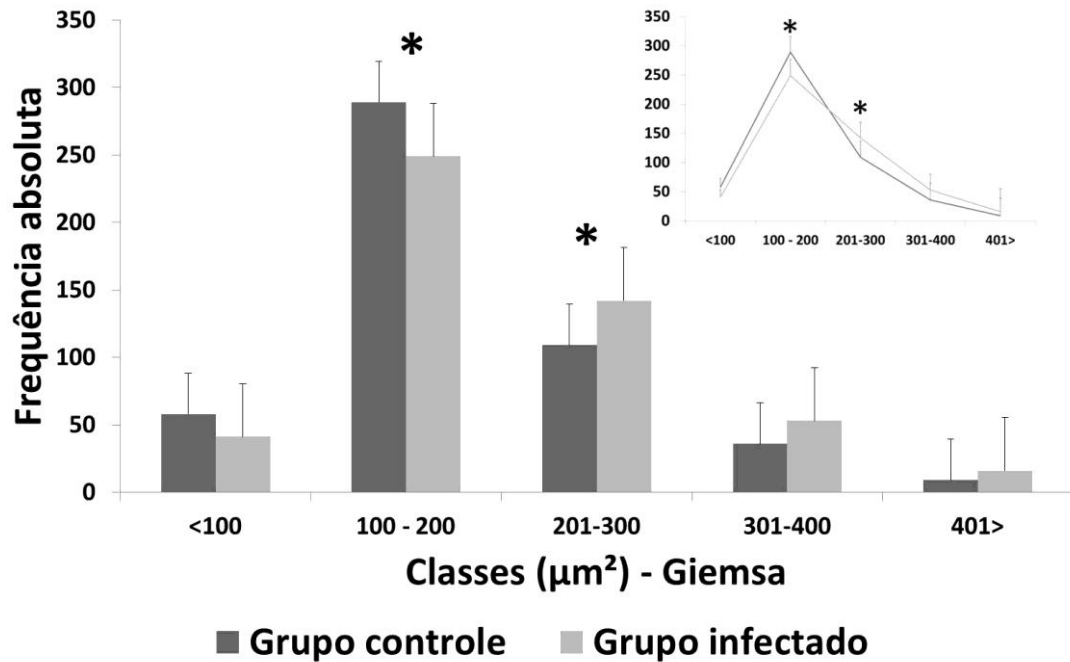


Figura 1. Distribuição dos neurônios submucosos do cólon proximal de ratos em classes de acordo com a área do corpo celular do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II). Asteriscos indicam diferença significativa entre as colunas de uma mesma classe ($p < 0.05$).

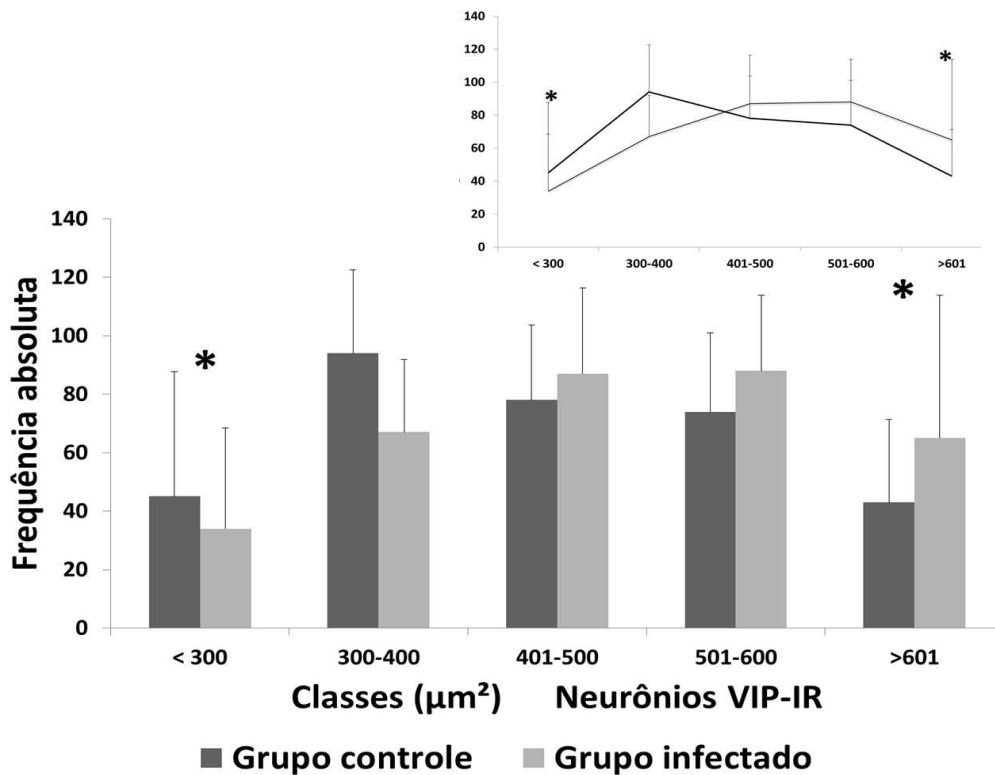


Figura 2. Distribuição dos neurônios submucosos do cólon proximal de ratos em classes de acordo com a área do corpo celular do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II). Asteriscos indicam diferença significativa entre as colunas de uma mesma classe ($p < 0.05$).

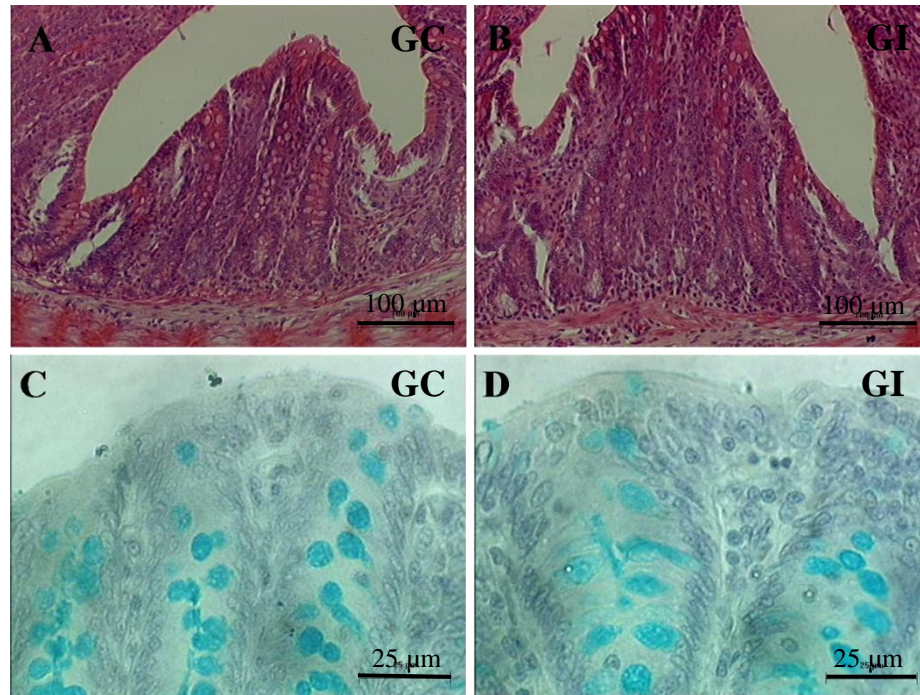


Figura 3. Fotomicrografias da túnica mucosado cólon proximal de ratos coradas pelas técnicas de HE (A e B) e Alcian-Blue pH 1,0 (C e D), do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

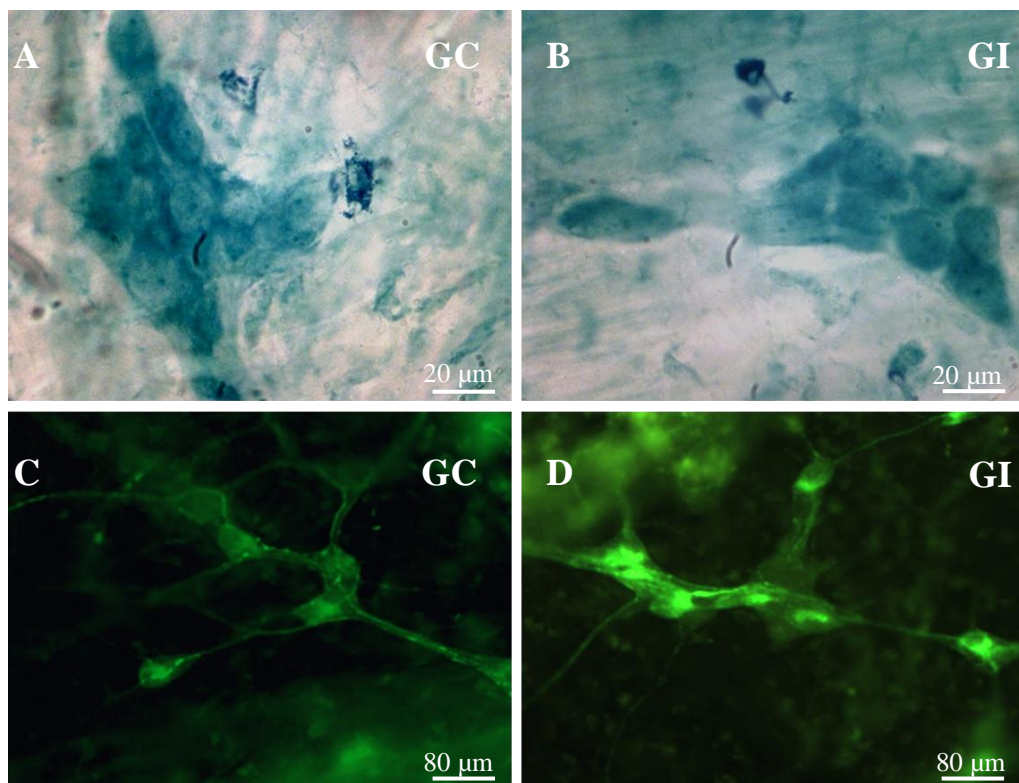


Figura 4. Fotomicrografias de preparados totais do plexo submucoso do cólon proximal de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II), evidenciados pelas técnicas de Giemsa (A e B) e VIP-IR (C e D).

4 Discussão

Foram detectados anticorpos séricos anti-*T. gondii* em todos os ratos infectados utilizados neste estudo. Com o mesmo modelo de infecção experimental, Sant'Ana *et al.* (2012) relataram a presença de anticorpos séricos anti-*T. gondii* e isolamento de cistos teciduais em camundongos. No presente estudo, analisamos os diferentes constituintes da túnica mucosa após a infecção oral pelo *T. gondii* já que o parasito atravessa a túnica mucosa para alcançar os vasos sanguíneos e linfáticos da tela submucosa (Barragan e Sibley 2003). Verificamos que neste trajeto, o parasito provoca alterações teciduais como já descrito para outras espécies de hospedeiros (Dunay e Sibley 2010; Cohen e Denkers 2014) e em LIEs e neurônios do plexo submucoso do intestino delgado de ratos (Sant'Ana *et al.* 2012).

A redução dos neurônios submucosos do grupo infectado sugere que a infecção pelo *T. gondii* foi a principal responsável pela morte de 16,20% da população neuronal total.

Frente aos nossos resultados, questionamos quais seriam os motivos que levam neurônios entéricos a morte? Vários estudos demonstraram que o *T. gondii* usa a célula hospedeira para replicação sem induzi-la a morte. Este parasito possui a capacidade de modular a expressão de genes que regulam e inibem a apoptose (Hwang *et al.* 2010; Dos Santos *et al.* 2011; Liu *et al.* 2013; Contreras-Ochoa *et al.* 2013). Células invadidas pelo *T. gondii* buscam eliminá-lo enquanto o parasito, como parte de um dos mecanismos de evasão à resposta imune, no primeiro momento, evita apoptose da célula hospedeira para que possa se reproduzir (Goebel *et al.* 2001; Hwang *et al.* 2010; Dos Santos *et al.* 2011; Contreras-Ochoa *et al.* 2013). Nestas células, o parasito associa-se por meio de seu vacúolo parasitóforo à mitocôndrias, de onde obtém energia (Beckers *et al.* 1994; Mercier *et al.* 2002; Hajj *et al.* 2007) para sua replicação e desenvolvimento (Arrizabalaga 2011; Carmen e Sinai, 2011). Por outro lado, o parasito pode provocar disfunções mitocondriais fatais (Beckers *et al.* 1994; Hajj *et al.* 2007). Desta forma, o parasito assume o controle da maquinaria de síntese na célula hospedeira (Carmen e Sinai 2011) que em cultura de astrócitos foi mantido por 24 horas até que o parasito conseguisse replicar-se e disseminar-se invadindo novas células e consequentemente provocar a destruição da primeira (Contreras-Ochoa *et al.* 2013). Diante disto, nós acreditamos que os neurônios entéricos podem ter morrido em decorrência do parasitismo direto após replicação e disseminação do parasito ou por conta de uma resposta imune local.

Se por um lado houve redução na densidade da população neuronal total evidenciada pela técnica de Giemsa, por outro as áreas de seus núcleos e dos citoplasmas apresentaram-se maiores (9,05% e 13,89%, respectivamente), indicando que tanto o núcleo quanto o citoplasma passaram por mecanismos adaptativos com incremento de sua maquinaria de síntese visando atender as demandas do tecido alvo. Adaptações semelhantes foram relatadas em neurônios entéricos em diferentes condições experimentais (Hermes-Uliana *et al.* 2011; Hermes-Uliana *et al.* 2014). Este aumento refletiu em maior área do corpo celular promovendo redução de neurônios que ocupavam a classe entre 100-200 μm^2 e aumento na classe de neurônios entre 201-300 μm^2 nos animais do GI.

Os neurônios VIP-IR do plexo submucoso do cólon proximal dos animais GI aumentaram sua densidade em 25,95%, passando de 46% para 70% do número total de neurônios. As áreas dos corpos celulares tornaram-se 15,70% maiores, e houve um aumento na frequência de neurônios com área do corpo celular maior que $>601 \mu\text{m}^2$, evidenciando um significativo aumento na expressão deste polipeptídeo e também que neurônios que não expressavam VIP passam a expressar. O aumento na expressão do VIP é necessário à sobrevivência de neurônios submucosos em sofrimento desencadeado por agentes agressores, em função de este polipeptídeo ter um potente efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico (Vacas *et al.* 2012).

A maior produção de VIP também tem grande importância para os tecidos adjacentes, pois os neurônios VIP-IR produzem IL-8 que está envolvida no reparo do epitélio intestinal (Toumi *et al.* 2004), modula a expressão de citocinas inflamatórias (Sandgren *et al.* 2003) e a proliferação de linfócitos T (Balemba *et al.* 1998). Acreditamos que a maior expressão do VIP está associada a maior densidade de LIEs e somados evidenciam a cronificação da resposta inflamatória ainda presente após 36 dias de infecção.

O SNE atua em sincronia com os sistemas nervoso central e endócrino, para manter a homeostase do trato gastrointestinal (Gunawardene *et al.* 2011) e envolve ainda o sistema imune local que é modulado por neurônios VIPérgicos submucosos (Weber *et al.* 2001; Toumi *et al.* 2004). Constatamos que a população de LIEs esteve 62,86% aumentada além de um perceptível aumento de linfócitos na lâmina própria que resultam em sua maior espessura. A migração de linfócitos induzida pela infecção pelo *T. gondii* desempenha um importante papel na resposta inflamatória intestinal (Cohen e Denkers 2014). Na inflamação

induzida por *Trypanosoma cruzi*, Moreira *et al.* (2013) descreveram aumento de 44,70% de LIEs na túnica mucosa do cólon de camundongos.

Os LIEs se diferenciam e expressam receptores específicos como o CCR5 (Luangsay *et al.* 2003), produzem IFN- γ que reduz a multiplicação do parasito e o número de células infectadas (Mennechet *et al.* 2002; Kunisawa *et al.* 2007; Cohen e Denkers 2014). Podemos inferir que esta proteção estende-se também aos neurônios do plexo submucoso, pois havendo menos replicação do parasito nos tecidos adjacentes, reduz-se também a possibilidade de infecção direta de neurônios por *T. gondii* e a deflagração da morte neuronal por mecanismos indiretos.

A população de LIEs regula a resposta imune na túnica mucosa e participa do processo de indução a tolerância oral (Cheroutre 2004). Podem sintetizar citocinas anti-inflamatórias e reguladoras e fatores de crescimento importantes para a renovação epitelial e reparo a danos teciduais, tendo um papel chave na manutenção da homeostase intestinal. Sendo assim, o aumento do número de LIEs em uma infecção é de extrema importância visando seu controle e a eficácia da função da barreira intestinal (Cheroutre 2004; Kunisawa *et al.* 2007; Cohen e Denkers 2014).

As células caliciformes também exercem um papel importante na manutenção da integridade do epitélio intestinal, pois produzem mucinas, peptídeos antibacterianos, peptídeo trefoilfactor3 (TFF3) resistin-like molecule β (RELM β), e Fc- γ binding protein (Fcgbp) que atuam no combate a antígenos luminiais (Bergstrom *et al.* 2008; Kim e Ho 2010). Em contato com a água, as mucinas formam o muco que protege o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos (Deplancke e Gaskins 2001). Estudos de infecção com *T. gondii* demonstram que esporozoítos atravessam o epitélio intestinal, tanto através de enterócitos, como através células caliciformes (Speer e Dubey 1998). Neste estudo, o *T. gondii* causou redução da proporção de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas do tipo sulfomucinas (AB 1,0⁺) em 22,87%. Por outro lado, células caliciformes produtoras de sialomucinas (AB 2,5⁺) e mucinas neutras (PAS⁺) tiveram tendência a aumento. Diante da menor produção de mucinas ácidas, entende-se que as mucinas neutras que são menos hidrofílicas passaram a predominar, alterando a composição química e física do muco. O muco neutro é mais denso que o ácido e pode apresentar uma maior capacidade de proteção e lubrificação, quando as células epiteliais são expostas a agentes abrasivos e irritantes. Cabe destacar que a atuação das mucinas como

barreira à penetração de patógenos se deve ao fato de formarem uma trama hidrofílica que agrega agentes antimicrobianos, como, lisozima e imunoglobulinas (Carvalho e Collares-Buzato 2005). A alteração da composição do muco seria uma forma de dificultar novas infecções pelo *T. gondii* também a ocorrência de infecções secundárias (Buzoni-Gatel e Werts 2006).

A alteração na consistência das fezes, de sólidas para pastosas, pode ter como principal causa a redução de células caliciformes secretoras de sulfomucinas, tornando o muco mais denso, com possível retardo na absorção de água e eletrólitos, pela dificuldade no acesso ao epitélio. Desta forma, a maior disponibilidade hídrica luminal seria a principal causa da alteração da consistência fecal. No íleo de frangos o *T. gondii* induziu um aumento no número de células caliciformes produtoras de mucinas neutras (Shiraishi *et al.* 2009). Com o mesmo modelo experimental, observamos resultados diferentes no jejuno, onde o *T. gondii* causou redução de 12,7% de células caliciformes PAS⁺, e de 18,3% das AB 1,0⁺ ($p < 0,05$). Yunus *et al.* (2005) também verificaram respostas diferentes das células caliciformes do intestino delgado e intestino grosso estudando camundongos infectados com o protozoário *Eimeria pragensis* (Apicomplexa), tendo detectado hipoplasia das células caliciformes no intestino grosso, porém, no jejuno não encontraram alterações. A heterogeneidade da resposta das células caliciformes em diferentes segmentos intestinais merece ser investigada.

Neste experimento, verificou-se hipertrofia da túnica mucosa (48%) dos ratos do grupo GI, associado a aumento na profundidade das criptas (30,59%), fato observado também em estudo de Silva *et al.* (2010) em gatos. As criptas respondem pela proliferação celular do epitélio intestinal, devido a atividade mitótica constante das células localizadas nestas estruturas (Applegate *et al.* 1999). Quanto maior a profundidade da cripta, maior será atividade proliferativa celular, para garantir adequada taxa de renovação epitelial, compensando as perdas de células da região apical (Pluske *et al.* 1997) em razão de estresse fisiológico. Nossos resultados demonstram a adaptação tecidual visando a proteção do epitélio e a transposição bacteriana, uma vez que o parasito associado a resposta imune poderia levar a desorganização das células epiteliais e instalação de infecções oportunistas (Buzoni-Gatel e Werts 2006).

Em relação aos enterócitos, não ocorreram alterações morfométricas significantes no grupo infectado. Os enterócitos são as células mais frequentes no epitélio intestinal e,

portanto, formam uma importante barreira biológica para impedir a penetração do parasito na corrente sanguínea. Como os enterócitos são células que sofrem uma rápida renovação e a análise foi realizada após 36 dias de infecção, supõe-se que na fase aguda tenham ocorrido alterações na estrutura destas células em resposta ao parasito, e que as células alteradas tenham sido substituídas por outras que apresentaram morfologia inalterada, como consequência do processo contínuo de renovação. Enterócitos com morfologia alterada foram encontrados em infecções agudas pelo *T. gondii* no íleo de camundongos (Eganet *al.* 2012), e não existem estudos que avaliaram os enterócitos no cólon proximal de ratos infectados por oocistos de *T. gondii*.

Em síntese, a inoculação oral de 500 oocistos de *T. gondii* cepa ME-49 promoveu a infecção conforme comprovado pelo exame sorológico. A infecção crônica causou importantes prejuízos para o cólon proximal como: morte de 16,20% dos neurônios submucosos e redução em 22,87% das células caliciformes produtoras de sulfomucinas. Foram desencadeados mecanismos adaptativos dentre eles: aumento da área dos núcleos e do citoplasma dos neurônios, em decorrência da incrementação de sua maquinaria de síntese para atender a demanda dos tecidos alvo; desvio fenotípico de neurônios que não expressavam VIP em neurônios VIPérgicos levando ao aumento na proporção desta subpopulação neuronal em 25,95%, com aumento de seus corpos celulares 15,70%. O aumento na expressão de VIP é a princípio uma adaptação neuroplástica que visa garantir a sobrevivência dos neurônios. Houve evidências da resposta inflamatória na infecção crônica pela maior expressão de VIP, intenso aumento de LIEs na mucosa, aumento da espessura da túnica mucosa e aumento da profundidade das criptas. Apesar de evidente, a resposta inflamatória foi aparentemente controlada. A integridade epitelial e o controle da resposta inflamatória observada na infecção crônica foram garantidos pelo: 1) aumento na expressão de VIP que reduz citocinas pró-inflamatórias e produz IL-8; 2) aumento de LIEs que sintetizam citocinas antiparasitárias e fatores de renovação celular, que resulta em criptas mais profundas e enterócitos íntegros; 3) alterações na composição do muco também modulados por neurônios submucosos VIPérgicos. As alterações nos parâmetros mencionados demonstram que mesmo em animais assintomáticos e imunocompetentes há uma demanda orgânica de longo prazo para adaptar o hospedeiro à presença deste parasito, o que sugere o rato como um bom modelo experimental para o estudo de processos inflamatórios intestinais crônicos similares aos que ocorrem em humanos de maneira subclínica e com manifestações clínicas intermitentes ou esporádicas.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá e a Universidade Paranaense pelo suporte técnico e financeiro, a coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor e a Fundação Araucária por financiar a compra de parte dos reagentes.

Contribuições dos autores

Todos os autores foram envolvidos na elaboração do desenho experimental, supervisão, análise e interpretação de dados e redação e aprovação final da versão apresentadas para publicação do manuscrito.

Conflito de interesse

Declaramos não existir conflito de interesse.

Referências

- Alves E.P., Alves A.M., Pereira R.V., de Miranda Neto M.H. & Zanoni J.N. (2010) Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. *Nutr. Neurosci.* **13**, 43-51.
- Applegate T.J., Dibner M.L., Kitchell Z. & Lilburn M.S. (1999) Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration, and proliferation of the turkey poult. *Comp. Biochem. Physiol.* **124**, 381-389.
- Arrizabalaga G. (2011) A Fine Balance between Life and Death: Modulation of BCL-2 Family Members by *Toxoplasma Gondii*. *Front. Microbiol.* **2**, 39 1-2.
- Ayres M., Ayres Jr M., Ayres D.L. & Dos Santos A.A.S. (2007) BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá. Belém. *MCT-CNPq*.
- Balemba O.B., Grøndahl M.L., Mbassa G.K., Semuguruka W.D., Hay-Smith A., Skadhauge E. & Dantzer V. (1998) The organization of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. *J. Anat.* **192**, 257-267.
- Barbosa A.J.A. (1978) Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* **11**, 95-97.
- Barragan A. & Sibley L.D. (2003) Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **11**, 426-30.
- Beckers C.J.M., Dubremetz J.F., Mercereau-Puijalon O. & Joiner K.A. (1994) The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole

- membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* **127**, 947–61.
- Bergstrom K.S.B., Guttman J.A., Rumi m., Ma C., Bouzari S., Khan MA., Gibson D.L., Vogl A.W. & Valance B.A. (2008) Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. *Infect Immun.* **76**, 796-811.
- Bonapaz R.S., Hermes-Uliana C., Santos F.N., Da Silva A.V., Araújo E.J.A. & Sant'Ana D.M.G. (2010) Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). *Pesq. Vet. Bras.* **30**, 787-792.
- Braga C.F., Da Silva A.V., Sant'ana D.M.G. & Araújo E.J.A. (2011) Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* **63**, 340-347.
- Buzoni-Gatel D. & Werts C. (2006) *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* **22**, 448-52.
- Carmen J.C. & Sinai A.P. (2011) The differential effect of *Toxoplasma gondii* infection on the stability of BCL2-family members involves multiple activities. *Front. Microbiol.* **2**, 1-13.
- Carvalho H.F. & Collares-Buzato C.B. (Orgs) (2005). Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri, São Paulo: *Manole*. 340 p.
- Cheroutre H. (2004) Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 217-46.
- Chott A., Gerdes D., Spooner A., Mosberg I., Kummer J.A., Ebert E.C., Blumberg R.S. & Balk S.P. (1997) Intraepithelial lymphocytes in normal human intestine do not express proteins associated with cytolytic function. *Am. J. Pathol.* **151**, 435-42.
- Cohen S.B. & Denkers E.Y. (2014) Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. *Mucosal Immunol.* **7**, 744-52.
- Contreras-Ochoa C.O., Lagunas-Martínez A., Belkind-Gerson J., Díaz-Chávez J. & Correa D. (2013) *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp. Parasitol.* **134**, 256–65.
- Costa M., Buffa R., Furness J.B. & Solcia E. (1980) Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount. *Histochemistry* **65**, 157-65.
- Da Silva J.M., Da Silva A.V., Araújo E.J.A. & Sant'Ana D.M.G. (2010) The effects of the infection caused by *Toxoplasma gondii* on the cat duodenal wall. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **19**, 55-61.
- Deplancke B. & Gaskins H.R. (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 1131S-1141S.
- Desmots G. & Remington J.S. (1980) Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method of increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 562-568.
- Dos Santos T.A.T., Portes J.A., Damasceno-Sá J.C., Caldas L.A., de Souza W., DaMatta R.A. & Seabra S.H. (2011) Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS ONE* **6**, e27867.

- Dubey J.P., Lindsay D.S. & Speer C.A. (1997) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. microbiol.* **11**, 267-299.
- Dunay I.R. & Sibley L.D. (2010) Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 461-6.
- Egan C.E., Cohen S.B. & Denkers E.Y. (2012) Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 668-75.
- Elia S.C.C. & Souza H.S.P. (2001). *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, p. 1-147.
- Flegr J., Prandota J., Sovičková M. & Israili Z.H. (2014) Toxoplasmosis – A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE* **9**, e90203.
- Foong J.P.P. & Bornstein J.C. (2009) mGluR1 receptors contribute to non-purinergeric slow excitatory transmission to submucosal VIP neurons of guinea-pig ileum. *Front. Neurosci.* **3**, 46.
- Furness J.B. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **38**, 286-94.
- Goebel S., Gross U. & Lüder C.G. (2001) Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. *J. Cell Sci.* **114**, 3495-505.
- Gunawardene A.R., Corfe B.M. & Staton C.A. (2011) Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol.* **92**, 219–31.
- Gwynne R.M., Ellis M., Sjövall H. & Bornstein J.C. (2009) Cholera toxin induces sustained hyperexcitability in submucosal secretomotor neurons in *Guinea pig* jejunum. *Gastroenterology* **136**, 299-308.
- Hajj E.H., Lebrun M., Fourmaux M.N., Vial H. & Dubremetz J.F. (2007) Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhopty protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell. Microbiol.* **9**, 54–64.
- Hermes-Uliana C., Panizzon C.P., Trevizan A.R., Sehaber C.C., Ramalho F.V., Martins H.A. & Zanoni J.N. (2014) Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? *Dig. Dis. Sci.* **59**, 937-48.
- Hermes-Uliana C., Pereira-Severi L.S., Luerdes R.B., Franco C.L., da Silva A.V., Araújo E.J.A. & Sant’Ana D.M.G. (2011) Chronic infection with *Toxoplasma gondii* causes myenteric neuroplasticity of the jejunum in rats. *Auton. Neurosci.* **160**, 3-8.
- Hernandes L., Pereira L.C. & Alvares E.P. (2003) Goblet cell number in the ileum of rats denervated during suckling and weaning. *Biocell* **27**, 347–51.
- Hwang I.Y., Quan J.H., Ahn M.H., Ahmed H.A., Cha G.H., Shin D.W. & Lee Y.H. (2010) *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol. Res.* **107**, 1313-21.
- Jackson M.H. & Hutchison W.M. (1989) The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* **28**, 55-105.

- Kim Y.S. & Ho S.B (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr.Gastroenterol.Rep.***12**, 319–30.
- Kunisawa J., Takahashi I. & Kiyono H. (2007). Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol.Rev.* **215**, 136-53.
- Liu W., Yue W. & Wu R. (2013) Overexpression of Bcl-2 promotes survival and differentiation of neuroepithelial stem cells after transplantation into rat aganglionic colon. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 7.
- Luangsay S., Kasper L.H., Rachinel N., Minns L.A., Mennechet F.J., Vandewalle A. & Buzoni-Gatel D. (2003) CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **125**, 491-500.
- Mennechet F.J., Kasper L.H., Rachinel N., Li W., Vandewalle A. & Buzoni-Gatel D. (2002) Lamina propria CD4⁺ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J. Immunol.***168**, 2988-96.
- Mercier C., Dubremetz J.F., Rauscher B., Lecordier L., Sibley L.D. & Cesbron-Delauw M.F. (2002) Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma parasitophorous* vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol Cell.***13**, 2397–409.
- Moal V.L. & Servin A.L. (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin.Microbiol.Rev.* **19**, 315-37.
- Moreira N.M., Santos F.N., Toledo M.J.de O., Moraes S.M.F., Araújo E.J.A., Sant’Ana D.M.G. & Araújo S.M. (2013) Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Pathol.* **94**, 426–35.
- Myers R.B., Fredenburgh J.L. & Grizzle W.E. (2008) Carbohydrates. In: Bancroft J.D. & Gamble M. (ed.) *Theory and Practice of Histological Techniques* 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, pp. 161–186.
- Neunlist M., Landeghem L.V., Mahé M.M., Derkinderen P., des Varannes, S.B. & Rolli-Derkinderen M. (2013) The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.***10**, 90-100.
- Odorizzi L., Moreira N.M., Gonçalves G.F., Da Silva A.V., Sant’Ana D.M.G. & Araújo E.J.A. (2010) Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in Swines with toxoplasmosis. *Auton.Neurosci.***155**, 68-72.
- Pluske J.R., Hampson D.J. & Williams I.H. (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science***51**, 215-36.
- Sandgren K., Lin Z. & Ekblad E. (2003) Differential effects of VIP and PACAP on survival of cultured adult rat myenteric neurons. *Regul.Pept.***111**, 211-7.
- Sant’Ana D.M.G., Góis M.B., Zanoni J.N., da Silva A.V., da Silva C.J.T. & Araújo E.J.A. (2012) Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Exp. Pathol.* **93**, 279–86.

- Shiraishi C.S., Azevedo J.F., Da Silva A.V., Sant'Ana D.M.G. & Araújo E.J.A. (2009) Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. *Cienc. Rural***39**, 2146-53.
- Sibley L.D. (2003) *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic***4**, 581–6.
- Silva P.C., Shiraishi C.S., Da Silva A.V., Gonçalves G.F., Sant'Ana D.M.G. & Araújo E.J.A. (2010) *Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Exp. Parasitol.***125**, 380-3.
- Sloss M.W., Zajac A.M. & Kemp R.L. (1999) *Parasitologia Clínica Veterinária*. São Paulo: Manole, 198 p.
- Speer C.A. & Dubey J.P. (1998) Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology***116**, 35-42.
- Stefanini M., De Martino C. & Zamboni L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature***216**, 173-174.
- Toumi F., Neulist M., Denis M.G., Oreshkova T., Laboisse C.L., Galmiche J.P. & Jarry A. (2004) Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 187-91.
- Vacas E., Bajo A.M., Schally A.V., Sánchez-Chapado M., Prieto J.C. & Carmena M.J. (2012). Antioxidant activity of vasoactive intestinal peptide in HK2 human renal cells. *Peptides***38**, 275-81.
- Vivas L.A.M., Jamel N., Refinetti R.A., Silva L.F., Rodrigues L.V., Silva P.C. & Schanaider A. (2007) Anesthetic experimental device for small animal. *Acta Cir. Bras.***22**, 229-33.
- Weber E., Neulist M., Schemann M. & Frieling T. (2001) Neural components of distension-evoked secretory responses in the *Guinea-Pig* distal colon. *J. Physiol.* **536**, 741-51.
- Weiss L.M. & Kim K. (Orgs) (2007) *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. Perspectives and methods. Alterations in host-cell biology due to Toxoplasma gondii*. First edition, London: Elsevier, 752 p.
- Yunus M., Horii Y., Makimura S. & Smith A.L. (2005) Murine goblet cell hypoplasia during *Eimeria pragensis* infection is ameliorated by clindamycin treatment. *J. Vet. Med. Sci.* **67**, 311-5.

CAPÍTULO 3

Toxoplasmose causa alterações na tela submucosa, túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno de ratos

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Acta Tropica* (anexo 3).

Toxoplasmose causa alterações na túnica mucosa, tela submucosa e no plexo submucoso do jejuno de ratos

Marcelo Biondaro Góis¹; Jacqueline Nelisis Zanoni¹; Aristeu Vieira da Silva²; Marcílio Hubner de Miranda Neto¹; Eduardo José de Almeida Araújo³; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana¹

Universidade Estadual de Maringá¹; Universidade Estadual de Feira de Santana² e Universidade Estadual de Londrina³, Brasil.

Resumo

Evidências indicam que doenças inflamatórias do intestino são caracterizadas por alterações que afetam a mucosa intestinal e também outros componentes teciduais e celulares tais como neurônios e EGCs. Diante da carência de estudos, objetivou-se investigar os efeitos da infecção toxoplásmica sobre a tela submucosa, túnica mucosa e o plexo submucoso do jejuno de ratos. Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus*, distribuídos em grupo controle (GC) que receberam solução salina via oral e grupo infectado (GI) inoculados com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* via oral. Trinta e seis dias após, foram submetidos ao procedimento anestésico, seguido pela eutanásia. Amostras do jejuno foram fixadas e submetidas ao processamento histológico para avaliação da tela submucosa e túnica mucosa, técnicas de Giemsa, histoquímica para enzima NADH-diaforase e imunohistoquímica para proteína pan glial S-100β. O protocolo experimental foi eficaz na indução à infecção nos ratos do GI. Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em exame sorológico e cistos teciduais foram isolados com bioprova. Observamos aumento de 7,9% da espessura da tela submucosa. Redução de 12,3% na espessura da túnica mucosa; 7,10% na altura dos vilos e 17,37% na profundidade das criptas. O número de neurônios evidenciados pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase positivos sofreu redução de 15,38 e 40,71%, aumento na área do corpo celular de 5,57 e 23,60%, respectivamente. Houve redução de 19% no número de EGCs. Conclui-se que a infecção toxoplásmica causou alterações significativas na tela submucosa, túnica mucosa e no plexo submucoso do jejuno de ratos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, sistema nervoso entérico, células da glia entérica, bioprova.

Autor para correspondência:

Marcelo Biondaro Góis
Departamento de Ciências Morfológicas
Universidade Estadual de Maringá, Brasil.
Tel.: +55 (44) 3011 4963
Fax: +55 (44) 3011 5988
E-mail: marcelobiondaro@gmail.com

1 Introdução

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) causador da toxoplasmose, está entre os parasitos de maior sucesso evolutivo, com 10-50% da população humana infectada. A infecção ocorre pela ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida ou ingestão de oocistos na água ou alimentos (Tenter et al., 2000; Carruthers, 2002; Dubey, 2010; Flegr et al., 2014). A partir do lúmen, invadem a mucosa intestinal, se multiplicam, invadem novas células e disseminam-se via sangue e linfa (Barragan e Sibley 2003; Courret et al., 2006; Sibley, 2010, Sibley, 2011).

O parasito forma cistos teciduais, nos quais se reproduzem lentamente em diversos órgãos do hospedeiro como cérebro, músculos e intestino, o qual induz à inflamação local e pode resultar em lesões teciduais (Liesenfeld, 2002; Flegr, 2013). Estas, no intestino, assemelham-se àquelas lesões observadas na doença inflamatória intestinal (DII) humana, mediadas por disfunção do sistema imune e associadas a alterações funcionais e histopatológicas (Barragan e Sibley, 2003; Dubey 2010; Flegr, 2013). As alterações afetam as células epiteliais, imunológicas e outras como as células da glia entérica (EGCs) comprometendo também o funcionamento do sistema nervoso entérico (SNE) (Cho e Brant, 2011; Egan et al., 2012). A unidade formada por neurônios e EGCs submucosos e células epiteliais, unidade glial-neuronal-epitelial (Neunlist et al., 2013) coordenam os eventos imunes da mucosa. Especialmente as EGCs tem papel central na regulação da resposta imune (Rühl 2005; Neunlist et al., 2007), da permeabilidade intestinal (Kurashima et al., 2013; Yu e Li, 2014) e na sobrevivência de neurônios (De Giorgio et al., 2012).

Apesar desta importante relação da unidade glial-neuronal-epitelial com a resposta do hospedeiro à infecção pelo *T. gondii*, nosso grupo de pesquisa é o primeiro a estudá-la. Previamente demonstramos alterações na morfologia da parede intestinal e em neurônios entéricos correlacionadas entre si e dependentes do estágio parasitário (Sugauara et al., 2009), duração da infecção (Pereira et al., 2010;) e espécie de hospedeiro (Odorizzi et al., 2010). Todavia este é o primeiro estudo a incluir o componente glial, população total e metabolicamente mais ativa de neurônios submucosos no estudo da reação tecidual do intestino delgado na infecção toxoplásmica. Fundamenta-se por meio de estudos parasitológicos e histopatológicos que o rato é um modelo experimental para estudo das complicações inflamatórias intestinais que acompanha a infecção crônica pelo *T. gondii* em imunocompetentes.

Deste modo, este trabalho objetivou investigar os efeitos da infecção induzida por oocistos de *T. gondii* (cepa ME-49, genótipo II) sobre a túnica mucosa, tela submucosa e o plexo submucoso do jejuno de ratos.

2 Material e métodos

O protocolo experimental deste estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense (Protocolo nº 12361/2008) (Anexo 1).

2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus* Wistar machos, com 60 dias de idade e massa corporal de $258,58 \pm 13,64$ g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=10): grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) experimentalmente com oocistos do *Toxoplasma gondii*, da cepa ME-49 (genótipo II). Os ratos do GC receberam por via oral, um mL de solução salina estéril. Os ratos de GI receberam pela mesma via 500 oocistos esporulados do *T. gondii* ressuspendidos em um mL de solução salina estéril. Ambos os grupos foram mantidos por 36 dias em uma sala com temperatura e luminosidade controladas, recebendo ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

Para obtermos os oocistos, três gatos (*Felis catus*) foram inoculados por via oral com cistos teciduais de *T. gondii* cepa ME-49 (genótipo II) isolados de camundongos (*Mus musculus*) infectados. Fezes dos gatos foram coletadas durante os sete primeiros dias após inoculação. Os oocistos foram concentrados utilizando o método de Sheather e esporulados em solução de ácido sulfúrico a 2% (Sloss et al., 1999).

2.2 Detecção de anticorpos séricos

Amostras de sangue de todos os ratos foram coletadas no início e a cada semana até o final do experimento. O soro obtido, foi diluído na proporção de 1:10 em solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7,2 e submetido ao método de aglutinação direta (MAD) como recomendado por Desmonts e Remington (1980). Uma suspensão de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* (genótipo I) fixados em formalina a 6% foi usada como antígeno (da Silva et al., 2002) para detectar a presença de anticorpos IgG (imunoglobulina G) séricos anti-*T. gondii*.

Para execução do MAD, 25 microlitros (μL) de cada diluição dos soros foram transferidos para microplaca com fundo em V, adicionando-se 25 μL de 2-mercaptoetanol 0,1M e 50 μL de antígeno por cavidade da microplaca. Soros controle positivo e negativo foram adicionados. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 36 horas. Após, procedeu-se a leitura, sendo consideradas positivas aquelas diluições dos soros em que se formava uma película que cobria pelo menos 50% da cavidade, e negativas quando se formava botão ou anel no fundo da cavidade (da Silva et al., 2002).

2.3 Eutanásia e coleta de amostras

Trinta e seis dias após a infecção (DAI), todos os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano (Vivas et al., 2007). Imediatamente realizou-se necropsia, o jejuno foi removido, tendo como referência anatômica a flexura duodeno-jejunal (oral) e a prega íleocecal (aboral). Em seguida o jejuno foi mensurado, lavado, fragmentado em quatro porções com aproximadamente cinco centímetros (cm) de comprimento cada e destinado de acordo com as técnicas a serem realizadas. Nos ratos do GI, o restante do intestino delgado, intestino grosso, encéfalo, fígado, coração, pulmões e parte da musculatura estriada esquelética, foram macerados e distribuídos em três padrões de amostras e destinados à realização de bioprova em camundongos.

2.4 Bioprova em camundongos

A bioprova foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dubey (1998). A partir dos órgãos dos ratos do GI, foram produzidos três padrões amostrais: 1 –macerado de encéfalo; 2 - pool do restante de intestino delgado e grosso; 3 - pool de fígado, coração, pulmões e parte da musculatura estriada esquelética. As amostras foram submetidas à digestão por pepsina, homogeneizada, filtrada e inoculado 1 mL via subcutânea em cinco camundongos para cada amostra, perfazendo um subtotal de quinze camundongos por rato infectado. No total, 150 camundongos Swiss Webster machos, com 45 dias de idade e massa corporal entre 39 - 48 gramas (g) foram utilizados. Os camundongos foram mantidos por 60 dias em gaiolas para roedores, distribuídos em grupos de acordo com os padrões amostrais que receberam, alocadas em uma sala com temperatura e luminosidade controladas, recebendo ração comercial para roedores e água *ad libitum*. Foram observados diariamente. Os camundongos que sobreviveram até o final do experimento, foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico por vapor de halotano, o sangue e o encéfalo de todos os

camundongos foram coletados. A investigação de cistos teciduais no encéfalo de camundongos foi realizada apenas naqueles onde a presença de anticorpos séricos anti-*T. gondii* foi confirmada pelo MAD. Nos positivos, o encéfalo foi macerado com auxílio de gral e pistilo em 1000 µL de SSTF pH 7,2. Uma alíquota de 25 µL em lâmina e lamínula foi analisada ao microscópio por meio da lente objetiva de 40X.

2.5 Processamento histológico

Um anel de três cm do jejuno de cada rato foi fixado em solução de Bouin por seis horas. Após, desidratado em série ascendente de álcool etílico (60°, 70°, 80°, 90° e 99,2°) diafanizado em xilol e incluído em parafina. Cortes transversais semi-seriados de quatro micrômetros (µm) de espessura, foram corados em Hematoxilina e eosina (HE). A análise morfométrica de estratos da parede jejunal foi realizada por meio de um software de análise de imagem (Motic Image plus 2.0) a partir de imagens capturadas por intermédio de uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) acoplada a um microscópio de luz trinocular (MOTIC B5). Imagens capturadas com a objetiva de 100X foram utilizadas para medir a altura e largura dos enterócitos, sendo uma medida para altura e três para a largura (ápice, meio e base). Com a objetiva de 40X mediu-se a espessura da tela submucosa. Na objetiva de 20X mensurou-se a espessura da túnica mucosa (medida da muscular da mucosa até a base das vilosidades) e a profundidade de cripta. Com a objetiva de 10X mediu-se a altura e largura do vilão. Foram realizadas 80 medidas de cada estrutura, distribuídas uniformemente em toda a circunferência intestinal de cada rato, sendo 16 em cada corte histológico e quatro em cada quadrante da circunferência intestinal.

2.6 Técnicas de Giemsa e NADH-diaforase

Um fragmento de cinco cm do jejuno de cada rato foi lavado com solução salina a 0,9% pH 7,2 e preenchidos e imersos com solução fixadora de formol acético por 48 horas. Após, o jejuno foi aberto pela borda mesentérica e dissecado com auxílio de estereomicroscópio com transiluminação, retirando a túnica muscular (longitudinal e circular) e a túnica mucosa mantendo-se apenas a tela submucosa. Os preparados totais da tela submucosa foram corados com solução corante de Giemsa em tampão fosfato de Sorensen segundo Barbosa (1978).

Outro fragmento de cinco cm do jejuno de cada rato foi submetido à técnica histoquímica para evidenciação da enzima NADH-diaforase (NADH-d). O jejuno foi lavado com solução de Krebs, imersos por cinco minutos em Triton X-100 a 0,3% em solução de Krebs, lavado duas vezes por 10 minutos cada com solução de Krebs e imerso por 45 minutos em meio contendo em cada 100 mL: 0,05g de β -NADH e 25 mL de solução de estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 25 mL de SSTF 0,1M, pH 7,3 e 50 mL de água destilada. A reação foi interrompida com fixação do jejuno em solução de formol tamponado 10% (Gabella, 1969). Após, o jejuno foi aberto pela borda mesentérica e dissecado com auxílio de estereomicroscópio com transiluminação, retirando a túnica muscular (longitudinal e circular) e a túnica mucosa mantendo-se apenas a tela submucosa.

2.7 Técnica imunohistoquímica para EGCs

Outro fragmento de cinco cm do jejuno de cada rato foi lavado com SSTF 0,1M pH 7,4 e preenchido com fixador de Zamboni (Stefanini et al., 1967) armazenado imerso no fixador por 18 horas a 4°C. Após a fixação, o segmento foi aberto pela borda mesentérica, lavado em álcool etílico 80° para remoção do fixador. Em seguida os fragmentos foram desidratados em álcool etílico com concentrações ascendentes (95° até 99,2°) diafanizado em xilol e reidratado em série descendente de álcool etílico (99,2°, 90°, 80° e 50°) e estocado em tampão fosfato 0,1M acrescido de azida sódica 0,04% a 4°C. Após microdissecação, os preparados totais da tela submucosa foram lavados com tampão fosfato 0,1M e Triton 0,3% por cinco minutos, e incubados em solução de bloqueio contendo soro de cabra dois % por duas horas. Em seguida, os preparados totais foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-S-100 β (proteína pan-glial S-100 β) (Ferriet al., 1982; Bishop et al., 1985) extraídos de coelho e diluído na proporção de 1:200 (Península Labs, Sigma, St. Louis, MO, USA). Os preparados totais permaneceram sob agitação em temperatura ambiente por 48 horas. Após, foram lavados três vezes com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por cinco minutos, incubados em solução contendo o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fluoresceína diluído na mesma proporção, mantido sob agitação em temperatura ambiente protegidos da luz por duas horas. Em seguida, foram lavados três vezes em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por cinco minutos cada e montados em lâminas e lamínula com anti-Fade e armazenados em refrigerador.

2.8 Análise quantitativa dos neurônios do plexo submucoso

Com auxílio de um microscópio de luz trinocular, na lente objetiva de 40X, foi contado o número de gânglios e o número de neurônios contidos nestes gânglios presentes em 50 campos microscópicos (7.01mm²) nos preparados totais do plexo submucoso do jejuno de todos os ratos de ambos os grupos. Na contagem de gânglios nos preparados totais corados pela técnica de Giemsa foram considerados aqueles que tinham três ou mais neurônios. Já para os marcados pela técnica da NADH-d foram considerados gânglios com dois ou mais neurônios.

2.9 Análise quantitativa das EGCs do plexo submucoso

Foram contadas todas as EGCsS-100βIR presentes em 20 campos microscópicos (1,522 mm²) capturadas por câmera de alta resolução (AxioCam[®] Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada a microscópio fotônico (Axioskop Plus Zeiss[®]) com filtros para imunofluorescência (FITC) ampliadas de 200X. O resultado desta contagem para cada animal foi projetado para um mm². As imagens foram transferidas para microcomputador e analisadas com o software Image-Pro Plus.

2.10 Análise morfológica dos neurônios do plexo submucoso

A análise morfológica realizada a partir de imagens capturadas por meio de uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) acoplada a um microscópio de luz trinocular (MOTIC B5). A área do corpo celular e do núcleo dos neurônios do plexo submucoso do jejuno de ratos foi mensurada por intermédio de um sistema de análise de imagem Motic Image Plus, versão 2.0. A área do citoplasma foi calculada a partir da diferença entre a área do corpo celular e do núcleo.

2.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste D'Agostino-Pearson ou de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição. Dados com distribuição normal são apresentados como média ± desvio padrão. Neste caso, para comparar os grupos, utilizou-se Análise de Variância para Experimento Inteiramente Aleatorizado (ANOVA-EIA), seguida pelo teste de t de Student, considerando $\alpha=0,05$. Dados com distribuição livre são apresentados como mediana; percentis (P25;P75), e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de kruskal-Wallis, e pós

teste Dunn. Para executar as análises, foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

3 Resultados

O protocolo experimental utilizando 500 oocistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (genótipo II) foi eficaz na indução da infecção toxoplásmica nos ratos do GI. Anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii* foram detectados por meio do exame sorológico a partir do sétimo DAI (Figura 1). Enquanto os ratos do GC permaneceram susceptíveis.

O resultado da bioprova confirma os achados sorológicos. Doze camundongos morreram antes do final da bioprova. Cinquenta e seis camundongos soroconverteram a partir da inoculação de amostras provenientes de ratos do GI. Dos quais, em 21 foi possível isolar cistos teciduais no encéfalo aos 60 DAI (Figura 2 e Tabela 1).

Observamos aumento de 7,9% da espessura da tela submucosa do jejuno de ratos. Por outro lado, observamos redução 12,3% na espessura da túnica mucosa, 7,10% na altura dos vilos e 17,37% na profundidade das criptas no jejuno dos ratos do GI. A largura do vilo e altura e largura dos enterócitos não sofreram alterações (Tabela 2).

A população neuronal total evidenciada pela técnica de Giemsa e a subpopulação metabolicamente mais ativa (NADH-d) sofreram redução de 15,38 e 40,71% respectivamente. O número de gânglios por mm² evidenciados pela técnica NADH-d reduziu 35,86% no jejuno dos ratos do GI. Esse mesmo parâmetro avaliado, não sofreu alterações naqueles evidenciados pela técnica de Giemsa. A proporção de neurônios por gânglio bem como a área do jejuno não sofreram alterações significativas. A projeção do número total de neurônios no órgão sofreu redução de 21,05 e 44,67% para as técnicas de Giemsa e NADH-d respectivamente. Já a projeção para o número total de gânglios reduziu (39,9%) apenas na subpopulação metabolicamente mais ativa (NADH-d) (tabela 3 e figura 3).

A análise morfométrica demonstrou aumento na área do corpo celular de 5,57% nos neurônios evidenciados pela técnica de Giemsa e 23,60% nos NADH-d no GI. No citoplasma o aumento foi de 8,13 e 30,65% respectivamente.

Houve aumento da área do núcleo (7,81%) apenas nos neurônios evidenciados pela técnica Giemsa. Na técnica NADH-d esta organela não sofreu alteração significativa. A razão

entre as áreas do núcleo e do corpo celular não foram alterada ao nível de significância adotado ($\alpha=0,05$) (Tabela 4).

Houve redução no número total de EGCs S-100 β IR presentes em 20 campos microscópicos ($611 \pm 6,03$ no GC para $495 \pm 13,45$ no GI) e por mm^2 ($401,97 \pm 3,97$ no GC para $325,66 \pm 8,85$ no GI) no plexo submucoso do jejuno dos ratos infectados experimentalmente com 500 oocistos da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii* por 36 dias Figura 3.

A distribuição do número de neurônios submucosos por classes de acordo com a área do corpo celular no jejuno de ratos do grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) experimentalmente com 500 oocistos da cepa ME-49 (genótipo II) de *Toxoplasma gondii* por 36 dias, evidenciados em preparados totais, pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase podem ser observados na Figura 4.

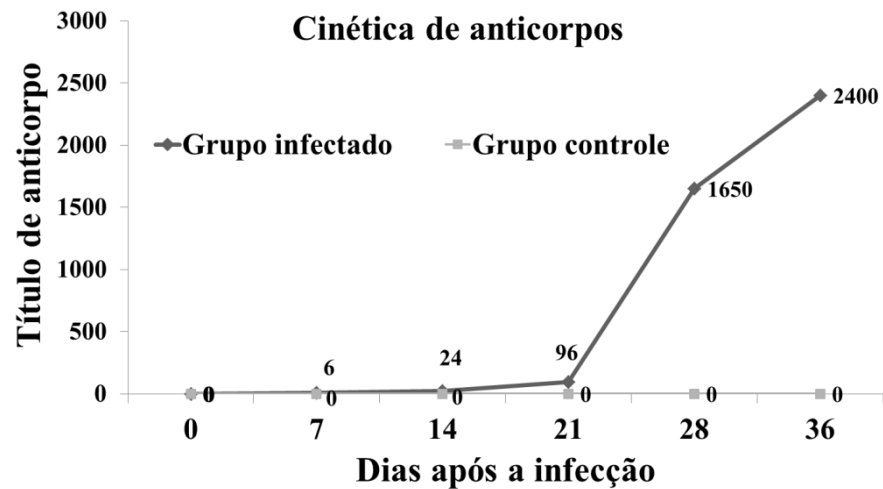


Fig.1. Mediana dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii* obtidos pelo método de aglutinação direta (MAD) utilizando o soro de ratos obtidos semanalmente do grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 (genótipo II).

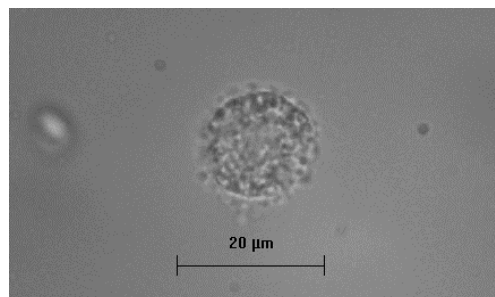


Fig. 2. Fotomicrografia de cisto tecidual encontrado no encéfalo de camundongo infectado via subcutânea com amostras de tecidos coletados nos intestinos dos ratos do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 (genótipo II). Ampliação de 400X.

Tabela 1

Sorologia e reisolamento de cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* no sangue e encéfalo, respectivamente, por meio de bioprova realizada em camundongos inoculados via subcutânea a partir de amostras de tecidos coletados dos ratos do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 (genótipo II).

Bioprova em camundongos machos Swiss Webster								
Padrões amostrais	NCI		NCM	NCE	MAD		NCCE	
	0 DAI	1 – 59 DAI	60 DAI	Nº	%	Nº	%	
Amostra 1	50	6	44	19	43,18	8	42,10	
Amostra 2	50	3	47	16	34,05	5	31,25	
Amostra 3	50	3	47	21	44,68	8	38,10	
Total	150	12	138	56	40,58	21	37,50	

Onde: **NCI** (número de camundongos inoculados), **NCM** (número de camundongos mortos), **NCE** (número de camundongos examinados), **MAD** (método de aglutinação direta), **NCCE** (número de camundongos com cistos no encéfalo) e **DAI** (dias após inoculação).

Tabela 2

Média \pm desvio padrão da espessura da túnica mucosa, tela submucosa, altura e largura dos vilos, profundidade de criptas e altura e largura dos enterócitos em cortes histológicos corados em Hematoxilina e eosina (HE) do jejuno de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

Parâmetros analisados (μm)	H&E	
	GC	GI
Espessura da túnica mucosa	425,55 ^a \pm 78,71	373,11 ^b \pm 91,73
Espessura da tela submucosa	32,83 ^a \pm 9,36	35,42 ^b \pm 13,48
Altura do vilos	391,48 ^a \pm 88,87	363,68 ^b \pm 93,96
Largura do vilos	139,53 ^a \pm 70,41	140,59 ^a \pm 30,64
Profundidade da cripta	307,88 ^a \pm 59,42	254,40 ^b \pm 72,75
Altura do enterócito	21,20 ^a \pm 5,93	21,60 ^a \pm 4,37
Largura do enterócito	5,26 ^a \pm 1,03	4,72 ^a \pm 0,92

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3

Média \pm desvio padrão do número de neurônios, e de gânglios por mm^2 , do número de neurônios por gânglios, da área do jejuno, e da projeção de neurônios e gânglios no plexo submucoso do jejuno de ratos do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 (genótipo II), evidenciados em preparados totais, pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase.

Parâmetros	Giemsa		NADH-diaforase		
	GC	GI	GC	GI	
Neurônios/ mm^2	243,93 ^a \pm 7,68	206,40 ^b \pm 46,39	139,09 ^a \pm 11,14	82,46 ^b \pm 19,17	
Gânglios/ mm^2	19,21 ^a \pm 0,98	18,11 ^a \pm 0,87	25,54 ^a \pm 3,03	16,38 ^b \pm 4,50	
Neurônios/ Gânglio	11,40 ^a \pm 0,22	10,10 ^a \pm 1,79	5,36 ^a \pm 0,63	4,15 ^a \pm 0,96	
Área do jejuno (mm^2)	924,41 ^a \pm 135,97	862,65 ^a \pm 53,95	924,41 ^a \pm 135,97	862,65 ^a \pm 53,95	
Projeção	Neurônios	225.488,91 ^a \pm 33.146,57	178.040,68 ^b \pm 11.118,45	128.574,73 ^a \pm 18.900,37	71.129,95 ^b \pm 4.442,72
	Gânglios	17.757,71 ^a \pm 2.610,43	15.621,62 ^a \pm 975,58	23.516,76 ^a \pm 3.456,95	14.129,34 ^b \pm 882,44

Médias seguidas por letras diferentes numa mesma linha, para a mesma técnica, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4

Média \pm desvio padrão das áreas (μm^2) do corpo celular, citoplasma e do núcleo. Razão do núcleo/corpo celular (%) de neurônios no plexo submucoso do jejuno de ratos do grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II), evidenciados em preparados totais, pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase.

Área(μm^2)	Giemsa		NADH-diaforase	
	GC	GI	GC	GI
Corpo celular	254,75 ^a \pm 27,63	268,94 ^b \pm 21,41	244,12 ^a \pm 26,11	301,74 ^b \pm 22,14
Citoplasma	138,55 ^a \pm 21,87	149,82 ^b \pm 15,18	189,32 ^a \pm 26,25	247,34 ^b \pm 23,65
Núcleo	110,45 ^a \pm 11,47	119,10 ^b \pm 7,76	54,71 ^a \pm 12,33	55,48 ^a \pm 3,36
Razão núcleo / corpo celular	0,44 ^a \pm 0,01	0,45 ^a \pm 0,02	0,22 ^a \pm 0,06	0,19 ^a \pm 0,02

Médias seguidas por letras diferentes numa mesma linha, para a mesma técnica, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

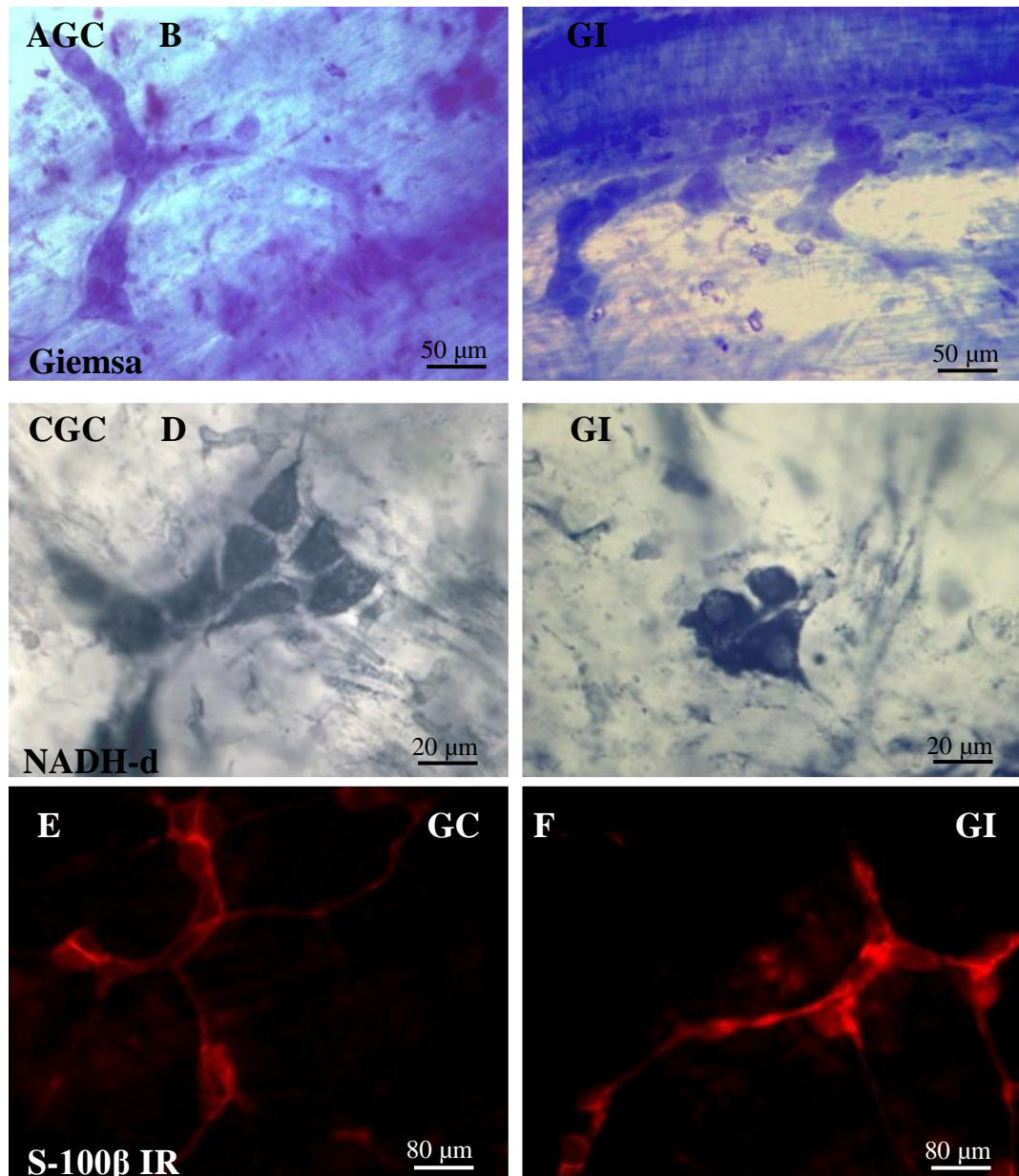


Fig. 3. Fotomicrografias da população neuronal total (A e B), subpopulação metabolicamente mais ativa (C e D) e de células da glia entérica (E e F) no plexo submucoso do jejuno de ratos do grupo controle (GC) e grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).

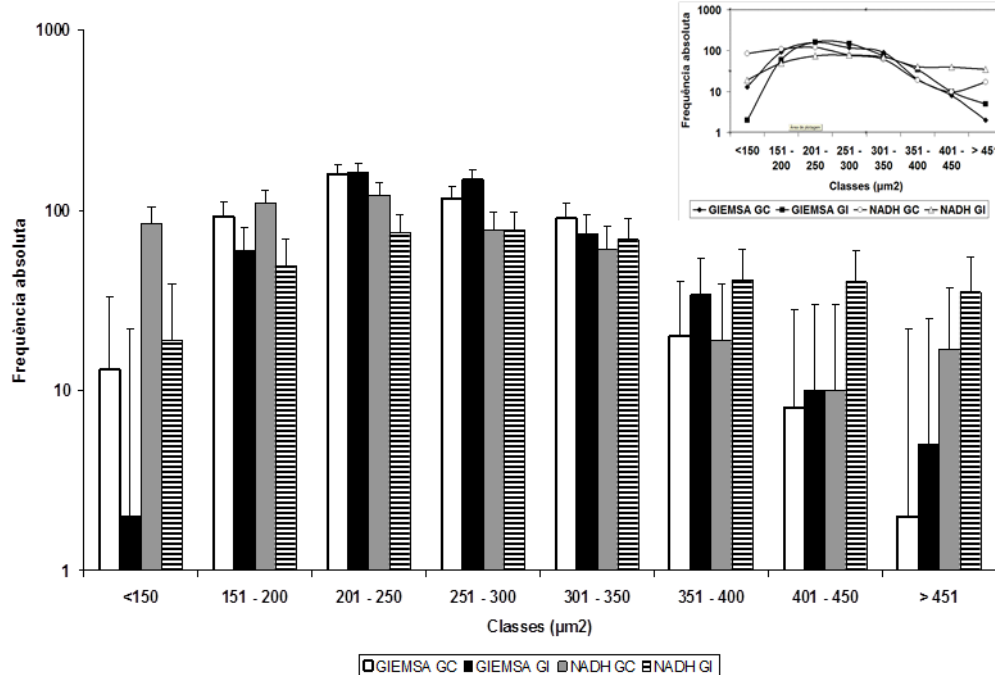


Fig. 4. Distribuição dos neurônios submucosos do jejunum de ratos evidenciados em preparados totais pelas técnicas de Giemsa e NADH-diaforase, em classes de acordo com a área do corpo celular do grupo controle (GC) e do grupo infectado (GI) com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II). Não houve diferença significativa entre as colunas de uma mesma classe e técnicas ($p > 0,05$).

4 Discussão

A presença de anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii* nos ratos do GI detectados pelo MAD a partir de sete DAI, e apresentando títulos crescentes até o final do experimento, demonstram que o protocolo de infecção com 500 oocistos da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii* utilizada neste estudo causou infecção toxoplásmica nos ratos do GI, enquanto os ratos do GC permaneceram susceptíveis. Sant'Ana et al., (2012), utilizando o mesmo protocolo, detectaram anticorpos séricos anti-*T. gondii* em todos os ratos infectados por meio do MAD. Anticorpos séricos detectáveis pelo MAD foram constatados em galinhas infectadas experimentalmente com *T. gondii* a partir do sétimo DAI (Dubey et al., 1993), sendo também verificados em frangos de corte aos 60 DAI (Galli et al., 2008; Shiraishi et al., 2009; Bonapaz et al., 2010; Braga et al., 2011).

Segundo Casartelli-Alves et al., (2014), o MAD foi o método mais eficaz no diagnóstico sorológico em galinhas infectadas pelo *T. gondii*. Da Silva et al., (2002), demonstraram que não há diferença entre o MAD e a reação de imunofluorescência indireta

(RIFI) para triagem e titulação de soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. Este método de diagnóstico é eficaz, e oferece praticidade e viabilidade para testar pequeno número de amostras, facilidade de leitura sem necessidade de instrumentos especiais, possibilidade de realização para qualquer espécie animal, uma vez não requer reagentes espécie-específicos diferentemente do que ocorre com a RIFI (Seefeldt et al., 1989).

A presença de cistos caracteriza a fase crônica da toxoplasmose (Frenkel, 1973; Sibley, 2010), condição pretendida neste experimento e que foi comprovada diretamente pela observação de cistos em macerado de encéfalo a fresco dos ratos infectados antes da realização da bioprova. Por outro lado, a observação direta de cistos a frescos nos demais órgãos é dificultada pela característica dos tecidos, por isto recorreremos à evidenciação indireta por meio da administração de *pool* de vários órgãos dos ratos infectados em camundongos. No caso específico dos intestinos a detecção de cistos é também dificultada em estudos histológicos devido a sua extensão. Dubey (2010) relata que são raros os estudos que reportam a presença de cistos teciduais no intestino. Por outro lado, o reisolamento de cistos no encéfalo de 31,25% dos camundongos que foram inoculados com *pool* de intestinos delgado e grosso de ratos do GI mortos após 36 dias de infecção comprovam a existência dos cistos nos intestinos. A bioprova também comprovou a presença dos cistos teciduais nos ratos infectados por meio do reisolamento dos cistos teciduais nos camundongos que foram inoculados com amostras preparadas a partir do macerado de encéfalo (42,10%) e *pool* de fígado, coração, pulmões e musculatura estriada esquelética (38,10%) dos ratos do GI. A soroconversão de 41% dos camundongos com detecção de anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii* reforça a presença da infecção crônica nos ratos do GI que foram a fonte do material infectante.

Garcia et al., (2006) isolaram cistos em 46% dos camundongos inoculados com amostra de encéfalo de suínos infectados experimentalmente com 10 mil oocistos da cepa VEG de *T. gondii*. Estes autores também reisolaram cistos em 64,6% dos camundongos que receberam amostras de músculos (coração, diafragma, m. masseter e língua) enquanto no presente experimento os cistos teciduais foram isolados em 38,10% dos camundongos que receberam *pool* de fígado, coração, pulmões e musculatura estriada esquelética. Galli et al., (2008) a partir de *pool* de cérebro e coração de frangos de corte infectados experimentalmente com 100 cistos teciduais da cepa ME-49 (genótipo II) e 1000 oocistos da cepa M7741 (genótipo III) de *T. gondii* reisolaram o parasito em 37 e 71% dos camundongos,

respectivamente. Mesmo em galinhas de vida livre, ou seja, que se infectaram com *T. gondii* de maneira natural foi possível reisolar o parasito a partir de *pool* de cérebro, coração e músculos preparados e administrados em camundongos, obtendo taxa de reisolamento de 54% (Casartelli-Alves et al., 2014). Estes achados colocam a bioprova como um dos melhores métodos para confirmar diagnósticos e isolar o *T. gondii* (Da Silva e Langoni 2001; Garcia et al., 2006; Casartelli-Alves et al., 2014).

A infecção pelo *T. gondii* nas condições experimentais do presente estudo provocou redução de 19% na densidade das EGCs do plexo submucoso após 36 dias de infecção. Esta redução pode relacionar-se a duas causas distintas, a primeira seria como consequência de seu envolvimento na resposta inflamatória local e a segunda pela ação direta do parasito, que tem preferência por células de maior metabolismo e que, no caso da tela submucosa, são as células da glia e os neurônios. Não encontramos trabalhos que tenham investigado as consequências da infecção por *T. gondii* com as EGCs, porém, encontramos referências sobre infecções causadas pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, como o *T. gondii* é especialista em adesão e invasão celular (Sibley e Andrews 2000; Blackman e Bannister 2001; Sibley, 2003). DaMatta et al., (2000), ao avaliar astrócitos em ratos infectados por *T. cruzi*, demonstraram uma preferência do parasito pelos astrócitos a neurônios. Cabe destacar que de acordo com Rühl, (2005) as EGCs são semelhantes aos astrócitos em seus aspectos morfológicos e funcionais, o que, a nosso ver, poderia levar o parasito a ter preferência pelas EGCs.

Em estudo realizado no colo de humanos com neuropatia chagásica Silveira et al., (2009) verificaram redução na densidade de EGCs. Os autores propõem que estas células estavam envolvidas na patogênese da neuropatia, atuando como mobilizadoras de macrófagos, que além de participarem dos mecanismos de defesa produzem óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs), que a princípio são utilizadas para destruir agentes patogênicos extra e intracelulares, porém, estas substâncias são citotóxicas e podem causar a morte de diversos tipos de células (Daryani et al., 2003), que neste experimento incluiriam as EGCs e os neurônios entéricos.

A população neuronal total e a subpopulação metabolicamente mais ativa sofreram redução de 15,38 e 40,71% respectivamente. Em suínos inoculados com oocistos da cepa M7741 (genótipo III) a subpopulação neuronal NADH-dp do plexo mientérico sofreu redução de cerca de 50% verificada após 30 dias de infecção. Apesar dos autores não terem reisolado

o parasito, a presença de DNA do *T. gondii* foi detectada por meio da PCR em amostras da túnica mucosa e tela submucosa do jejuno (Odorizzi et al., 2010). Em estudos anteriores realizados em ratos inoculados com oocistos da cepa M7741 (genótipo III), durante a fase aguda (Pereira et al., 2010) e crônica (Hermes-Uliana et al., 2011), demonstraram que o *T. gondii* foi capaz de provocar alterações plásticas nos neurônios entéricos, porém sem causar morte neuronal. Acreditamos que as diferentes respostas encontradas possam ser atribuídas à maior virulência da cepa utilizada neste estudo, pois segundo Freyre et al., (2001) em estudos realizados com camundongos, verificou-se que as cepas do genótipo II são de virulência intermediária enquanto as do genótipo III são de baixa virulência. Com a mesma as condições experimentais utilizada neste estudo, Sant'Ana et al., (2012) relataram a redução de 28% da subpopulação de neurônios submucosos que expressam o polipeptídeo intestinal vasoativo, acompanhado de atrofia da área dos corpos celulares.

A redução na subpopulação de neurônios NADH-dp pode ser atribuída a diversos fatores que se somaram dentre eles:

1 - a resposta do sistema imune frente ao parasito com produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células do sistema imune, em especial os macrófagos que ao liberarem NO e EROs para combater o parasito podem levar à morte de diferentes células, inclusive dos neurônios não nitrérgicos (Daryani et al., 2003). Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa envolvendo o jejuno de ratos infectados pela cepa M7741 (genótipo III) não houve redução dos neurônios nitrérgicos (Hermes-Uliana, et al., 2011). Além disto, os neurônios nitrérgicos utilizam o NO para se protegerem dos efeitos dos radicais livres (Cowen et al., 2000). Este achado reforça a hipótese de que a morte da maioria dos neurônios não está diretamente relacionada com invasão pelo parasito e sim aos efeitos colaterais da resposta imune ao *T. gondii*;

2 - a morte das EGCs uma vez constituem uma classe única de células gliais periféricas dentro do TGI. Sendo distribuídas nos gânglios do SNE formando os plexos mientérico e submucoso, estas células são também encontradas entre as fibras musculares da camada circular e na lâmina própria da túnica mucosa (Gulbransen e Sharkey, 2012). EGCs exercem papel central na regulação da resposta imune (Rühl 2005; Neunlist et al., 2007; Savidge et al., 2007), suporte neurotrófico e anti-apoptótico neuronal (Cabarrocas et al., 2003; Anitha et al., 2006; Cirillo et al., 2009; De Giorgio et al., 2012), na gliogênese, neurogênese e

neuromodulação (Joseph et al., 2011), na manutenção estrutural do epitélio intestinal (Neunlist et al., 2007), e na permeabilidade da barreira intestinal do TGI, devido a população extra ganglionar localizada logo abaixo das células epiteliais intestinais (subepiteliais) (Gulbransen e Sharkey 2012; Neunlist et al., 2013; Yu e Li 2014). DaMatta et al., (2000) em estudos do SNC de ratos infectados com *T. cruzi* verificaram a preferência do parasito pelos astrócitos e que, portanto, as alterações neuronais encontradas podem ser causadas pela perda de células da glia e pelo processo inflamatório desencadeado pelo parasito;

3 - redução do metabolismo para proteger-se do parasitismo especialmente em neurônios NADH-dp detentores de maior número de mitocôndrias (Gabella 1969). No GC os neurônios NADH-dp representam 57% da população total, enquanto no GI representam 33% demonstrando o predomínio da redução desta subpopulação neuronal. Considerando que o *T. gondii* utiliza as mitocôndrias das células hospedeiras para obter energia, hipotetizamos que parte dos neurônios NADH-dp reduziram a quantidade de mitocôndrias e conseqüentemente seu metabolismo energético como mecanismo de adaptação à presença do parasito, que invade preferencialmente células com maior número de mitocôndrias para promover seu desenvolvimento replicação e disseminação (Sinai e Joiner, 2001; Weiss e Kim 2007; Odorizzi et al., 2010). Neste caso, o desvio fenotípico evitaria a morte. Como estes neurônios são marcados em função da captação de ions H^+ liberados na cadeia respiratória e captados pelo nitroblue tetrazolium levando a formação de grânulos formazana no citoplasma. Acreditamos que estas células reduziram seu metabolismo e não produziram grânulos em quantidade suficiente para serem evidenciadas pela técnica da NADH-dp. Nesse raciocínio, possivelmente nem todos os neurônios NADH-dp que não foram marcados morreram, e sim deixaram de ser evidenciados porque reduziram seu metabolismo energético. Esta hipótese encontra suporte na comparação dos números absolutos que expressam a redução neuronal, pois enquanto a avaliação da população total indica que em média houve a morte de cerca de 37 neurônios por mm^2 , na subpopulação NADH-dp cerca de 56 neurônios por mm^2 deixaram de ser marcados. Isto nos permite concluir que muitos neurônios, cerca de 19 por mm^2 , que não foram marcados com a técnica NADH-d devido a redução em seu metabolismo, foram marcados com a técnica de Giemsa que cora os polirribossomos e demais organelas constituídas por proteínas ácidas, caso contrário a redução da população total seria maior;

4 – atuação direta do parasito sobre os neurônios: ao invadir as células, o *T. gondii* secreta proteínas capazes de conectar seu vacuolo parasitóforo à membrana externa da

mitocôndria, esta associação vacúolo parasitóforo-mitocôndria, resulta em proteção e maior disponibilidade de energia para manutenção e desenvolvimento do parasito (Mordue et al., 1999; Beckers et al., 1994; Mercier et al., 2002; Hajj et al., 2007). Além disso, ao invadir as células, este protozoário inibe o STAT1 e NF- κ B (Hunter e Sibley, 2012), que modulam a expressão de genes que regulam resposta imune e a apoptose enquanto o parasito se replica (Hwang et al., 2010; Dos Santos et al., 2011; Liu et al., 2013; Contreras-Ochoa et al., 2013). Neste raciocínio, o parasito assume o controle da maquinaria de síntese na célula hospedeira enquanto se replica, em seguida dissemina-se invadindo novas células e conseqüentemente provoca a destruição da primeira (Contreras-Ochoa et al., 2013). Em cultura de astrócitos, *T. gondii* assumiu o controle da maquinaria de síntese e modulou a apoptose durante 24 horas, tempo suficiente para replicar-se e disseminar-se (Carmen e Sinai 2011). Desta forma, no primeiro momento, a morte da célula é evitada pelo parasito, entretanto, após a replicação, o mesmo provoca a destruição da célula. Na infecção aguda, 24 horas, induzida por oocistos da cepa M7741 de *T. gondii*, não houve morte de neurônios NADH-dp no plexo mientérico do jejuno de ratos, porém, estes neurônios estavam hipertróficos (Pereira et al., 2010). Esta análise nos leva a especular se o parasito pudesse estar no interior destas células. Este achado apoia esta hipótese.

O aumento da área do núcleo (8%) nos neurônios do grupo GI evidenciados pela técnica de Giemsa é indicativo que parte da população neuronal intensificou a síntese proteica quer seja para fazer frente às agressões ocasionadas pela presença do parasito e/ou para incrementar sua atividade de maneira a compensar os neurônios perdidos no atendimento às demandas do tecido alvo. Por outro lado, o maior volume citoplasmático verificado com esta técnica (9%) não pode ser associado às mesmas células cujo núcleo estava mais volumoso, pois pode refletir a influência do aumento do volume citoplasmático dos neurônios NADH-dp, que também são evidenciados por Giemsa, e cujo citoplasma aumentou 31% enquanto o núcleo não apresentou aumento significativo (2%). Estas alterações não influenciaram a distribuição dos neurônios em intervalos de classes de acordo com as áreas dos corpos celulares, o que demonstra certa homogeneidade. Em ratos que permaneceram infectados por *T. gondii* por 90 dias também foi verificado aumento das áreas do núcleo e do citoplasma de neurônios evidenciados com a técnica de Giemsa (Hermes-Uliana et al., 2011). Em suínos infectados por *T. gondii* (M7741 genótipo III) por 30 dias os neurônios NADH-dp mantiveram íntegra a área do corpo celular apesar da redução significativa do volume do

núcleo. A redução da subpopulação neuronal NADH-dp em neurônios mientéricos do cólon de ratos associada ao aumento do volume do corpo celular foi também observada em ratos infectados pelo protozoário *T. cruzi* (Maifrino et al., 2005).

O expressivo aumento da área do citoplasma (31%) dos neurônios NADH-dp do grupo GI sem o correspondente aumento na área do núcleo (2%) descarta a existência de uma integração entre núcleo e citoplasma visando o aumento da síntese proteica. O maior volume citoplasmático pode possuir diferentes causas como o aumento da maquinaria citoplasmática, edema intracelular promovido diretamente pela presença do parasito no interior da célula ou como consequência dos processos inflamatórios por ele provocados, bem como processos de apoptose. A capacidade de modificar reguladores e mediadores da apoptose é uma habilidade do *T. gondii* e outros parasitos, como *T. cruzi* especialistas em mecanismos de adesão e invasão celular (Sibley e Andrews, 2000; Blackman e Bannister, 2001; Sibley, 2003). Por interferência com os processos de regulação da apoptose, algumas vezes, o parasito acaba provocando disfunções mitocondriais (Contreras-Ochoa et al., 2013). A lesão mitocondrial, ativa por meio de caspases a via intrínseca (mitocondrial) para apoptose que em um primeiro momento provoca aumento tamanho do corpo celular e do núcleo (Green e Kroemer, 2004). Neste raciocínio, é possível deduzir que parasitos que provocam disfunções mitocondriais causando ativação de caspases e com isto a apoptose, são eliminados sem se reproduzirem ou encistar-se. Por outro lado, aqueles que atuam de maneira a impedir a apoptose alcançam sucesso quer seja para multiplicar-se ou para encistar-se antes que a célula seja destruída.

Neste estudo, verificou-se aumento de 7,9% na espessura da tela submucosa atribuída a infecção toxoplásmica. O aumento na tela submucosa é indicativo que o parasito pode ter formado cistos neste estrato. Embora não tenham sido encontrados cistos nos cortes histológicos do jejuno dos ratos do GI, os camundongos inoculados com amostras provenientes do *pool* de intestino delgado e intestino grosso destes ratos passaram a produzir anticorpos séricos anti-*T. gondii*, portanto, havia cistos nos intestinos. Braga et al., (2011) em estudo com frangos inoculados com cistos teciduais da cepa ME-49 de *T. gondii* verificaram aumento de 127% na espessura da tela submucosa e encontraram um cistos em cortes histológicos deste estrato.

A perda de neurônios e de células da glia entérica no plexo submucoso se constitui em importante fator para explicar a redução na altura dos vilos e profundidade das criptas uma

vez que as EGCs e neurônios submucosos são reguladores da proliferação celular no epitélio intestinal. Neunlist et al., (2013) argumentam que a unidade glial-neuronal-epitelial tem a capacidade de coordenar os eventos imunes na túnica mucosa e interagir com a microbiota através de antígenos presente no lúmen. No jejuno de suínos inoculados com 5000 oocistos da cepa M7741 de *T. gondii* (genótipo III), os vilos aumentaram cerca de 10% na sua altura aos 30 dias de infecção (Silva et al., 2010). Frangos de corte inoculados com 1000 oocistos desta cepa sofreram redução de 30% na espessura da túnica mucosa do duodeno (Bonapaz et al., 2010) e 7,8% no íleo (Shiraishi et al., 2009).

A presença de cistos teciduais do parasito induz à inflamação local (Flegr, 2013) causando a produção de anticorpos e citocinas que recrutam células do sistema imune tais como, monócitos, células dendríticas, macrófagos entre outras, que mobilizam resposta celular contra o *T. gondii*. Monócitos e macrófagos secretam interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-12, NO e TNF- α . Já as células dendríticas ao reconhecerem este patógeno secretam IL-12. Estas respostas estimulam a produção de IFN- γ por células Natural Killer que intensificam o processo inflamatório gerado pela presença do parasito. Muitas vezes, a presença destas citocinas pró-inflamatórias, podem além de neutralizar o parasito (Liesenfeld, 2002; Buzoni-Gatel e Werts 2006; Egan et al., 2012; Hunter e Sibley, 2012; Cohen e Denkers, 2014) produzir danos ao tecido adjacente, pois muitas alterações no TGI atribuídas ao *T. gondii* são compatíveis com a doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, síndrome de Crohn e doença celíaca (Lidar et al., 2009; Rostami et al., 2011; Prandota, 2012; Flegr et al., 2014). Nestas doenças, a cronicidade da inflamação é modulada via resposta celular Th1, como naquela desencadeada pelo *T. gondii*. A estes achados, deve-se dar bastante atenção, pois a infecção toxoplásmica em ratos muito se assemelha a toxoplasmose humana (Liesenfeld, 2002) e o fato de ser considerada assintomática, pode ser um equívoco pela falta de atenção aos sintomas clínicos e à inflamação que se cronifica.

Em síntese, o expressivo percentual de camundongos que receberam macerado de intestinos que se tornaram soropositivos e dos quais se isolou cistos cerebrais, demonstrou de maneira clara que o parasito também possui afinidade pelos intestinos de ratos, bem como a capacidade infectante do macerado produzido a partir destes órgãos. A redução na população total de EGCs S-100 β IR no plexo submucoso em 19% demonstrou a capacidade do parasito de provocar danos a estas células, pois elas também possuem metabolismo elevado e, portanto, além de se envolverem nas respostas inflamatórias locais são alvos da invasão pelo

parasito. A infecção pelo *T. gondii* disparou mecanismos que promoveram o aumento do volume citoplasmático dos neurônios NADH-dp sem o correspondente aumento no núcleo e intensa redução nesta subpopulação de neurônios relacionada a diversos fatores que se somaram: redução do metabolismo com conseqüente redução da produção de grânulos de formazana, afinidade do parasito por células de maior metabolismo e morte de neurônios ocasionada por danos as EGCs essenciais para a sua sobrevivência. A redução da população de células da glia entérica e neurônios submucosos contribuíram para a redução na altura dos vilos e profundidade das criptas uma vez que neurônios e glia são reguladores da proliferação celular no epitélio intestinal.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá e a Universidade Paranaense pelo suporte técnico e financeiro, a coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor e a Fundação Araucária por financiar a compra de parte dos reagentes.

Contribuições dos autores

Todos os autores foram envolvidos na elaboração do desenho experimental, supervisão, análise e interpretação de dados e redação e aprovação final da versão apresentadas para publicação do manuscrito.

Conflito de interesse

Declaramos não existir conflito de interesse.

Referências

- Anitha, M., Chandrasekharan, B., Salgado, J.R., Grouzmann, E., Mwangi, S., Sitaraman, S.V., Srinivasan, S., 2006. Glial derived neurotrophic factors modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology*. 131, 1164-78.
- Ayres, M., Ayres, Jr. M., Ayres, D.L. Dos Santos, A.A.S., 2007. *BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá. Belém. MCT-CNPq.
- Barbosa, A.J.A., 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica*. 11, 95-97.

- Barragan, A., Sibley, L.D., 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology*. 11, 426-30.
- Beckers, C.J.M., Dubremetz, J. F., Puijalon, O.M., Joiner, K.A., 1994. The *Toxoplasma gondii* Rhoptyry Protein ROP 2 Is Inserted into the Parasitophorous Vacuole Membrane, Surrounding the Intracellular Parasite, and Is Exposed to the Cell Cytoplasm.. *The Journal of Cell Biology*, 127, 947-961.
- Bishop, A.E, Carlei, F., Lee, V. Trojanowski, J. Marangos, P.J, Dahl, D. Polak, J.M., 1985. Combined immunostaining of neurofilaments, neuron specific enolase, GFAP and S-100. A possible means for assessing the morphological and functional status of the enteric nervous system. *Histochemistry*. 82, 93–7
- Blackman, M.J., Banniste., L.H., 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and by subcellular fractionation. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 117, 11-25.
- Bonapaz, R.S, Hermes-Uliana C., Santos, F.N, Da Silva, A.V, Almeida, E.J, Sant`Ana, D.M.G., 2010. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30, 787-92.
- Braga, C.F, Silva, A.V, Sant`Ana, D.M.G., Araújo, E.J.A., 2011. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63, 340-7.
- Buzoni-Gatel, D., Werts, C., 2006. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends in Parasitology*. 22, 448-52.
- Cabarrocas, J.; Savidge, T. C.; Liblau, R.S., 2003. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia*. 41, 81-93.
- Carmen, J.C., Sinai, A.P., 2011. The differential effect of *Toxoplasma gondii* infection on the stability of BCL2-family members involves multiple activities. *Front. Microbiol*. 2, 1-13.
- Carruthers, V., B., 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. 81, 111–122.
- Casartelli-Alves, L., V.C., Boechat, R., Macedo-Couto, L.C., Ferreira, J.L., Nicolau, L.B., Neves, P.R., Millar, R.T., Vicente, R.V.C., Oliveira, A.G., Muniz, I.C.F., Bonna, M.R.R., Amendoeira, R.C., Silva, H., Langoni, T.M.P., Schubach, R.C., Menezes., 2014. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens, *Veterinary Parasitology*, 204, 346-351.
- Cho, J.H., Brant, S.R., 2011. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1704–12.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Cali, G., D'armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., Iuvone, T., Steardo, L., Cuomo, R., 2009. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil*. 21, 1209-112.

- Cohen, S.B., Denkers, E.Y., 2014. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. *Mucosal Immunology*. 7, 744-52.
- Contreras-Ochoa, C.O., Lagunas-Martínez, A., Belkind-Gerson, J., Díaz-Chávez, J., Correa, D., 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp. Parasitol.* 134, 256-65.
- Courret N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gâtel, D., Tardieux, I., 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 107, 309-316.
- Cowen, T., Johnson, R.J., Soubeyre, V., Santer, R.M., 2000. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut*. 47,(5). 653-660.
- Da Mata, J.R., Camargos, M.R., Chiari, E., Machado, C.R., 2000. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull.* 53, 153-162.
- Da Silva, A.V., Cutolo, A.A., Langoni, H, 2002. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. *Arq. Inst. Biol.* 69, 7-11.
- Da Silva, A.V., Langoni, H., 2001. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*. 97, 191-198.
- Da Silva, J.M., Da Silva, A.V., Araújo, E.J.A., Sant'Ana, D.M.G., 2010. The effects of the infection caused by *Toxoplasma gondii* on the cat duodenal wall. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 55-61.
- Daryani, A., Hosseini, A.Z., Dalimi, A, 2003. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol* 113, 123-134.
- De Giorgio, R., Giancola, F., Boschetti, E., Abdo, H., Lardeux, B., Neunlist, M., 2012. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 303, G887-G893.
- Desmots, G., Remington, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method of increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 11, 562-568.
- Dos Santos, T., A. T.; Portes, J. D., A.; Damasceno-Saj, C.; Caldas, L., A.; De Souza, W., 2011. Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host. *PLoS ONE*. 6, 27867.
- Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74, 75-77.

- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press.
- Dubey, J.P., Ruff, M. D., Camargo, M.E., Shen, S.K., Wilkins, G. L., Kwok, O.C.H., Thulliez, P., 1993. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1668–1672.
- Egan, C.E., Cohen, S.B., Denkers, E.Y., 2012. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunology Cell Biology*.90, 668-75.
- Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., Polak, J.M., 1982. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, 297,409–10.
- Flegr, J., 2013. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol.* 29, 156-163
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., Israili, Z.H., 2014. Toxoplasmosis – A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE* 9, 90203.
- Frenkel, J.K., 1973. *Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology*. In *The Coccidia*. University Park Press.343-410.
- Freyre, A., Correa, O., Falcón, J., Mendez, J., González, M., Venzal, J., M., 2001. Some factors influencing transmission of toxoplasma in pregnant rats fed cysts. *Parasitology Research.* 87, 941-944.
- Gabella, G., 1969. Detection of cells by histochemical technique. *Experientia Basel.* 25,(2). 218-219.
- Galli, S., Belinato, F.C., Lucas, T.M., Silva, R., C., Langoni, H., da Silva, A., V., 2008. Infecção experimental de frangos domésticos (*Gallus gallus*) com cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*. *Vet. Zootec.*15,542-550.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Machado, R.Z., Navarro, I.T., 2006. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113, 267–271.
- Green, D.R., Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.*305, 626.
- Gulbransen, B.D., Sharkey, K.A., 2012. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 9, 625-632.
- Hajj, H., E., L., Lebrun, M., Fourmaux, M., N., Vial, H., Drubremetz, J., F., 2007. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 Rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cellular Microbiology.* 9, 54-64.
- Hermes-Uliana, C., Pereira-Severi, L.S., Luerdes, R.B., Franco, C.L., da Silva, A.V., Araújo, E.J.A., Sant’Ana, D.M.G., 2011. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* causes myenteric neuroplasticity of the jejunum in rats. *Autonomic Neuroscience* 160, 3-8.

- Hunter, C., A., Sibley, L., D., 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*. 10, 766–778.
- Hwang, I.Y., Quan, J.H., Ahn, M.H., Ahmed, H.A., Cha, G.H., Shin, D.W., Lee, Y.H., 2010. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol. Res.* 107, 1313-21.
- Joseph, N., M., He, S., Quintana, E., Kim, Y.,-G., Núñez, G., Morrison, S., J., 2011. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *The Journal of Clinical Investigation*. 121, 3398–3411.
- Kurashima, Y., Goto, Y., and Kiyono, H., 2013. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur. J. Immunol.* 43, 3108–3115.
- Lidar, M, Langevitz, P, Barzilai, O, Ram, M, Porat-Katz, BS, *et al.* 2009. Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. *Ann N Y AcadSci.* 1173, 640–648.
- Liesenfeld, O., 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *The Journal of Infectious Diseases*. 185, 96-101.
- Liu, W., Yue, W., Wu, R., 2013. Overexpression of Bcl-2 promotes survival and differentiation of neuroepithelial stem cells after transplantation into rat aganglionic colon. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 7.
- Maifrino, L.B.M., Amaral, S.O.N., Watanabe. I, Liberti, E.A., De, Souza, R.R., 2005. *Trypanosoma cruzi*: preliminary investigation of NADHpositive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. *Exp Parasitol.* 111,224–229.
- Mercier, C., Dubremetz, J., F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L., D., Delauw, M., F., C., 2002. Biogenesis of Nanotubular Network in *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. *Molecular Biology of the Cell.* 13, 2397-2409.
- Mordue, D., G., Desai, N., Dustin, M., Sibley, L., D., 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring. *Journal Experimental Medicine.* 190, 1783-1792.
- Neunlist, M., Albert, P., Bonnaud, S., Landeghem, L., V., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F., Galmiche, J., P., 2007. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology.* 292, 231-241.
- Neunlist, M., Landeghem L.V., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des, Varannes, S.B., Rolli-Derkinderen, M., 2013. The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 10, 90-100.

- Odorizzi, L., Moreira, N.M., Gonçalves, G.F., Da Silva, A.V., Sant'Ana, D.M.G., Araújo, E.J.A., 2010. Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in Swines with toxoplasmosis. *Auton. Neurosci.* 155, 68-72.
- Pereira, L.S., da Silva, A.V.; Araújo, E.J.A.; Sant'Ana, D.M.G., 2010. Hypertrophy of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in rat jejunum after acute infection caused by *Toxoplasma gondii*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 16, 298-310.
- Prandota, J., 2012. Gastrointestinal tract abnormalities in autism, inflammatory bowel disease and many other clinical entities may be due to *Toxoplasma gondii* infection. *Open. Acc. Sci. Rep.* 1, 256.
- Rostami, Nejad, M, Rostami, K, Cheraghipour, K, Nazemalhosseini Mojarad E., 2011. Volta U. Celiac disease increases the risk of *Toxoplasma gondii* infection in a large cohort of pregnant women. *American Journal of Gastroenterology.* 106, 548-549.
- Rühl, A., 2011. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterology and Motility.* 17, 777-90.
- Sant'Ana, D.M.G., Góis M.B., Zanoni J.N., da Silva, A.V., da Silva, C.J.T., Araújo, E.J.A., 2012. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Experimental Pathology.* 93, 279-86.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., Sofroniew, M.V., 2007. Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione, *Gastroenterology.* 132, 1344-1358.
- Seefeldt, S.L., Kirbride, C.A., Dubey, J.P., 1989. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 124- 127.
- Shiraishi, CS, Azevedo, J.F., Silva, A.V, Sant'Ana, D.M.G., Araújo, E.J.A., 2009. Análise morfológica da parede intestinal de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. *Ciênc.Rural.* 39,2146-53.
- Sibley L.D., 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological Reviews.* 240,72-91. [PubMed: 21349087].
- Sibley, L., Andrews, N.W., 2000. Cell invasion by Un-Palatable Parasites. *Traffic.* 1, 100-106.
- Sibley, L.D., 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic.* 4, 581-6.
- Sibley; L.D., 2010. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr. Opin Biotechnol.* 21,592-598.
- Silva, P.C., Shiraishi, CS, Silva, A.V., Gonçalves, G.F., Sant'Ana, D.M.G., Araújo, E.J.A., 2010. *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental Parasitology.* 125, 380-3.

- Silveira, A., B., M., Freitas, M., A., R., Oliveira, E., C., Neto, S., G., Luquetti, A., O., Furness, J., B., Correa-Oliveira, R., Reis, D., A., 2009. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Human Pathology*.40, 244-251.
- Sinai, A., P., Joiner, K., A., 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of Cell Biology*. 154, 95-108.
- Sloss, M.W., Zajac, A.M., Kemp, R.L., 1999. *Parasitologia Clínica Veterinária*. São Paulo. Manole, 5-198.
- Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L., 1969. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*.216, 173-174.
- Sugauara, E.Y.Y., Sant'Ana, D.M.G., da Silva, A.V., Souza, E.A., Araújo, E.J.A., 2009. Hypertrophy of the neurons in the ileum from rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (Genotype II). *Acta.Scie. Biol. Scie*. 31, 195-201.
- Tenter, A.M., Heuckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000.*Toxoplasma gondii*: from animal to humans. *International Journal of Parasitology*. 30, 1217-58.
- Vivas, L.A.M., Jamel, N., Refinetti, R.A., Silva, L.F., Rodrigues, L.V., Silva, P.C., Schanaider, A., 2007. Anesthetic experimental device for small animal.*Acta Cir. Bras*.22, 229-33.
- VYAS, A., KIM, S.K., SAPOLSKY, R.M., 2007. The effects of *Toxoplasma* infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience* 148, 342–348.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2009. (Orgs) *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. Perspectives and methods.Alterations in host-cell biology due to *Toxoplasma gondii*. First edition, London: Elsevier, 752.
- Yu, Y.B., Li, Y.Q., 2014. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier.*World Journal of Gastroenterology*. 20, 11273–11280.

ANEXO 1

Guidelines for Author - International Journal of Experimental Pathology

International Journal of Experimental Pathology is published as an online-only journal from 2014

Ethics

The International Journal of Experimental Pathology (IJEP) encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). More information on various issues relating to Publication Ethics are dealt with in the relevant sections below and are outlined in full in the separate document Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology. Submitted work must comply with these policies, which are based on the Best Practice Guidelines on Publication Ethics: a Publisher's Perspective (Graf C, Wager, E, Bowman A et al. Int J Clin Pract 2007;61[s152]:1-26) and the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct. IJEP is a member of the Committee on Publication Ethics. Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors (defined below) have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with Ethical Policies of the Journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Animal and Human Studies

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate body. Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the Declaration of Helsinki, and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution

that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors should supply this information, to the Journal's Editorial Assistant, Biljana Nikolic at b.nikolic@ucl.ac.uk.

All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript and attribute the funding to appropriate authors.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DK xxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafting the paper or revising it critically, and
- Approval of the submitted and final versions

Submission

All submitted articles are subject to review by experienced referees. The Editors then select and accept manuscripts suitable for publication - the Editors' decisions are final. Manuscripts accepted for publication are copyedited and typeset. The proofs are finally sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

Online submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

To submit you will require a user ID and password, which can be obtained on first use of the submission web site. Full instructions are provided when you enter the website. All file types are supported, but to help Editors and reviewers view the submission the following types are recommended:

Text: Microsoft Word or generic rich text format (RTF).

Figures: TIFF is preferred. JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel are also acceptable.

*Update (25 May 2012): Please note that we now accept .doc and .docx files.

It is strongly recommended that, where possible, you combine all parts of your submission into a single document. Alternatively you may submit the text of the manuscript (including front page, summary, body of text, references and legends to tables and figures) as one document, with tables and figures as a separate file.

Full help and support for on-line submissions are provided by e-mail (support@scholarone.com), or via the website (<http://blackwellsupport.custhelp.com>) or telephone (+ 1 434-817-2040 ext. 167).

Hardcopy submission

If online submission is not possible, authors should send original papers to the editor at the address below.

The Editor, Professor D.R. Katz

International Journal of Experimental Pathology; Division of Infection and Immunity

University College London Cruciform Building; Gower Street London WC1E 6BT,
UK Email: b.nikolic@ucl.ac.uk

Tel: 020 3108 2122 Fax: 020 3108 2123

Conditions of acceptance

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. All submitted articles will be scrutinised for possible overlap and duplication with already published work. Papers may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of the journal. If a paper that has been returned to authors for

revision is not received back in the editorial office after 90 days, it will be treated as a new submission. The Editors reserve the right to make the final decision whether or not a paper is accepted.

The author who submits a paper for publication is responsible that all other authors agree to its submission. All manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by all authors. Persons named in the acknowledgements, and those responsible for any personal communications, must have agreed formally to their names so appearing.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial –No Derivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. See the Online Open section below for more information.

If you select the Online Open option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

Online Open is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With Online Open, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. All Online Open articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Manuscripts

Manuscripts must be saved for submission in double spaced format. If submitted as hardcopy they should be printed on one side of the paper only.

The date of submission used will be the date of submission of the electronic text version, or on receipt of the hard copy text plus illustrations, as applicable. Authors are advised to keep a copy of all manuscripts, as no responsibility can be accepted for loss.

The text should follow the following format:

Front page:

A single 'front page' must give: (1) the title of the manuscript; (2) a short running title (not exceeding 40 characters); (3) the name(s) of the author(s) including forename and

surname; (4) the department(s) in which the work was done; and (5) the name, full postal address, fax number and e-mail address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent, to be headed 'Correspondence'. The Corresponding Author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be published. During online submission corresponding authors can nominate an individual, who may or may not be an author, to assist them with administration of the publication process.

You should confirm that all listed authors meet ICMJE authorship criteria and that nobody who qualifies for authorship has been excluded. Credit for authorship should be based on: [1] substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; [2] drafting the paper or revising it critically; [3] approval of the submitted and final versions. Authors should meet all three criteria.

Second page:

The second page should contain a summary paragraph which should give a factual account of the context in which the study has been performed, the objective(s), methods and results, and a brief conclusion, in not more than 250 words. For refereeing and indexing purposes, up to six 'keywords' related to subjects discussed in the paper should be identified and included at the foot of the summary.

Text

Reports of original work should usually be arranged in the conventional order of introduction, methods, results, discussion, acknowledgements and references, with suitable headings for each part. Further sub-divisions, with appropriately less significant headings, can be used. Results may be presented in the text, in tables and figures, but the text should, in general, comment on rather than repeat information in tables.

General

Papers must be written in clear, concise English. Spelling should follow The Concise Oxford Dictionary of Current English. Avoid jargon and neologisms. The journal is unable to undertake major corrections of language, which is the responsibility of the author. Where English is not the first language of the authors, the paper should be checked by a native English speaker. Authors may suggest the names of suitable referees in a covering letter, or via the website, if they so wish.

Tables and Figures

For online submission, illustrations should be embedded in the Word document or uploaded as separate files. Quality should be sufficient for viewing on-screen and desktop printing.

Where possible, please provide high quality digital artwork files.

Both tables and figures should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each should have a separate descriptive legend. Keys should be given in the legends, not in the figure itself. All illustrations, both drawings and photographs, must be of good quality since delay will result if referees need to see improved versions. Digital versions of figures should be supplied in TIFF format. As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, is as follows:

Line art and diagrams - Minimum 600 dpi

Halftone (both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi

Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi

It is best to use Illustrator or Photoshop software and to save the material in the format '.eps' or '.tif'. If you are unable to provide these formats, please save the figures in as many different file formats as possible. In addition to any electronic files, always send three high-quality printed versions of the figures to the editorial office. For further information on file formats, please see the instructions on our website at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Colour Illustrations

As the journal is published online-only, colour figures are published online for free.

Measurements

Measurements should be expressed in SI units. If the original observations were recorded in other units, this should be stated, together with the appropriate conversion factors.

Standard Abbreviations

Standard abbreviations should be used and should follow those laid down in Units, Symbols and Abbreviations (1994) published by the Royal Society of Medicine. Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated

frequently throughout the manuscript. Words must appear in full on first appearance in both summary and text, followed by the abbreviation in parentheses. Drugs should be described by their official names but trade names should be indicated in parentheses the first time the drug is quoted in the text.

References

We recommend the use of a tool such as Reference Mmanager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

References must be double spaced and should be made only to papers closely related to the author's work. Exhaustive lists should be avoided. In the text, use the name of the author(s) followed by the date of publication; where there are two authors use the form: Sorensen and Read 2002; where there are more than two authors use the form: Turton et al. 2002.

Arrange the list of authors quoted at the end of the text in alphabetical order set out as follows:

A) Name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), title of the article, name of the journal, volume number, first and last page numbers. Abbreviate journal names according to the Index Medicussystem. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1997;336: 309-315.)

B) In the case of books the order is: name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), chapter title, full book title, edition, names of the editors, place and name of publisher, and page numbers.

C) References to 'personal communications' and 'unpublished work' may be quoted in the text with all names and initials to avoid confusion but should not be included in the references.

Examples of the style to be used are given below:

Turton J.A., Andrews C.M., Havard A.C. & Williams T.C. (2002) Studies on the haemotoxicity of chroramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. Int. J. Exp. Path. 83, 225-238.

Katz D.R., &Pollara G. (2003) Surviving the immune response: an immunologist's perspective. In Dormancy and Low Growth States in Microbial Diseases. Ed A. Coates. Cambridge University Press pp 75-100.

Permissions

Materials copied from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the International Journal of Experimental Pathology for reproduction. Authors are responsible for obtaining permission in writing from at least one author of papers cited while still in press, as well as of unpublished data and of personal communications. It is the author's responsibility to ensure that permissions are obtained.

Author Material Archive Policy

Unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

WEBQUALIS

<http://qualis.capes.gov.br/webqualis/publico/pesquisaPublicaClassificacao.seam>

Consulta por Título

ISSN	TÍTULO	ESTRATO	ÁREA DE AVALIAÇÃO	STATUS
1365-2613	International Journal of Experimental Pathology (Online)	A2	ODONTOLOGIA	Atualizado
1365-2613	International Journal of Experimental Pathology (Online)	B1	BIODIVERSIDADE	Atualizado
1365-2613	International Journal of Experimental Pathology (Online)	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	Atualizado
1365-2613	International Journal of Experimental Pathology (Online)	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II	Atualizado
1365-2613	International Journal of Experimental Pathology (Online)	B1	FARMÁCIA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	A1	CIÊNCIAS AGRÁRIAS I	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	A2	MEDICINA VETERINÁRIA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	A2	NUTRIÇÃO	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	A2	ODONTOLOGIA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	BIODIVERSIDADE	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	BIOTECNOLOGIA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	FARMÁCIA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	MEDICINA I	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	MEDICINA II	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	MEDICINA III	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B1	SAÚDE COLETIVA	Atualizado
0959-9673	International Journal of Experimental Pathology (Print)	B2	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III	Atualizado

ANEXO 2

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO

COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



DEGPP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "ANÁLISE DO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO DELGADO DE RATOS INFECTADOS POR TOXOPLASMA GONDII", protocolo 12361/2008, sob a responsabilidade de DEBORA DE MELLO G. SANT ANA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, segundo o disposto na Lei nº 71.794 de 2008, tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 09/09/2007.

We certify that the project "ANÁLISE DO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO DELGADO DE RATOS INFECTADOS POR TOXOPLASMA GONDII", protocol 12361/2008, in the responsibility of DEBORA DE MELLO G. SANT ANA, is in agreement with the Ethical Principles of Animal Experimentation, according to law 11.794/2008, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 09/09/2007.

UMUARAMA - PR, 15/06/2011.

Profª. Msc. Juliana Silveira Do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 12361

Dayane Aparecida Fagólo Paschoal da Silva
Secretária CEPEEA/UNIPAR

ANEXO 3

Guidelines for Author - Acta Tropica

Acta Tropica publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers should normally not exceed 10 printed pages including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to Acta Tropica is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to Acta Tropica carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has

preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information on author rights for (a) subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>; (b) for open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is \$1,800, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References

should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions

- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

WEBQUALIS

<http://qualis.capes.gov.br/webqualis/publico/pesquisaPublicaClassificacao.seam>

ISSN	TÍTULO	ESTRATO	ÁREA DE AVALIAÇÃO	STATUS
0001-706X	Acta Tropica	A1	CIÊNCIAS AGRÁRIAS I	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A1	GEOGRAFIA	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A1	INTERDISCIPLINAR	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A1	ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	BIODIVERSIDADE	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	ENFERMAGEM	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	GEOCIÊNCIAS	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	MEDICINA VETERINÁRIA	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	NUTRIÇÃO	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	A2	SAÚDE COLETIVA	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	BIOTECNOLOGIA	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	FARMÁCIA	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	MATERIAIS	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	MEDICINA I	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	MEDICINA II	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	MEDICINA III	Atualizado
0001-706X	Acta Tropica	B1	QUÍMICA	Atualizado

Sábado 31 Janeiro 2015 18:48:06