



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E  
FISIOPATOLOGIA

ALINE ROSA TREVIZAN

Cinética da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* e alterações  
histopatológicas no duodeno de ratos

Maringá  
2014

ALINE ROSA TREVIZAN

Cinética da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* e alterações  
histopatológicas no duodeno de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de  
Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da  
Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como  
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
Biociências e Fisiopatologia  
Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Mello Gonçalves  
Sant'Ana

Maringá  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

T814c Trevizan, Aline Rosa  
Cinética da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*  
e alterações histopatológicas no duodeno de ratos /  
Aline Rosa Trevizan. -- Maringá, 2014.  
55 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Debora de Mello Gonçalves  
Sant'Ana.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento  
de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-  
Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2014.

1. Toxoplasmose. 2. Mucosa intestinal. 3. Células  
caliciformes. 4. Duodeno. 5. Infecção aguda. 6.  
Enterócitos. I. Sant'Ana, Débora De Mello Gonçalves,  
orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro  
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em  
Biociências e Fisiopatologia. III. Título.

CDD 22.ed. 616.93

SOI-002174

# FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE ROSA TREVIZAN

Cinética da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* e alterações histopatológicas no duodeno de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacqueline Nelisis Zanoni  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Marques de Araújo  
Universidade Estadual de Maringá

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

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

Aprovada em: 09 de dezembro de 2014.

Local de defesa: Sala 112B, Bloco T20, Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho a Deus, que me concedeu a  
oportunidade de realizar este sonho.  
A meus pais que me ensinaram os princípios da vida.  
Ao meu marido Eleandro que esteve comigo quando mais foi preciso.  
A minha orientadora pela dedicação e confiança que inspiraram este trabalho.  
E a todos que de alguma forma contribuíram para sua realização.

## AGRADECIMENTO(S)

Acima de tudo agradeço a Deus que me criou e me deu a chance de chegar até aqui, me concedendo o dom do discernimento e da perseverança para alcançar meus objetivos.

A minha orientadora “Débora de Mello Gonçalves Sant’Ana” por ter depositado em mim confiança e credibilidade, por ser um exemplo de pessoa e profissional, por ter me amparado durante todo esse período e principalmente por sempre ter dispensado a mim muito carinho e dedicação.

Ao meu querido marido Eleandro pela compreensão, ajuda, carinho, companheirismo, paciência e sabedoria que me deram estímulo durante toda essa caminhada, além de ser uma inspiração na carreira acadêmica que pretendo seguir.

Aos meus pais Malvina e Isidro pelo dom da vida, por terem me ensinado tudo o que sei e por terem feito de mim uma pessoa do bem.

A minha irmã Angelita e meu cunhado Valter pelo incentivo e dedicação durante todo esse percurso que fizeram possível a realização de muitos sonhos, e aos meus queridos sobrinhos Rafael, Gabriel e Miguel que na sua inocência souberam me ensinar muito sobre a vida.

Aos meus sogros Neide e Romeu que sempre me acolheram e me trataram como filha.

A meus irmãos Lucas e Cristiano, minhas cunhadas Vanessa e Danila e minhas sobrinhas Maria Luiza, Maria Eduarda e Isabela, por serem parte importante da minha vida.

A todos os amigos de laboratório, Suelen, Rafael, Cristina, Letícia, Marcelo Biondaro, Marcelo Elias, Neide, Larissa Schneider, Larissa Bianchi, Elen Paula, Elen Polyana, Lainy, Bárbara, Paulo, Stephane Haracenko, Stefani Panza, Luara, Jéssica, Camila, Eliane, que com brincadeiras e sorrisos me ajudaram a superar os obstáculos que a vida proporcionou, além de auxiliar em momentos importantes.

A minha amiga Suelen, que me acolheu no laboratório e me auxiliou em todos os momentos da realização dessa pesquisa com muita paciência e dedicação.

Aos amigos Cristina, Paulo, Elen Paula, Ellen Polyana e Marcelo que me deram suporte técnico em algum momento deste estudo.

A professora Jacqueline Nelisis Zanoni que me aceitou em seu laboratório e muito gentilmente me deu a oportunidade de aprender um pouco sobre pesquisa.

A todos os amigos do laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neuronal Entérica Sara, Catchia, Camila, Juliana, Renata, Flavia, Priscilla, Héber, Isabela, Mariana, Geraldo, Francieli, Caroline, Paulo, Loraine e Murillo que me ensinaram muito na pesquisa e me proporcionaram momentos de grande alegria.

A minhas amigas Catchia, Priscilla e Camila, que me apoiaram nas decisões e caminhos seguidos, sempre com grande amizade.

A Luciane, secretária do PBF, que sempre me atendeu com muita atenção e carinho.

Aos professores Eduardo José de Almeida Araújo, Gessilda Alcantara Nogueira de Melo e Nilza Buttow que auxiliaram no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF) e à coordenação pela responsabilidade e confiança.

A técnica do laboratório de pesquisa Cleonira Sarro, pelo auxílio e companhia durante este período.

Ao Departamento de Ciências Morfológicas, pelo espaço concedido e apoio no que foi preciso.

Enfim, Obrigado a todos que direta ou indiretamente foram importantes para a realização deste trabalho!

## EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu  
tamanho original.”

(ALBERT EINSTEIN)



## Cinética da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* e alterações histopatológicas no duodeno de ratos

### RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito prevalente entre seres humanos e animais. Uma forma comum de transmissão é a ingestão de alimentos contaminados com oocistos. O *Toxoplasma gondii* precisa atravessar a barreira intestinal, invadindo células epiteliais, alcançando a parede intestinal e se disseminando pelo organismo. Objetivamos analisar a parede intestinal e as células do epitélio do duodeno de ratos infectados por *Toxoplasma gondii* durante diferentes durações de infecção aguda. Ratos foram separados em grupos inoculados por via oral com oocistos de *Toxoplasma gondii* por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d), e em grupo controle não infectado (GC). Aos 60 dias de idade, esses ratos foram submetidos à eutanásia e os duodenos processados histologicamente para análise da parede intestinal e de células epiteliais. Nos grupos infectados foi observado aumento na largura de vilos e criptas; redução na altura de enterócitos; aumento no menor diâmetro e redução no maior diâmetro do núcleo de enterócitos. Ocorreu aumento na quantidade de células caliciformes que secretam muco neutro no G6, G12 e G7d e das que secretam muco ácido no G7d e G10d, além de aumento no número de linfócitos intraepiteliais no G48. Houve ainda atrofia da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total nos grupos infectados. Conclui-se que diferentes tempos de infecção aguda por *Toxoplasma gondii* causam alterações na estrutura histológica do duodeno de ratos no intuito de manter a homeostasia do animal.

**Palavras-chave:** Células caliciformes. Duodeno. Infecção aguda. Mucosa intestinal. Toxoplasmose.

## Kinetics of acute infection by *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats

### **ABSTRACT**

*Toxoplasma gondii* is a prevalent parasite among humans and animals. A common form of transmission is through the ingestion of food contaminated with oocysts. *Toxoplasma gondii* must cross the intestinal barrier, invading epithelial cells, reaching the intestinal wall and spreading throughout the body. We aimed to analyze the intestinal wall and epithelial cells of the duodenum of rats infected with *Toxoplasma gondii* during different durations of acute infection. Rats were separated into groups inoculated orally with *Toxoplasma gondii* oocysts for 6 hours (G6), 12 hours (G12), 24 hours (G24), 48 hours (G48), 72 hours (G72), 7 days (G7d) and 10 days (G10d), and an uninfected control group (CG). When rats were 60-day-old, they were euthanized and the duodenum were histologically processed to analyze the intestinal wall and epithelial cells. We observed in the infected groups increase in the width of villi and crypts; reduction in the height of enterocytes; increase in the minor diameter and decrease in the major diameter of the enterocyte nucleus. An increase of goblet cells secreting neutral mucus in G6, G12 and G7d was observed as well as of goblet cells secreting acid mucus in G7d and G10d. An increased number of intraepithelial lymphocytes was seen in G48. There was atrophy of the submucosa, the external muscle layer and the total wall in the infected groups. It can be concluded that different period of acute *Toxoplasma gondii* infection causes changes in histological structure of the duodenum from rats in order to maintain homeostasis of the animal.

**Keywords:** Acute infection. Duodenum. Goblet cells. Intestinal mucosa. Toxoplasmosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1 Altura e largura de enterócitos e maior e menor diâmetro de seus núcleos presentes na mucosa intestinal de animais do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela técnica de HE.....43
- Tabela 2 Morfometria da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela coloração de HE.....44
- Figura 1 Altura e largura dos vilos e profundidade e largura das criptas do duodeno de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela coloração de HE.....47
- Figura 2 Número de células caliciformes evidenciadas pelas técnicas de PAS, AB 1,0 e AB 2,5 presentes em 0,96mm<sup>2</sup> de mucosa intestinal dos animais do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*.....48
- Figura 3 Micrografia de cortes transversais do duodeno de ratos do GC, G6, G12, G7d e G10d. As setas pretas demonstram células caliciformes coradas por PAS, as setas azuis as coradas por AB 1,0 e as setas vermelhas as coradas por AB 2,5, sendo possível observar aumento dessas células caliciformes nos grupos infectados demonstrados.....49
- Figura 4 Porcentagem de animais nos grupos infectados por *T. gondii* que apresentaram redução e aumento na contagem de LIE em relação aos valores da contagem do GC, evidenciados pela coloração de HE.....50
- Figura 5 Micrografia de cortes transversais do duodeno de ratos do GC e de grupos infectados por *T. gondii* (G6, G12, G24, G48, G72, G7d e G10d), corados por HE. As setas vermelhas demonstram a espessura da tela submucosa e as setas pretas à espessura da túnica muscular, demonstrando atrofia dessas túnicas nos grupos infectados.....51
- Figura 6 Esquemática das mudanças observadas na parede intestinal e nas células epiteliais de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*.....52

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia. Artigo elaborado nas normas do periódico: *Digestive Diseases and Sciences*.

Disponível em:

[http://www.springer.com/medicine/internal/journal/10620?print\\_view=true&detailsPage=pltc\\_469246](http://www.springer.com/medicine/internal/journal/10620?print_view=true&detailsPage=pltc_469246).

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	12
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
1.2	Toxoplasmose e Sistema Digestório.....	14
1.3	Sistema Digestório.....	15
1.4	Duodeno.....	17
1.5	Justificativa.....	18
1.6	Objetivos.....	19
1.7	Referências.....	19
2	CAPÍTULO II.....	23
2.1	Cinética da infecção aguda pelo <i>Toxoplasma gondii</i> e alterações histopatológicas no duodeno de ratos.....	24
3	CAPÍTULO III.....	53
3.1	Conclusões.....	53
3.2	Perspectivas Futuras.....	53
4	ANEXOS.....	55

## CAPÍTULO I

### *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), sendo considerada uma das infecções parasitárias mais comuns para o homem e para vários animais domésticos e selvagens<sup>(1)</sup>. É uma das zoonoses mais difundidas pelo mundo, em algumas regiões de 40 a 70% de humanos adultos apresentam anticorpos anti-*T. gondii*<sup>(2)</sup> e no Brasil esta prevalência varia de 50 a 70%<sup>(3,4)</sup>.

Este parasito possui ciclo de vida que se alterna entre hospedeiros intermediários, onde ocorrem os estágios assexuados, e hospedeiros definitivos, onde ocorrem os estágios sexuados e assexuados do parasito<sup>(1)</sup>. Os felídeos são os hospedeiros definitivos, sendo que os gatos domésticos possuem papel fundamental na transmissão do *T. gondii* para o humano<sup>(5)</sup>. Nesses animais ocorre o ciclo enteroepitelial, em que o parasito obtido por via oral penetra na parede intestinal e desenvolve-se dentro das células epiteliais do intestino delgado, principalmente enterócitos, formando os oocistos que são eliminados com as fezes. Nos demais animais homeotérmicos ocorre apenas o ciclo tecidual extra-intestinal<sup>(6)</sup>.

Por meio de técnicas moleculares foi possível dividir a população desse parasito em três linhagens clonais, quanto ao gene da proteína SAG2, denominadas genótipos I, II, e III<sup>(7)</sup>. De acordo com o fenótipo, as cepas são classificadas em altamente virulentas (genótipo I), de virulência intermediária (genótipo II) e baixa virulência (genótipo III)<sup>(8)</sup>. Normalmente as cepas do genótipo II e III levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em ratos e camundongos, enquanto as cepas do genótipo I são extremamente virulentas, causando significativos índices de mortalidade em camundongos<sup>(7)</sup>. O *T. gondii* possui grande diversidade clonal, atualmente identifica-se cerca de 130 genótipos distintos no Brasil, sendo que estes novos genótipos não se enquadram completamente em nenhum dos três tipos anteriormente descritos<sup>(9)</sup>.

Durante seu ciclo de vida o parasito apresenta principalmente o estágio de: (1) oocisto, forma de resistência a condições ambientais<sup>(2)</sup> que são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados imaturos junto com as fezes; (2) bradizoíto, forma de multiplicação lenta do parasito que é encontrado dentro do vacúolo parasitóforo de uma célula, cuja membrana forma a cápsula do cisto tecidual, sendo localizados predominantemente no sistema nervoso central, globo ocular e nos músculos esquelético e cardíaco e (3) taquizoíto, células em formato de arco que são encontradas durante a fase

aguda da infecção, de multiplicação rápida dentro de vacúolos parasitóforos de várias células, como nas células do sistema fagocítico mononuclear, células hepáticas, musculares, pulmonares e nervosas<sup>(10, 11)</sup>.

A infecção pelo *T. gondii* pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos; de carne crua ou mal-cozida, contendo cistos teciduais ou transmissão de taquizoítos por via transplacentária ou congênita<sup>(5, 11, 12)</sup>. Quando os oocistos alcançam o trato gastrointestinal, ocorre a liberação dos esporozoítos que por sua vez se transformam em taquizoítos, sendo os últimos a forma proliferativa que atravessa a barreira intestinal para atingir outros órgãos, podendo infectar quaisquer células nucleadas por penetração ativa, entretanto, observa-se um tropismo por células musculares e neurônios<sup>(13-15)</sup>.

O mecanismo de defesa contra o *T. gondii* é mediado principalmente pela resposta imune celular<sup>(16)</sup>. Diferentes células participam do processo de defesa, como células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos), células “natural killer” (NK), leucócitos polimorfonucleares e linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup><sup>(16, 17)</sup>. A resistência do hospedeiro ao parasito se dá basicamente por meio de atividades citotóxicas e da secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas<sup>(18)</sup>.

A toxoplasmose geralmente é assintomática, pois apenas 10% a 20% dos casos apresentam-se sintomáticos<sup>(19)</sup>. A presença de sinais clínicos depende do estado imune do hospedeiro, do número de formas parasitárias ingeridas, e se existe, ou não, uma afecção concomitante<sup>(20)</sup>. Na fase aguda ocorre a ampla disseminação do parasito pelo organismo do hospedeiro, através da multiplicação ativa dos taquizoítos no interior de células nucleadas<sup>(16)</sup>, enquanto na fase crônica, os parasitos podem permanecer viáveis durante toda a vida do hospedeiro na forma de cistos teciduais<sup>(10)</sup>. Os primeiros sintomas nos casos agudos são: febre, mal estar, sudorese noturna, mialgia, exantema maculopapular, linfadenopatia e linfocitose que persistem durante dias a semanas<sup>(5)</sup>.

Em pacientes imunodeprimidos, a fase aguda da infecção é mais danosa, podendo causar exantema maculopapular, pneumonia, miocardite, cefaléia, corioretinite, hidrocefaléia, encefalites, confusão mental, coma, e/ou morte<sup>(5, 15, 19)</sup>. Já na transmissão transplacentária, dependendo do período gestacional, pode ocorrer lesão cerebral, deformidades físicas, má formação no feto e até mesmo o aborto<sup>(6)</sup>.

Os parasitos que persistem dentro de cistos teciduais, caracterizando a infecção latente, podem ser reativados em casos de imunossupressão, como no caso da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), causando sérias complicações, principalmente encefalite grave que pode levar ao óbito<sup>(21)</sup>.

Durante a infecção crônica, em hospedeiros intermediários, como roedores, têm sido observado alterações fenotípicas que causam modificação do comportamento inato de aversão ao odor da urina de felinos. Existem indicações de que a via dopaminérgica seja atingida e por isso a administração de alguns antipsicóticos tem evitado o aparecimento dessas mudanças<sup>(22)</sup>. Os cistos de *T. gondii* podem se localizar em regiões do encéfalo responsáveis pelo comportamento de mamíferos, como o sistema límbico, fato que pode explicar alterações no comportamento<sup>(23)</sup>. Ainda em humanos adultos está sendo observado uma relação entre a infecção pelo *T. gondii* e a ocorrência da esquizofrenia, além de sintomas psiquiátricos como desilusão e alucinações<sup>(24)</sup>.

## **TOXOPLASMOSE E SISTEMA DIGESTÓRIO**

Para se disseminar pelo organismo, o *T. gondii* precisa transpor a barreira intestinal iniciada no duodeno, causando desta forma, um estado de alerta na mucosa intestinal, marcado pela migração de linfócitos como parte dos mecanismos de resposta inflamatória local<sup>(25)</sup>.

Em pacientes imunodeprimidos o envolvimento do trato gastrointestinal é raro, sendo relatada a toxoplasmose com sintomas gástricos, como dor abdominal, diarreia, vômito, anorexia e ascite, sendo encontradas lesões no esôfago, estômago, intestino delgado e grosso através de biópsias *post-mortem*<sup>(26)</sup>.

Algumas cepas do genótipo I, são capazes de causar ileíte fatal em camundongos<sup>(7)</sup>. Além disso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa já demonstraram alterações nas estruturas da parede intestinal e nas células epiteliais induzidas pela infecção crônica do parasito *T. gondii* em diferentes espécies animais<sup>(27-32)</sup>. Dentre as alterações morfológicas e funcionais observadas estão a diarreia e infiltrados inflamatórios na túnica mucosa, redução da espessura da parede intestinal, aumento no número de células caliciformes e morte e atrofia dos neurônios do plexo mientérico do duodeno de galinhas infectadas cronicamente<sup>(27)</sup>. No duodeno de gatos infectados por *T. gondii* durante 40 dias foi descrito aumento no número de células de Paneth e aumento na altura dos enterócitos<sup>(31)</sup>. Além disso, no plexo submucoso do jejuno de ratos infectados por 60 dias foi relatada redução no número de neurônios vipérgicos<sup>(29)</sup>. Essas diferentes alterações observadas no trato gastrointestinal durante a infecção causada pelo *T. gondii* são dependentes de características próprias do parasito capazes de levar a infecção, como genótipo, cepa, forma de vida infectante e via de inoculação utilizada, além das características do hospedeiro de responder à infecção, como



espécie estudada, segmento do tubo digestório avaliado e tipo celular da parede intestinal que foi analisado.

## **SISTEMA DIGESTÓRIO**

O sistema digestório é constituído de cavidade oral, tubo digestório e glândulas anexas, que realizam a ingestão, mastigação, deglutição e digestão do alimento e absorção dos nutrientes, além da eliminação dos restos não digeridos. O tubo digestório é a porção responsável por macerar, encaminhar, digerir, selecionar e absorver os elementos nutritivos e a água, sendo subdividido em esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. No humano o intestino delgado é formado pelo duodeno, jejuno e íleo que possuem as funções de digestão e absorção dos nutrientes, enquanto o intestino grosso é formado pelo ceco, colos ascendente, transverso, descendente e sigmoide seguido do reto e do canal anal que fazem a absorção de eletrólitos e água, além de formarem o bolo fecal<sup>(33)</sup>. Em ratos o sistema digestório é muito semelhante ao humano, possuindo a mesma nomenclatura anatômica do esôfago ao íleo, sendo o intestino grosso dividido em ceco, cólon proximal, cólon distal, reto e canal anal<sup>(34)</sup>.

O intestino delgado é formado histologicamente por: túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa. A túnica mucosa é altamente vascularizada e composta pelo epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa. Na mucosa são encontrados os vilos, que são projeções da lâmina própria em direção ao lúmen intestinal, que estão recobertas por um epitélio de revestimento simples prismático; além de invaginações epiteliais nos espaços intervilares que formam numerosas glândulas, normalmente denominadas de criptas intestinais<sup>(35)</sup>. Ao olho nú, os vilos dão um aspecto aveludado ao revestimento da mucosa intestinal, sendo estruturas permanentes e delicadas que aumentam a superfície de digestão e absorção do intestino delgado em cerca de 10 vezes<sup>(36)</sup>.

No epitélio intestinal as células mais numerosas são os enterócitos, as quais são colunares, cerca de 25 µm de altura, com núcleo oval localizado no polo basal e com uma borda em escova (microvilosidades) no polo apical. Essas células são responsáveis pela digestão terminal de macromoléculas e absorção de água e nutrientes, além de modificar ácidos graxos em triglicerídeos, formar quilomícrons, e transportar nutrientes para vasos sanguíneos e linfáticos da lâmina própria, de onde serão distribuídos para todo o corpo<sup>(35)</sup>. Os enterócitos também desempenham importante papel na resposta imunitária frente a processos inflamatórios e infecciosos que ocorrem na mucosa, podendo funcionar como células

apresentadoras de antígenos ou ainda atuar na produção e secreção de citocinas e quimiocinas com atividade quimiotática e pró-inflamatória no epitélio intestinal<sup>(37, 38)</sup>.

Células caliciformes também estão presentes no epitélio intestinal, e são glândulas unicelulares com formato de cálice, com sua base apoiada na lâmina basal e com seu polo apical repleto de gotículas 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. Essas células possuem a função de produzir e secretar o mucinogênio, cuja forma hidratada é a mucina, 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. Existem ainda nos vilos, as células M que auxiliam o sistema mononuclear fagocitário da mucosa<sup>(36)</sup>.

As criptas são glândulas simples e tubulares que circundam a base dos vilos e se abrem como perfurações do revestimento interno do intestino. Além de enterócitos e células caliciformes, nas criptas encontram-se também células de reserva, que são as células progenitoras, as células de Paneth, que produzem o agente antimicrobiano lisozima e as células enteroendócrinas (também denominadas de células pertencentes ao sistema neuroendócrino difuso – SNED)<sup>(36)</sup>. As células de Paneth estão localizadas no fundo das criptas e além de secretarem lisozimas, ainda produzem TNF- $\alpha$ , defensinas e criptidinas que ficam armazenados em grânulos contidos em seu citoplasma e que são liberados para proteger a superfície luminal da invasão de microrganismos patogênicos<sup>(39)</sup>.

Ainda para ajudar a proteger o revestimento epitelial, existem diversos linfócitos localizados na lâmina própria que migram para o epitélio<sup>(36)</sup>. Quando ocorre a invasão da barreira intestinal por algum microrganismo, os fagócitos são rapidamente recrutados para os locais da invasão, por meio da resposta imune Th1 mediada por macrófagos ou Th2 mediada por neutrófilos, intensificando a migração de diversos linfócitos da lâmina própria para o lúmen intestinal após horas de infecção. Esse fenômeno faz com que um maior número de linfócitos intraepiteliais sejam visualizados em cortes histológicos do intestino. A chegada desses leucócitos qualifica os processos infecciosos do sistema digestório<sup>(37)</sup>, sendo que a infiltração leucocitária é evidenciada na lâmina própria do intestino delgado de camundongos infectados com cistos de *T. gondii* após sete dias de infecção<sup>(40)</sup>.

A lâmina própria situa-se abaixo do epitélio intestinal e é constituída de tecido conjuntivo frouxo, abrigando diversos vasos sanguíneos e linfáticos de pequeno calibre (capilares), além de envolver externamente glândulas e nódulos linfáticos ocasionais. A muscular da mucosa circunda a lâmina própria, delimitando a mucosa e a submucosa. Ela é

composta por células musculares lisas reunidas em uma camada circular interna e uma longitudinal externa que são responsáveis por desenvolverem contrações rítmicas que movimentam os vilos de forma intensa durante a digestão<sup>(36)</sup>.

A tela submucosa é formada por tecido conjuntivo denso fibroelástico não-modelado com a presença de numerosos vasos sanguíneos e linfáticos de maior calibre (arteríolas e vênulas). Nesta tela ainda encontra-se o plexo submucoso, componente nervoso que controla a motilidade da mucosa, a atividade secretora das glândulas e a vasomotricidade. A túnica muscular é formada por dois estratos de músculo liso: o estrato circular da túnica muscular (interna) e o estrato longitudinal da túnica muscular (externa). Essas fibras musculares são responsáveis pela atividade motora intestinal, além de possuírem uma ampla rede de células do sistema imune. Entre os dois estratos da túnica muscular situa-se o plexo mioentérico, outro componente nervoso que regula a atividade peristáltica, bem como outros tipos de movimentos exercidos pela túnica muscular. A túnica serosa é formada por tecido conjuntivo frouxo que recobre externamente todo o tubo intestinal. Essa túnica é chamada de serosa quando o segmento do tubo digestório é revestido por peritônio, e conhecida como adventícia quando o segmento é retroperitoneal, como é o caso do esôfago<sup>(35)</sup>.

O sistema digestório possui um sistema nervoso intrínseco, chamado de Sistema Nervoso Entérico (SNE), que controla todas as funções digestórias, apresentando uma extensa rede de neurônios dispersos ou reunidos em gânglios que se organizam em plexos. Os plexos ganglionados são o mioentérico e o submucoso, dos quais emergem feixes de fibras nervosas que formam os plexos não-ganglionados, presentes em toda a parede intestinal<sup>(41)</sup>. Além de neurônios, no SNE existem também as Células da Glia Entérica (CGEs), que possuem diversas funções ligadas a sobrevivência neuronal, como apoio metabólico, estrutural, trófico e de proteção<sup>(42)</sup>.

## **DUODENO**

O duodeno é o primeiro segmento do intestino delgado, medindo cerca de 25 cm no humano, é o local onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e parte da absorção dos nutrientes<sup>(33)</sup>. Em ratos o duodeno tem aspecto morfológico semelhante ao do homem, localizado na região abdominal, possui formato de C, com paredes mais espessas que o restante do intestino delgado e se apresenta proporcionalmente maior que o duodeno humano, medindo em torno de 4 e 7 cm de comprimento<sup>(34)</sup>. Nele ocorre a liberação da bile, que é produzida pelo fígado, armazenada na vesícula biliar e encaminhada pelo ducto colédoco até o lúmen intestinal. Também no duodeno é secretado o suco pancreático, produzido pelos

ácinos pancreáticos e transportado pelos ductos pancreáticos até o lúmen intestinal. A ação dessas secreções digestivas sobre o quimo resulta na fase final de digestão dos alimentos, chamada de quilo, na qual já existem substâncias modificadas a ponto de serem absorvidas na mucosa do duodeno e principalmente na do jejuno e do íleo<sup>(33)</sup>.

Na túnica submucosa do duodeno existem as glândulas de Brunner ou glândulas duodenais, cujos ductos penetram na mucosa, perfurando a base das criptas e secretam no lúmen do duodeno uma secreção mucosa alcalina, que ajuda neutralizar o quimo ácido proveniente do estômago. Na mucosa duodenal percebe-se que os vilos são mais largos, mais altos e mais numerosos que os vilos do jejuno e do íleo, e que as células caliciformes, responsáveis pela secreção de muco, são menos numerosas que nos demais segmentos<sup>(36)</sup>.

A chegada do quimo semi-processado do estômago ao duodeno faz com que o contato do quimo com a parede duodenal controle a velocidade do esvaziamento gástrico, ativando vias reflexas, compostas de componentes neuronais e hormonais que coordenam as atividades motoras e secretoras do estômago, fígado, pâncreas e do próprio duodeno, responsáveis pelas demais etapas da digestão e absorção dos nutrientes<sup>(43)</sup>.

No intestino delgado ocorre a maior liberação e penetração de esporozoítos provenientes dos oocistos de *T. gondii* ingeridos na alimentação<sup>(44)</sup>. O duodeno é um segmento curto, com pH mais baixo que os outros segmentos do intestino delgado e possui glândulas responsáveis pela produção de uma espessa camada de muco que recobre o epitélio intestinal<sup>(45)</sup>. Esses fatores inerentes ao órgão podem facilitar a eclosão dos oocistos e a liberação de esporozoítos, mas também podem dificultar a invasão do parasito pela mucosa intestinal do duodeno.

## **JUSTIFICATIVA**

Nos mamíferos a principal via de infecção do *T. gondii* é a oral. Quando chega ao intestino, o parasito encontra uma barreira mecânica e imune que determina a efetividade da infecção e sua patogenicidade.

Nosso grupo tem mostrado que o parasito provoca modificações na organização tecidual e inervação do trato gastrointestinal. Estudos prévios já definiram a forma de vida do parasito, o genótipo e a via de infecção para o desenvolvimento de um modelo experimental que permita a realização de estudos posteriores. No entanto, ainda não foram realizados estudos da cinética desta infecção, verificando as respostas teciduais do intestino durante a fase aguda da infecção, especialmente durante o período de transposição da barreira intestinal pelo protozoário.

Considerando, portanto, que a Toxoplasmose é uma doença de grande importância epidemiológica e que o intestino tem grande relação com a infecção, torna-se importante investigar as relações do intestino e da sua estrutura com as alterações causadas por essa doença em diferentes tempos de infecção aguda. Com este estudo, visamos compreender os mecanismos da patogênese das alterações intestinais causadas pela toxoplasmose, com o intuito de aprimorar a lacuna que existe sobre esse assunto na literatura.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Compreender o papel da barreira intestinal na cinética da fase aguda da infecção oral pelo *T. gondii* em ratos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar as mudanças que ocorrem no duodeno diante de diferentes tempos de infecção aguda por oocistos de *T. gondii* (cepa ME-49, genótipo II).

Avaliar a resposta da mucosa intestinal perante a invasão do parasito, por meio da análise morfométrica de vilos e criptas.

Realizar a morfometria de enterócitos e seus núcleos presentes no vilos e nas criptas do duodeno nos diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*.

Realizar a contagem de células caliciformes que secretam diferentes mucinas.

Verificar o número de linfócitos intraepiteliais em cada momento de infecção aguda por *T. gondii*.

Analisar a evolução do processo inflamatório na parede intestinal do duodeno de ratos em diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*, verificando possíveis alterações morfométricas na tela submucosa, túnica muscular e parede total.

## **Referências Bibliográficas**

1. Dubey JP. Bradyzoite - induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. J Euk Microbiol 1995; 44:592-602.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30(12-13):1217-58.

3. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonre FRA, Junior VGSJ, Botelho CA, Figueiredo MS et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginec Obstet* 2005; 27(8):442-9.
4. Silva AV, Cunhas ELP, Meirelis LR, Gottschal S, Mora RA, Langoni H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco. *Rev Bras Ciên Rur* 2003; 33(1):115-9.
5. Weiss L, Kim K. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and methods. Alterations in Host. Cell Biology. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
6. Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroent* 2004; 127(2):635-657.
7. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172:1561-6.
8. Freyre A, Correa O, Falcon J, Mendez J, Gonzalez M, Venzai JM. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitol Res* 2001; 87:941-4.
9. Vitaliano SN, Soares HS, Minervino AHH, Pena HFJ, Geraldi VC, Santos ALQ et al. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates from wild animals from Brazil. In: II Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose. São Paulo; 2013. p. 23.
10. Dubey JP. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol* 1998; 74(1):75-7.
11. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 147-56.
12. Dubey JP, Brake RJ, Murrell KD, Fayer R. Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. *Am J Vet Res* 1986; 47(3):518-22.
13. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 1994; 18(6):853-61.
14. Rey L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
15. Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
16. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol Rev* 1998 Oct; 11(4):569-88.

17. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità 2004; 40(1):71-80.
18. Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. Immunol Cell Biol 2007 Jan; 85:155–9.
19. Bonametti AM, Passos JN, Koga da Silva EM, Macedo ZS. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. J Trop Pediatr 1997 Apr; 4(2):116.
20. Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina interna veterinária: Enfermedades del perro y el gato. 6 ed. Madrid: Elseve; 1997.
21. Luft BJ; Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992; 15(2):211-22.
22. Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull 2007; 33(3):752-6.
23. Holliman RE. Toxoplasmosis, behavior and personality. J Infect 1997; 35(2):105-10.
24. Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and Schizophrenia. Emerg Infect Dis 2003; 9:1375-80.
25. Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. Trends Parasitol 2006 Oct; 22(10):448-52.
26. Trovão FP, Spaziani G, Vasconcelos RM, Teixeira RA, Patzina RA, Batista TPA et al. Toxoplasmose gástrica em paciente infectado pelo vírus da imunodeficiência humana. Relato de caso. Rev Bras Clin Med São Paulo 2013; 11(4):1-4.
27. Bonapaz RS, Hermes-Uliana C, Santos FN, Da Silva AV, Almeida EJ, Sant'Ana DMG. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). Pesq Rev Bras 2010; 30:787-92.
28. Braga CF, Silva AV, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. Arq Bras Med Vet Zootec 2011; 63(2):340-7.
29. Sant'Ana DMG, Gois MB, Zanoni JN, Silva AV, Silva CJT, Araújo EJA. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. Inter J Experim Pathol 2012; 93:279-86.
30. Shiraishi CS, Azevedo JF, Silva AV, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. Análise morfométrica da parede intestinal de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. Ciên Rur 2009; 39:2146-53.

31. Silva JM, Silva AV, Araújo EJA, Sant'Ana DMG. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. Rev Bras Parasitol Vet 2010; 19:55-61.
32. Silva PC, Shiraishi CS, Silva AV, Gonçalves GF, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. Exper Parasitol 2010; 125:380-3.
33. Sant'Ana DMG, Miranda-Neto MH, Oliveira LR. Sistema Digestório. In : Miranda-Neto MH. Anatomia Humana: Apendizagem Dinâmica. Maringá: Clichetec; 2006.
34. Olds RJ. A color Atlas of the Rat-Dissection Guide. New York: Halstead Press-John Wiley e Sons; 1979.
35. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
36. Gartner LP, Hiatt JL. Tratado de Histologia em cores. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
37. Elia CCS, Souza HSP. Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.
38. Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. Curr Opin Gastroenterol 2012; 28(2):124-9.
39. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. Cell Mol Life Sci 2002; 59:156-70.
40. Mennechet FJD, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina Propria CD4+ T Lymphocytes Synergize with Murine Intestinal Epithelial Cells to Enhance Proinflammatory Response Against an Intracellular Pathogen. J Immunol 2002; 168(6):2988-96.
41. Furness JB. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 2006.
42. Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. Neurogastroenterol Motil 2004; 16(1):44-9.
43. Kutchai HC. Motilidade gastrointestinal. In : Berne RM, Levy MN (Eds). Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
44. Dubremetz JF, Ferguson DJP. The role played by electron microscopy in advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. Int J for Parasit 2009; 39(8):883-93.
45. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.



## CAPÍTULO II

**Artigo: “CINÉTICA DA INFECÇÃO AGUDA PELO *Toxoplasma gondii* E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO DUODENO DE RATOS”**

**Cinética da infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* e alterações histopatológicas no duodeno de ratos**

**Aline Rosa Trevizan, Suellen Lais Vicentino Vieira, Débora de Mello Gonçalves  
Sant'Ana**

Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79, Maringá, PR, CEP 87020-900, Brasil

A. R. Trevizan - S. L. Vicentino-Vieira - D. M. G. Sant'Ana

A. R. Trevizan (Autor Correspondente)

Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79, Maringá, PR, CEP 87020-900, Brasil

e-mail: alininha\_trevizan@hotmail.com

Especialista Aline Rosa Trevizan - alininha\_trevizan@hotmail.com

Mestre Suellen Lais Vicentino-Vieira - suellen.lais@hotmail.com

Doutora Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana - dmgsantana@gmail.com

## Resumo

*Introdução* O *Toxoplasma gondii* atravessa a barreira intestinal para se disseminar pelo organismo.

*Objetivo* Analisar a parede intestinal e células epiteliais do duodeno de ratos infectados por *T. gondii* durante diferentes durações de infecção aguda.

*Métodos* Ratos Wistar com 60 dias de idade foram separados em grupos inoculados por via oral com 5000 oocistos de *Toxoplasma gondii* por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d), e em grupo controle (GC) que recebeu solução salina. Esses ratos foram submetidos à eutanásia e os duodenos processados para obtenção de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, periodic acid shiff, alcian blue pH 2,5 e pH 1,0. Foi realizado morfometria das camadas da parede intestinal e enterócitos, além de contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais. Os dados foram comparados pelo teste de variância Anova, considerando 5% como nível de significância. *Resultados* Ocorreu aumento na largura de vilos e criptas; redução na altura de enterócitos; aumento no menor e redução no maior diâmetro do núcleo de enterócitos dos animais infectados, aumento no número de células caliciformes que secretam muco neutro no G6, G12 e G7d e das que secretam muco ácido no G7d e G10d, e aumento de linfócitos intraepiteliais no G48. Houve atrofia da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total nos grupos infectados.

*Conclusão* Infecção aguda por *Toxoplasma gondii* causa mudanças morfológicas na parede intestinal e nas células epiteliais do duodeno de ratos.

**Palavras-chave** Duodeno. Infecção aguda. Mucosa intestinal. Toxoplasma

## Introdução

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasito *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), altamente prevalente em seres humanos e animais. Sua transmissão ocorre principalmente por meio da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos ou carne mal cozida contendo cistos teciduais. Na infecção aguda, os taquizoítos multiplicam-se rapidamente e atingem diversas células do hospedeiro. No decorrer da infecção, os bradizoítos tendem a formar cistos teciduais, preferencialmente no tecido nervoso e muscular, configurando assim a forma crônica da infecção [1, 2].

O *T. gondii* possui ciclo heteroxênico, sendo os felídeos os hospedeiros definitivos e os animais homeotérmicos os hospedeiros intermediários [3, 4]. A infecção frequentemente apresenta-se assintomática, contudo em pacientes imunocomprometidos podem aparecer manifestações clínicas como encefalite, decorrentes da reativação de infecções latentes [1, 5].

Para se disseminar pelo organismo o *T. gondii* precisa transpor a barreira intestinal, causando um estado de alerta na mucosa, marcado principalmente pela migração de linfócitos [6, 7]. No epitélio intestinal os enterócitos são as células mais numerosas e possuem a função de absorção de água e nutrientes, enquanto que as células caliciformes são secretoras das mucinas que compõe o muco e formam uma camada protetora no epitélio intestinal [8]. Os esporozoítos contidos nos oocistos ingeridos na alimentação chegam aos segmentos do sistema digestório e penetram em enterócitos, células caliciformes e linfócitos, alcançando a parede intestinal e diversos outros tecidos [4, 9], podendo culminar em disfunções que levam a inflamações intestinais ou diarreia [10].

Estudos com animais infectados cronicamente por *T. gondii* têm demonstrado alterações na estrutura da parede intestinal, no número de células caliciformes e no tamanho de enterócitos [11-14], sendo essas alterações dependentes da forma de vida do parasito, da cepa, da duração da infecção, da espécie do hospedeiro e da região do intestino avaliada. No

entanto, as modificações da estrutura histológica intestinal em infecções agudas por *T. gondii* não são conhecidas. Por isso, diante da íntima relação do intestino com o parasito no momento da infecção, o presente estudo objetivou analisar os estratos da parede intestinal e a dinâmica das células presentes no epitélio do duodeno de ratos Wistar infectados por oocistos de *T. gondii* durante diferentes durações de infecção aguda, com a finalidade de compreender o papel da barreira intestinal na cinética da fase aguda da infecção toxoplásmica em ratos.

## Métodos

### Delineamento Experimental

Todo o protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob parecer de aprovação n° 079/2013.

Para realização dessa pesquisa foram utilizados 64 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de idade pesando em média  $272,77 \pm 10,9g$  provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Aos 28 dias de idade todos os animais receberam tratamento antiparasitário por via oral (500mg/Kg de suspensão de Metronidazol/5 dias e 50 mg/Kg de suspensão de Fembendazol em dose única). Após 7 dias do término do tratamento foi realizado o exame parasitológico de fezes para certificação da ausência de parasitos. A partir dos 50 dias de idade esses ratos foram distribuídos aleatoriamente em grupo controle (GC) e em grupos inoculados por *T. gondii* e mantidos por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d) (n=8).

Cada rato dos grupos infectados recebeu por via oral 5000 oocistos de *T. gondii* esporulados (cepa ME-49, genótipo II) e ressuspendidos em 1 mL de solução salina estéril,

enquanto os animais do GC receberam apenas solução salina. Os oocistos foram obtidos do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e foto-período de 12 horas (6hs – 18hs), recebendo ração padrão para roedores (Nuvilab, Colombo, PR, BR) e água filtrada *ad libitum*.

No final de cada período experimental foi feita a coleta de sangue da cauda desses animais para realizar a verificação da presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo teste de aglutinação direta, considerando positivo títulos acima de 25 [1, 15].

#### Eutanásia e Coleta de Amostras

Após os períodos experimentais, os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano [16]. Após laparotomia vertical, o duodeno foi retirado, tendo como limite anatômico distal a flexura duodeno-jejunal, sendo processado de acordo com as técnicas histológicas.

#### Processamento Histológico

Foram coletados de todos os animais, anéis de dois centímetros do duodeno que foram abertos pela borda mesentérica, fixados em isopor com auxílio de espinhos e colocados no fixador Bouin por 6 horas. Inicialmente os duodenos foram emblocados em parafina para obtenção de cortes transversais semi-seriados de  $4\mu\text{m}$ , feitos em micrótomo e dispostos em lâminas de vidro. Esses cortes passaram por baterias de desparafinização e hidratação para serem corados com hematoxilina e eosina (HE) – utilizada na morfometria dos vilos, das criptas, dos enterócitos, na quantificação de linfócitos intraepiteliais e na morfometria da tela

submucosa, túnica muscular e parede total. Foram confeccionadas também lâminas com as colorações de PAS (periodic acid shiff) – 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. Todas as análises foram feitas de forma cega.

#### Análise morfométrica de enterócitos

Nas lâminas com quatro cortes corados em HE, foram mensurados a largura e a altura de 50 enterócitos e o menor e maior diâmetro dos seus núcleos presentes aleatoriamente nos vilos e nas criptas. Para isso, foram capturadas na objetiva de 40x quatro imagens de cada corte, com auxílio de uma câmera digital (Pro series 3CCD camera) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50). As mensurações de largura e altura dos enterócitos e seus núcleos foram feitas no software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

#### Contagem de células caliciformes

Para cada uma das técnicas de PAS, AB 1,0 e AB 2,5 foram corados quatro cortes, sendo capturadas seis imagens de cada corte na objetiva de 20x, com auxílio de uma câmera digital (Pro series 3CCD camera) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50). Em cada uma dessas técnicas, foi quantificado o número de células caliciformes presentes em  $0,96\text{mm}^2$  de túnica mucosa de cada animal [12], utilizando-se do software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics) para realizar essa contagem.

#### Contagem de linfócitos intraepiteliais (LIE)

Foram utilizados quatro cortes corados em HE, dos quais foram capturadas seis imagens de cada corte na objetiva de 20x, com auxílio de uma câmera digital (*Pro series 3CCD camera*) acoplada a um microscópio óptico (*Olympus BX50*). Por meio dessas imagens, o número de LIE presentes em  $0,96\text{mm}^2$  de túnica mucosa de cada animal [12] foi quantificado utilizando-se o software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

#### Análise de parede intestinal

Os cortes corados em HE foram utilizados também para análise morfométrica da parede intestinal feita a partir de imagens capturadas por intermédio de uma câmera digital (*Pro series 3CCD camera*) acoplada a um microscópio óptico (*Olympus BX50*). Imagens capturadas na objetiva de 4x foram utilizadas para medir a largura e a altura dos vilos e das criptas. Imagens na objetiva de 10x foram utilizadas para a mensuração da tela submucosa e da túnica muscular. Imagens capturadas na objetiva de 4x também foram utilizadas para medir a espessura total da parede, tendo como base o início da túnica muscular até a base do vilos. Foram obtidas quatro imagens de cada um dos quatro cortes histológicos corados em HE sendo realizada uma medida de cada imagem obtida. Através do software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics) foram obtidas 16 medidas por animal, para cada parâmetro da parede intestinal avaliado.

#### Análise estatística

A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.3. Os testes foram definidos por meio do teste de normalidade D'Agostino-Pearson que verificou a distribuição dos dados. Todos os dados apresentaram distribuição normal, e por isso foram apresentados pela média  $\pm$  desvio



padrão e aplicados no teste de variância Anova-um critério seguido do pós teste T de Student. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## Resultados

Por meio da análise sorológica, foi possível verificar resultados positivos para a presença de anticorpos IgG contra *T. gondii* nos grupos G7d e G10d, enquanto que o GC permaneceu negativo para essa sorologia. Nos demais períodos experimentais, o pouco tempo de infecção não permitiu a detecção da soroconversão por meio da técnica utilizada.

Na mensuração dos vilos dos grupos infectados em comparação ao GC, a altura diminuiu no G12 e G10d ( $p < 0,05$ ), enquanto que a largura aumentou nos grupos infectados ( $p < 0,05$ ), com exceção ao G12. Observou-se também que a profundidade da cripta diminuiu no G6, aumentou no G72 e voltou a diminuir no G10d ( $p < 0,05$ ) em relação ao GC, enquanto que a largura da cripta aumentou em todos os grupos infectados ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

Nos enterócitos presentes nos vilos e nas criptas, a comparação com o GC demonstrou redução na altura dos enterócitos de todos os animais infectados, já na largura dos enterócitos houve redução somente no G7d ( $p < 0,05$ ). Já com o núcleo dos enterócitos, houve diminuição no maior diâmetro e aumento no menor diâmetro em todos os grupos infectados comparados ao controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Foi evidenciado um aumento significativo de células caliciformes marcadas pela técnica de PAS no G6, G12 e G7d, já nas técnicas de AB 1,0 e AB 2,5 o aumento foi observado no G7d e G10d, quando comparados com o GC ( $p < 0,05$ ) (Figura 2, Figura 3).

Na quantificação de LIE apenas o G48 demonstrou aumento significativo com relação ao GC ( $p < 0,05$ ). No entanto, é possível observar a partir de 12 horas de infecção, que nos grupos infectados houve maior porcentagem de ratos que apresentaram aumento do que

redução na contagem de LIE, tendo como parâmetro os valores da contagem de LIE dos animais do GC (Figura 4).

Na morfometria da parede intestinal, observou-se que a tela submucosa, a túnica muscular e a parede total demonstraram atrofia em todos os grupos infectados, quando comparados com o GC ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 5).

No intuito de sintetizar as alterações causadas pela infecção aguda por oocistos de *T. gondii* na parede intestinal e nas células epiteliais do duodeno de ratos Wistar, as mudanças observadas nas diferentes durações de infecção foram esquematizadas na Figura 6.

## **Discussão**

Esta pesquisa demonstrou que em diferentes durações de infecção aguda por *T. gondii* podem ocorrer mudanças morfológicas na parede e em células do epitélio do revestimento interno do duodeno de ratos Wistar. Os vilos são projeções no lúmen do intestino que possuem alta capacidade de absorção de moléculas e diversos tipos celulares com alta taxa de renovação celular [17]. Foi observada diminuição na altura dos vilos, que pode indicar uma redução na superfície de contato do epitélio com a luz intestinal como mecanismo de proteção, enquanto que o aumento da sua largura pode indicar a presença de um maior número de células de defesa na lâmina própria. No epitélio, a contagem de LIE demonstrou um aumento médio não significativo em todos os grupos infectados a partir do G12, sendo que o G48 mostrou aumento significativo com relação ao controle, revelando que houve maior migração de células de defesa para a mucosa dos ratos infectados.

O aumento na largura dos vilos dos animais infectados ainda pode ser explicado pelo surgimento de edema, que ocorre quando um hospedeiro entra em contato com um agente infeccioso dando início a um processo inflamatório agudo que resulta em aumento no fluxo

sanguíneo para a área injuriada, dilatação arteriolar e abertura dos leitos capilares, podendo levar ao acúmulo de líquido extravascular e conseqüentemente o edema local [18].

As criptas são como invaginações do revestimento epitelial que se encontram na base dos vilos [8]. O aumento na largura das criptas e as alterações na sua profundidade podem ser explicados pela possível necessidade de reequilíbrio do epitélio intestinal que pode ter sido lesado durante a transposição da barreira epitelial pelo protozoário. Também as células residentes na lâmina própria da mucosa intestinal são capazes de expressar uma resposta celular ou humoral na presença de um parasito, por isso o maior recrutamento e proliferação de células do sistema imune durante a infecção pode aumentar a largura desse estrato intestinal [19]. Sabe-se ainda que células de defesa são recrutadas para a lâmina própria situada na região baso-lateral das criptas intestinais por meio da ação de moléculas secretadas por enterócitos diante de uma recente infecção [20].

É possível observar que a resposta encontrada na morfometria dos vilos e das criptas demonstra proporcionalidade nos tempos de infecção, ou seja, com 6 horas de infecção ocorreu redução na profundidade das criptas, demonstrando menor capacidade de renovação celular, que foi percebida pela redução na altura dos vilos após 12 horas de infecção. Com 72 horas de infecção a altura das criptas aumentou e os vilos também se reestabeleceram. Após 10 dias de infecção a profundidade das criptas voltou a diminuir e o mesmo ocorreu neste período de infecção na altura dos vilos. Portanto, essa proporcionalidade na resposta morfológica da mucosa intestinal demonstra a necessidade de adaptação funcional do intestino diante da infecção pelo *T. gondii*, na tentativa de manter o equilíbrio das funções desempenhadas por este órgão.

Os enterócitos são as células mais numerosas do epitélio intestinal e possuem a função de absorver os nutrientes da alimentação [8]. A redução na altura dos enterócitos que ocorreu no presente estudo pode ser explicada como um mecanismo compensatório, já que

diminuindo a altura dos enterócitos as células do sistema imune presentes na lâmina própria alcançam o parasito mais facilmente. As alterações observadas nos enterócitos e seus núcleos podem ser uma representação da modificação no citoesqueleto que a presença do parasito causou nessas células de forma direta ou indireta. Sabe-se que quando os enterócitos são invadidos pelo parasito tendem a secretar moléculas citotóxicas, como o óxido nítrico, além de quimiocinas e citocinas que atraem leucócitos para o local da injúria, fatos que podem explicar as mudanças observadas nessas células [6].

Na infecção oral, os enterócitos são uma das primeiras células a serem invadidas pelo *T. gondii*, por meio das quais o parasito pode se replicar eficientemente. No entanto os enterócitos são células de curta duração, e o parasito precisa rapidamente atravessar a barreira epitelial para alcançar a circulação sistêmica [21]. Essas modificações nos enterócitos ainda podem ter ocorrido pela rápida invasão dos parasitos no duodeno, fato que leva a sua ampla disseminação pelo organismo. Em estudo com infecção causada por taquizoítos foi descrito que em apenas oito horas após a infecção esses parasitos podem ser encontrados tanto na superfície de células epiteliais, como entre dois enterócitos ou ainda alcançando a lâmina própria [22]. Outra pesquisa com inoculação de taquizoítos demonstrou que a infecção direta no duodeno permitiu a disseminação do *T. gondii* para órgãos sistêmicos em apenas seis dias após a infecção [23].

Resultados diferentes deste estudo foram encontrados no duodeno de gatos infectados pela cepa ME-49 por 40 dias [13], e no jejuno de suínos infectados pela cepa M7741 por 30 dias [24], onde foi observado aumento na altura dos enterócitos. Essa diferença na morfometria dos enterócitos em relação aos dados encontrados na literatura pode ser explicada pelo fato de que este é o primeiro estudo a investigar enterócitos em tempos de infecção aguda, e nos estudos em que ocorre a cronificação da infecção e a ausência de

parasitos na luz intestinal o epitélio pode se reestruturar, não demonstrando os mesmos achados deste experimento.

O muco presente no lúmen intestinal protege o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos, sendo principalmente constituído de glicoproteínas poliméricas chamadas de mucinas. As células AB-reativas secretam mucinas ácidas não-sulfatadas ou sialomucinas (pH 2,5) e sulfatadas ou sulfomucinas (pH 1,0), enquanto que as células PAS-reativas secretam mucinas neutras. O aumento nas três marcações de células caliciformes pode ter acontecido devido a necessidade de secreção de mucinas na tentativa de formar uma camada de muco mais espessa para proteger o epitélio da recente infecção [25].

As mucinas são produzidas pelas células caliciformes e sua reposição no epitélio intestinal ocorre no período de 6 a 12 horas por meio de moléculas recém-sintetizadas [26]. As mucinas neutras conferem maior densidade, enquanto que as mucinas ácidas conferem mais fluidez ao muco [27, 28]. O aumento de mucinas ácidas coradas pelas técnicas de AB 1,0 e AB 2,5 ocorreu com sete e 10 dias de infecção, o que pode contribuir para o amolecimento das fezes dos animais com o intuito de expulsar tardiamente o parasito do intestino. Nos períodos iniciais de infecção (6 e 12 horas) ocorreu aumento somente das mucinas neutras coradas pela técnica de PAS, a explicação pode ser pelo fato dessas mucinas deixarem o muco mais denso e assim conferirem mais proteção e lubrificação ao epitélio intestinal diante da recente infecção. Essas mudanças na função e na composição química do muco evidenciadas pelas alterações na contagem dos diferentes tipos de células caliciformes normalmente ocorrem como resposta a mudanças na microbiota e a presença de diversos patógenos irritantes ao intestino [29].

Além de enterócitos e LIE, as células caliciformes também podem ser invadidas pelo parasito [9], o que também pode explicar o aumento de células caliciformes no decorrer da infecção, já que muitas podem estar sendo usadas pelo parasito como via de entrada no

hospedeiro. Estudos no íleo [11] e no duodeno [12] de frangos infectados por 60 dias (cepa M7741) também observaram aumento no número de células caliciformes. Foi encontrado ainda aumento de células caliciformes em infecções por helmintos, do 3° ao 28° dia após a infecção [30].

Também foi observado um aumento significativo na contagem de LIE no G48. No entanto observou-se um aumento do número de LIE em boa parte dos animais dos grupos infectados a partir do G12. Sabe-se que os componentes da imunidade natural são os primeiros a agir quando um microrganismo invade uma barreira epitelial, sendo que fagócitos são recrutados para os locais de infecção nas primeiras 12 horas após a invasão. Já a imunidade adquirida, representada pela migração de diversos linfócitos se inicia após 12 horas de infecção e se intensifica no período de um a sete dias após a infecção [26]. Esse acúmulo de leucócitos na mucosa intestinal é a principal característica histopatológica que qualifica os processos infecciosos do sistema digestório, e os LIEs têm a resposta imunitária adequada, por possuírem características que facilitam suas funções, como sobrevivência seletiva, proliferação local e retenção de subpopulações no epitélio [31].

A associação entre o parasito e à resposta imune causa danos epiteliais, permitindo a desorganização das células da camada epitelial [6], fato observado neste estudo em que ocorreu modificações morfológicas em enterócitos e quantitativas em células caliciformes. Em estudo realizado em camundongos infectados com cistos de *T. gondii* foi demonstrado infiltração leucocitária na lâmina própria do intestino delgado após sete dias de infecção [32]. Já em pesquisa realizada no duodeno de gatos domésticos infectados por 40 dias com cistos teciduais de *T. gondii* (cepa ME-49) não foi observado aumento no número de LIE, possivelmente por se tratar de uma infecção crônica [13].

A tela submucosa é preenchida por tecido conjuntivo denso e abriga vários vasos sanguíneos e linfáticos, além dos neurônios do plexo submucoso [8]. A atrofia dessa camada

pode estar relacionada a uma possível alteração na morfofisiologia de neurônios submucosos. Resultados morfométricos diferentes foram encontrados no cólon de frangos infectados pelas cepas ME-49 e M7741 por 60 dias, nos quais se observou hipertrofia da tela submucosa [14]. No entanto, nos estudos citados, o inóculo, a forma de vida, a cepa do parasito ou a duração da infecção eram diferentes dos utilizados no presente estudo, e cistos teciduais foram observados neste estrato da parede intestinal [14]. Durante a infecção aguda investigada neste estudo não foram observados cistos teciduais na tela submucosa nem em outro estrato da parede duodenal.

Neste estudo, observou-se a atrofia da túnica muscular dos animais infectados, o que pode ser interpretado como uma hipoplasia ou atrofia de células musculares lisas. A túnica muscular possui grande importância imunológica, por possuir uma extensa rede de macrófagos e alguns leucócitos residentes, que podem provocar um estado de hipercontratibilidade nas células musculares lisas resultando em aumento do peristaltismo e expulsão dos parasitos [33]. Em gatos domésticos infectados (cepa ME-49) por 40 dias também ocorreu atrofia da túnica muscular do duodeno [13], enquanto que no íleo de frangos infectados (cepa ME-49) por 60 dias observou-se aumento deste estrato [11].

Ainda foi observada atrofia da espessura total da parede nos animais infectados, possivelmente em decorrência do processo inflamatório induzido pela infecção. Sabe-se que durante uma inflamação as células da parede intestinal aumentam sua interação com as do sistema imune e sua exposição às citocinas, o que pode alterar seu metabolismo deixando-as hiper ou hipotróficas [34] com consequente modificação nas funções do órgão. Redução da espessura da parede intestinal também foi encontrada no íleo [11] e no duodeno [12] de frangos infectados pelo *T. gondii* (cepa M7741) por 60 dias.

Em síntese, conclui-se que a infecção aguda por oocistos de *T. gondii* provoca diminuição na altura dos vilos e na profundidade das criptas com aumento da largura de

ambos em alguns períodos de infecção, ainda reduz a altura dos enterócitos e do maior diâmetro dos seus núcleos nos grupos infectados, aumenta o número de células caliciformes que secretam mucinas neutras no início da infecção e as que secretam mucinas ácidas com 7 e 10 dias de infecção, causa aumento de LIEs após 48 horas de infecção, além de causar atrofia da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total em todos os animais infectados. Portanto, a infecção aguda por *T. gondii*, caracterizada pela invasão do parasito, causa modificações no duodeno de ratos Wistar proporcionais aos tempos de infecção, como tentativa do órgão de impedir a invasão do parasito e manter um equilíbrio das funções do intestino. O resultado dessas mudanças morfológicas pode alterar o desempenho intestinal, todavia essa infecção é subclínica e neste estudo nenhuma alteração funcional foi observada, como por exemplo, prejuízo na digestão e absorção de nutrientes ou presença de diarreia.



## Referências

1. Dubey JP. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol.* 1998;74:75-77.
2. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:634-640.
3. Ferreira UM, Foronda AS, Schumaker TTS. *Fundamentos biológicos da parasitologia humana.* São Paulo, SP: Malone; 2003.
4. Weiss L, Kim K. *Toxoplasma gondii: The model apicomplexan. Perspectives and methods alterations in Host-Cell Biology due to Toxoplasma gondii.* Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2007.
5. Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de Medicina interna veterinária: Enfermedades del perro y el gato.* Madrid: Elseve; 1997.
6. Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* 2006;22:448-452.
7. Furness JB. *The enteric nervous system.* New York, NY: Churchill Livingstone; 2006.
8. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em cores.* Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2003.
9. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of early stages for infection in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitol.* 1998;116:35-42.
10. Wingstrand A, Lind P, Haugegaard J, Henriksen SA, Bille-Hansen V, Sorensen V. Clinical observation, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii.* *Vet Parasitol.* 1997;72:129-140.

11. Shiraishi CS, Azevedo JF, Silva AV, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. Análise morfológica da parede intestinal de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. *Ciênc Rur*. 2009;39:2146-2153.
12. Bonapaz RS, Hermes-Uliana C, Santos FN, Da Silva AV, Almeida EJ, Sant'Ana DMG. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). *Pesq Rev Bras*. 2010;30:787-792.
13. Silva JM, Silva AV, Araújo EJA, Sant'Ana DMG. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19:55-61.
14. Braga CF, Silva AV, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63:340-347.
15. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method of increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11:562-568.
16. Vivas LAM, Jamel N, Refinetti RA, et al. Anesthetic experimental device for small animal. *Ac Círg Bras*. 2007;22:229-233.
17. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2008.
18. Abbas AK, Kumar V, Mitchell RN. *Fundamentos de Patologia – Robbins & Cotran*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2012.
19. Ferreira GLS, Mineo JR, Oliveira JG, Ferro EAV, Souza MA, Santos AAD. *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions in vivo and in vitro: Experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Microb and Infect*. 2004;6:172-181.

20. Kasper L, Courret N, Darche S, et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol.* 2004;34:401-409.
21. Dunay IR, Sibley LD. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:461-466.
22. Ma XM, Meng XL, Yin GR, Liu HL, Shen JY. Dynamic observation of attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to intestinal mucosa in BALB/c mice by chromogenic in situ hybridization targeting SAG2 mRNA. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2008;26:272-276.
23. Shin EH, Chun YS, Kim WH, Kim JL, Pyo KH, Chai JY. Immune Responses of Mice Intraduodenally Infected with *Toxoplasma gondii* KI-1 Tachyzoites. *Korean J Parasitol.* 2011;49:115-123.
24. Da Silva PC, Shiraiishi CS, Silva AV, Gonçalves GF, Sant'Ana DMG, Araújo EJ. *Toxoplasma gondii*: morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Exp Parasitol.* 2010;125:380-383.
25. Myers BM. Carbohydrates. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* Philadelphia: Elsevier; 2008:161-187.
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai. *Imunologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2008.
27. Beamish, RJ. Lethal pH for white sucker *Catostomus comersoni* (Lacépède). *Transact Am Fish Societ.* 1972;101:335-358.
28. Zieske JD, Bernstein IA. Modification of cell surface glycoprotein: addition of fucosyl residues during epidermal differentiation. *J Cell Biol.* 1982;95:626-631.
29. Moal VL, Servin A. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:315-337.

30. Knight PA, Brown JK, Pemberton AD. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* 2008;135:655-670.
31. Elia CCS, Souza HSP. *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito*. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu; 2001.
32. Mennechet FJD, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina Propria CD4+ T Lymphocytes Synergize with Murine Intestinal Epithelial Cells to Enhance Proinflammatory Response Against an Intracellular Pathogen. *J Immunol.* 2002;168:2988-2996.
33. Bauer AJ. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol Mot.* 2008;20:81-90.
34. Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16:133-136.

**Tabela 1** Altura e largura de enterócitos e maior e menor diâmetro de seus núcleos presentes na mucosa intestinal de animais do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela técnica de HE.

Grupos	Enterócito		Núcleo do Enterócito	
	Altura ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Maior Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Menor Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
<b>GC</b>	22,31 $\pm$ 4,15 <sup>a</sup>	7,80 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	9,82 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	6,78 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
<b>G6</b>	17,15 $\pm$ 3,80 <sup>ab</sup>	7,79 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	6,73 $\pm$ 1,44 <sup>ab</sup>	8,69 $\pm$ 1,82 <sup>ab</sup>
<b>G12</b>	19,64 $\pm$ 3,18 <sup>abc</sup>	7,84 $\pm$ 1,43 <sup>c</sup>	6,46 $\pm$ 1,04 <sup>ac</sup>	9,22 $\pm$ 1,73 <sup>ac</sup>
<b>G24</b>	16,03 $\pm$ 2,87 <sup>acd</sup>	7,40 $\pm$ 1,41 <sup>d</sup>	6,15 $\pm$ 1,27 <sup>abd</sup>	8,27 $\pm$ 1,75 <sup>acd</sup>
<b>G48</b>	15,02 $\pm$ 2,65 <sup>abce</sup>	7,57 $\pm$ 1,51 <sup>e</sup>	6,50 $\pm$ 1,27 <sup>ae</sup>	7,70 $\pm$ 1,72 <sup>abcde</sup>
<b>G72</b>	17,57 $\pm$ 4,08 <sup>aef</sup>	7,76 $\pm$ 1,13 <sup>f</sup>	6,51 $\pm$ 1,23 <sup>af</sup>	8,53 $\pm$ 1,76 <sup>acef</sup>
<b>G7d</b>	16,35 $\pm$ 2,20 <sup>acg</sup>	7,33 $\pm$ 1,39 <sup>abcfg</sup>	6,16 $\pm$ 1,29 <sup>abg</sup>	7,92 $\pm$ 1,36 <sup>abcfg</sup>
<b>G10d</b>	19,20 $\pm$ 2,80 <sup>adeg</sup>	8,16 $\pm$ 1,45 <sup>defg</sup>	6,74 $\pm$ 1,69 <sup>adg</sup>	9,19 $\pm$ 1,73 <sup>adefg</sup>

Média  $\pm$  desvio padrão seguidas de letras iguais numa mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância ANOVA, teste *t*.

**Tabela 2 Morfometria da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela coloração de HE.**

<b>Grupos</b>	<b>Parede Total</b>	<b>Túnica Muscular</b>	<b>Tela Submucosa</b>
<b>GC</b>	300,54 ± 52,84 <sup>a</sup>	112,18 ± 22,25 <sup>a</sup>	56,92 ± 10,14 <sup>a</sup>
<b>G6</b>	250,28 ± 34,43 <sup>ab</sup>	79,35 ± 12,24 <sup>ab</sup>	40,85 ± 8,21 <sup>ab</sup>
<b>G12</b>	220,26 ± 30,96 <sup>abc</sup>	65,25 ± 7,44 <sup>abc</sup>	30,99 ± 2,01 <sup>abc</sup>
<b>G24</b>	266,52 ± 32,13 <sup>acd</sup>	68,97 ± 9,30 <sup>ad</sup>	39,34 ± 7,93 <sup>ad</sup>
<b>G48</b>	226,03 ± 35,09 <sup>ade</sup>	53,88 ± 10,29 <sup>abcde</sup>	28,23 ± 4,71 <sup>abde</sup>
<b>G72</b>	286,05 ± 46,89 <sup>abcef</sup>	78,06 ± 12,50 <sup>acef</sup>	45,09 ± 10,42 <sup>acef</sup>
<b>G7d</b>	246,34 ± 43,10 <sup>afg</sup>	51,27 ± 10,55 <sup>abcdfg</sup>	26,87 ± 5,53 <sup>abdfg</sup>
<b>G10d</b>	212,65 ± 25,57 <sup>abdfg</sup>	55,58 ± 6,68 <sup>abdf</sup>	28,22 ± 4,14 <sup>abdf</sup>

Média ± desvio padrão seguidas de letras iguais numa mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância ANOVA, teste *t*.

**Figura 1** Altura e largura dos vilos e profundidade e largura das criptas do duodeno de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*, evidenciados pela coloração de HE. A diferença estatística com o GC é representada pelo \* ( $p < 0,05$ ).

**Figura 2** Número de células caliciformes evidenciadas pelas técnicas de PAS, AB 1,0 e AB 2,5 presentes em  $0,96\text{mm}^2$  de mucosa intestinal dos animais do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*. A diferença estatística com o GC é representada pelo \* ( $p < 0,05$ ).

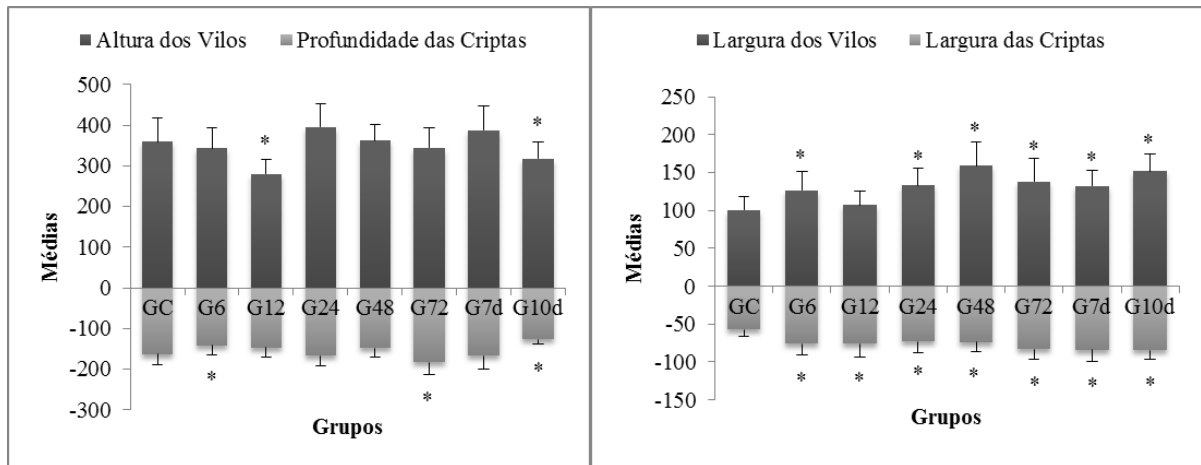
**Figura 3** Micrografia de cortes transversais do duodeno de ratos do GC, G6, G12, G7d e G10d. As setas pretas demonstram células caliciformes coradas por PAS, as setas azuis coradas por AB 1,0 e as setas vermelhas as coradas por AB 2,5, sendo possível observar aumento dessas células caliciformes nos grupos infectados demonstrados. Aumento de 200x. Barra:  $30\mu\text{m}$ .

**Figura 4** Porcentagem de animais nos grupos infectados por *T. gondii* que apresentaram redução e aumento na contagem de LIE em relação aos valores da contagem do GC, evidenciados pela coloração de HE.

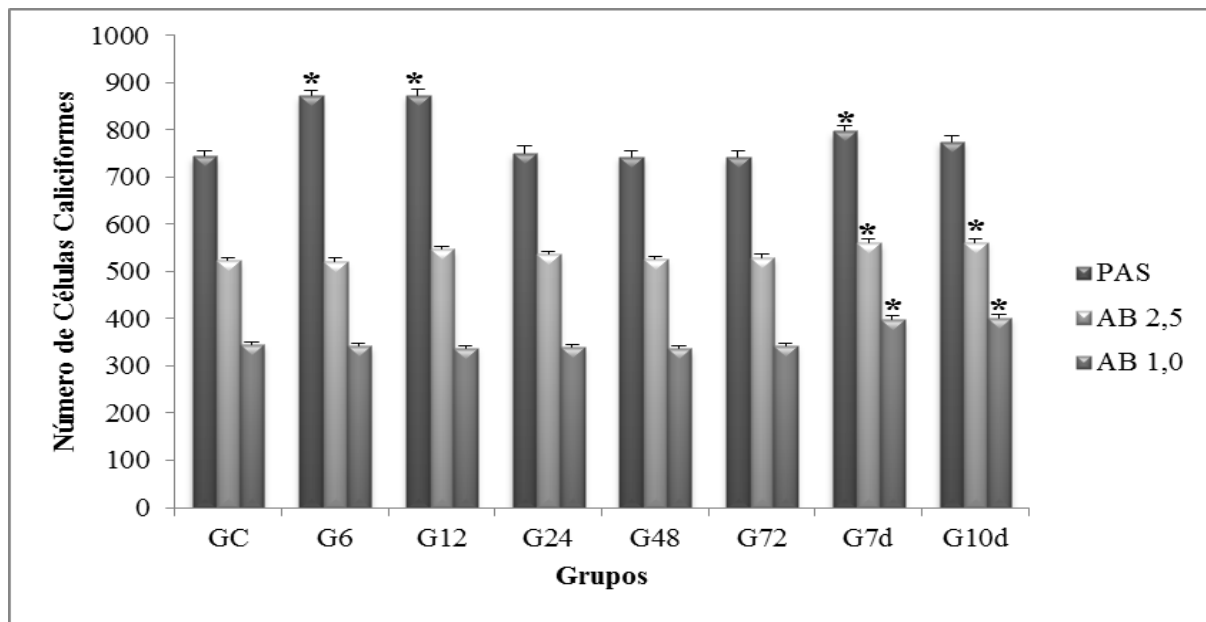
**Figura 5** Micrografia de cortes transversais do duodeno de ratos do GC e de grupos infectados por *T. gondii* (G6, G12, G24, G48, G72, G7d e G10d), corados por HE. As setas vermelhas demonstram a espessura da tela submucosa e as setas pretas à espessura da túnica muscular, demonstrando atrofia dessas túnicas nos grupos infectados. Aumento de 100x, Barra:  $50\mu\text{m}$ .

**Figura 6** Esquematização das mudanças observadas na parede intestinal e nas células epiteliais de ratos do GC e dos grupos infectados por *T. gondii*.

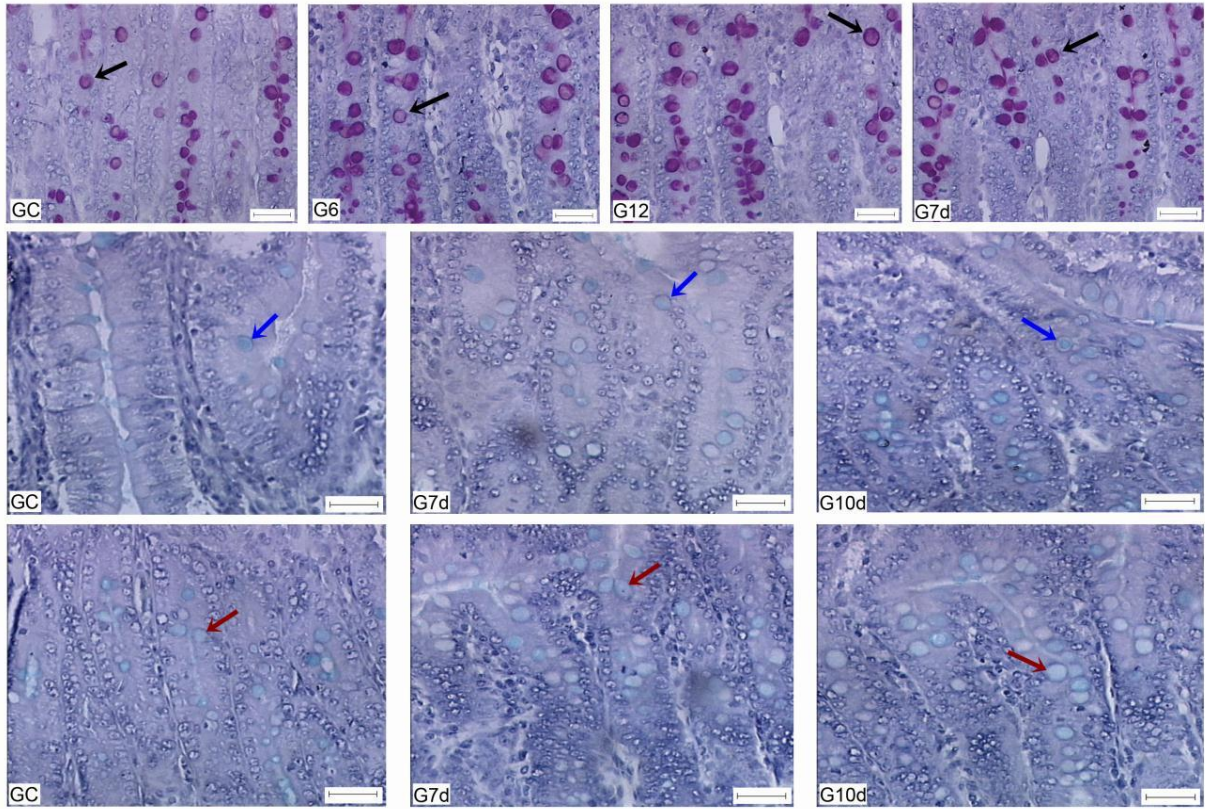




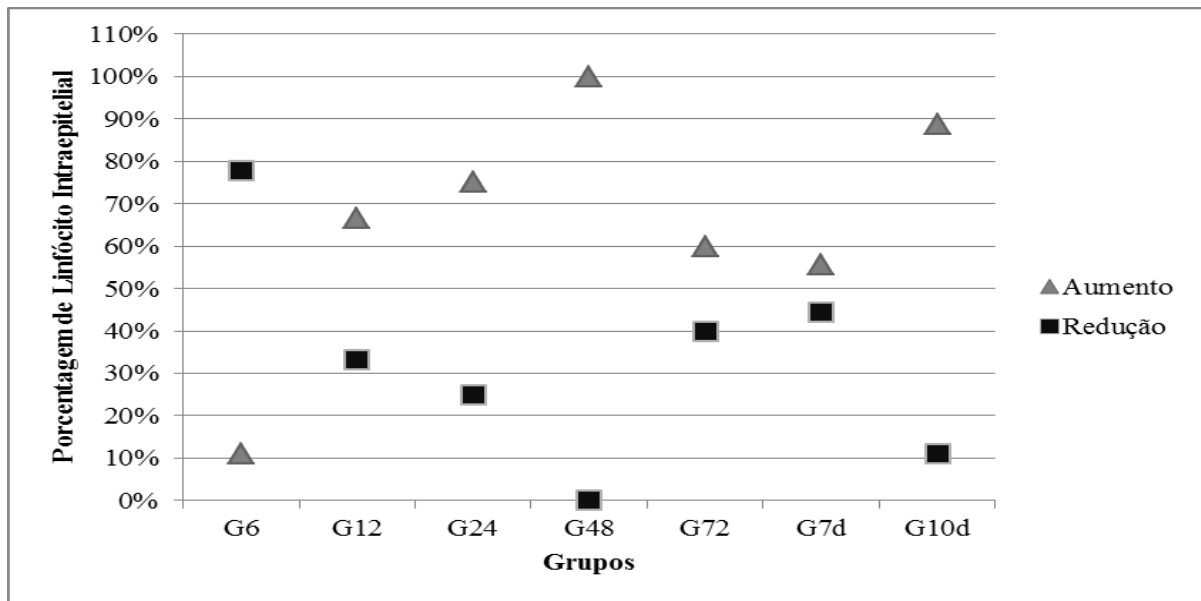
**Figura 1**



**Figura 2**

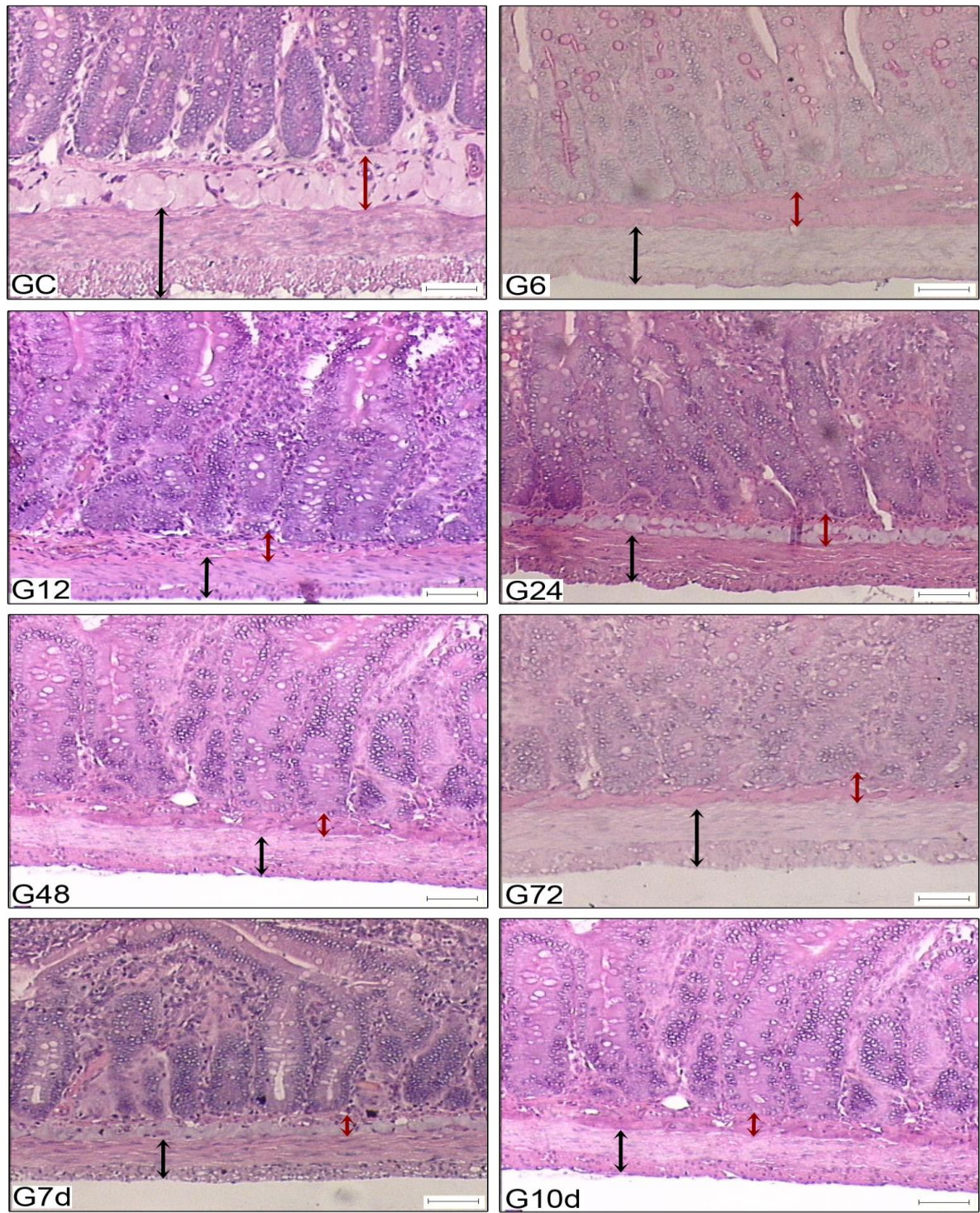


**Figura 3**

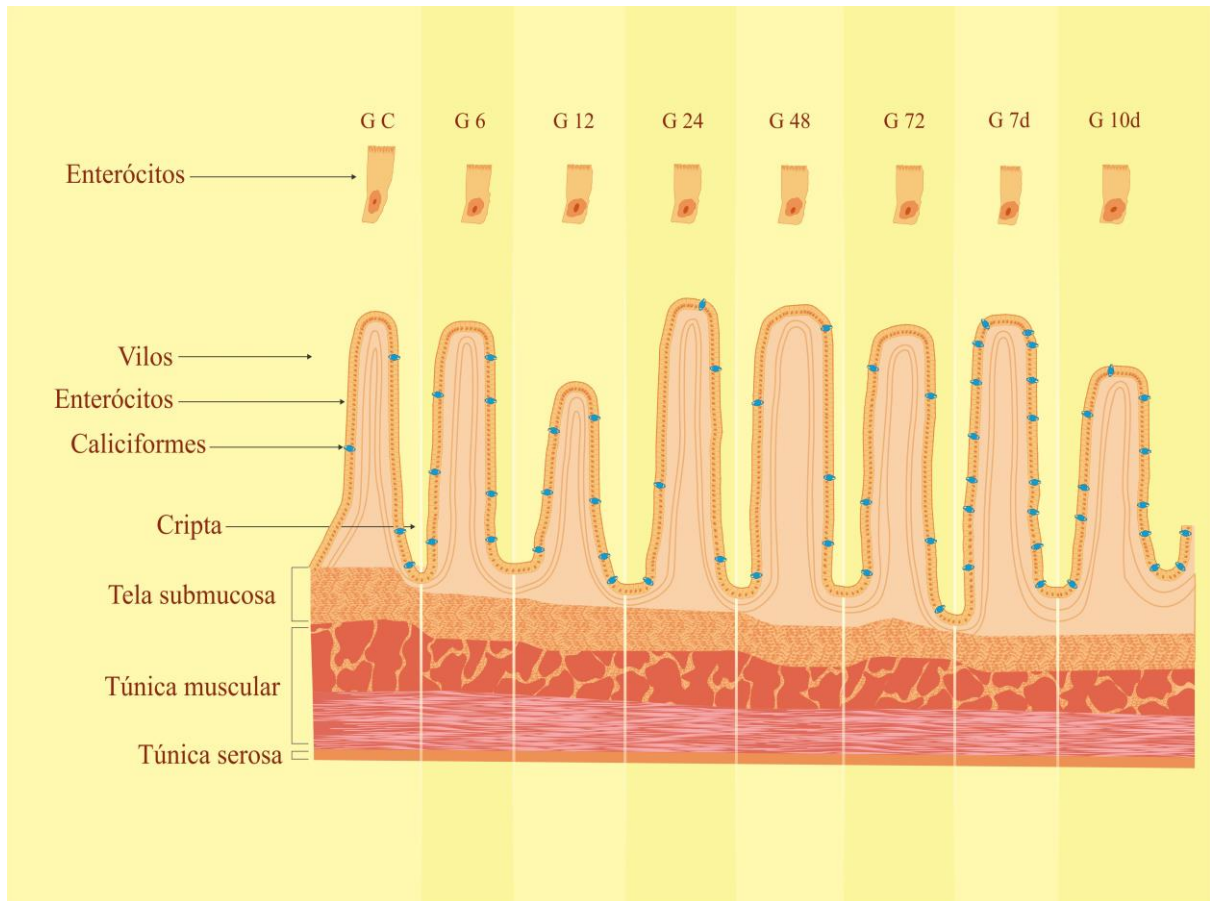


**Figura 4**





**Figura 5**



**Figura 6**

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Conclui-se que a infecção oral por oocistos de *T. gondii* provoca alterações no duodeno de ratos Wistar nos diferentes tempos de infecção aguda, observando-se diminuição na altura dos vilos e na profundidade das criptas com aumento da largura de ambos em alguns períodos de infecção, redução na altura dos enterócitos e no maior diâmetro de seus núcleos nos grupos infectados, aumento no número de células caliciformes que secretam mucinas neutras no início da infecção e as que secretam mucinas ácidas com sete e dez dias de infecção, aumento de LIEs após 48 horas de infecção, além de causar atrofia da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total.

As alterações ocorridas foram proporcionais aos tempos de infecção e as modificações observadas demonstram a tentativa do órgão de impedir a invasão do parasito, no entanto o resultado dessas mudanças morfológicas e quantitativas podem influenciar nas funções exercidas por essas estruturas no trato gastrointestinal. Essas modificações podem ser sentidas no desempenho das funções normais do duodeno, tais como dificuldade na função peristáltica que encaminha o alimento pelos segmentos intestinais, maior ou menor cobertura de muco facilitando lesões na mucosa ou dificultando a absorção intestinal, alteração na barreira imune intestinal que leva a lesões por meio de infecções oportunistas, ou ainda dificuldade na absorção de nutrientes, decorrente das alterações estruturais dos vilos, das criptas e dos enterócitos.

### PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente a resultados tão relevantes obtidos no estudo morfológico do duodeno de ratos infectados por diferentes tempos de infecção aguda, faz-se necessário compreender os mecanismos que explicam essas alterações. Para isso será importante:

- Realizar análise dos neurônios presentes no plexo submucoso e no plexo mientérico do duodeno de ratos infectados, para observar possíveis alterações na população neuronal.
- Avaliar as Células da Glia Entérica (CGEs) presentes nos dois plexos ganglionados do duodeno, no intuito de conhecer a resposta dessas células frente à infecção toxoplásmica.
- Proceder à contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos em cada período de infecção.

- Promover a análise das células de Paneth presentes nas criptas e que são importantes na defesa da mucosa.

- Analisar alterações na distribuição de fibras colágenas na parede intestinal durante as diferentes durações de infecção aguda.

- Realizar a dosagem indireta de Óxido Nítrico, assim como de citocinas envolvidas na infecção por *T. gondii*.

- Realizar testes de digestibilidade do alimento ingerido e de absorção de nutrientes no duodeno para se averiguar se estas funções estão sendo comprometidas pela infecção.

- Verificar se o potencial de secreção no lúmen intestinal e a capacidade motora do duodeno estão sendo comprometidos pela infecção.



## **ANEXOS**



Parecer emitido após reunião realizada em: 27/6 /2013

Parecer nº 079/2013

Pesquisador: Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana

Setor: DCM

Título:

Protocolo nº 013/2013

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

Entrada: 19/3/2013

Início: 1/7/2013

Término: 31/7/2015

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .**

**Considerações e Parecer:**

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

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

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

[Home](#)
[Assuntos](#)
[My Springer](#)
[Serviços](#)
[Publicações](#)
[Shop](#)
[Sobre nós](#)

## Internal Medicine

[Início](#) > [Medicina](#) > [Internal Medicine](#)
[SUBDISCIPLINAS](#)
[PERIÓDICOS](#)
[LIVROS](#)
[SÉRIES DE LIVROS](#)
[LIVROS DE TEXTO](#)
[REFERÊNCIA](#)


## Digestive Diseases and Sciences

 Editor-in-Chief: Jonathan **Kaunitz**

 Managing Editor: Meghan **Keeffe**

ISSN: 0163-2116 (print version)

ISSN: 1573-2568 (electronic version)

Journal no. 10620


[RECOMMEND TO LIBRARIAN](#)
[AdvanceElite](#)

### Related Searches


[Electronic Books](#)
[Organic Chemistry](#)
[Very Large Telescope](#)
[Physical Organic Chemistry](#)
[Rational Numbers](#)
[New Single Family Homes](#)
[Cheap Cruises](#)

 Like 

 Tweet 

 g+1 
[ABOUT THIS JOURNAL](#)
[EDITORIAL BOARD](#)
[NEWS](#)
[SOCIETY](#)
[INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

## Instructions for Authors

Digestive Diseases and Sciences

### CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

Digestive Diseases and Sciences publishes peer-reviewed basic and clinical studies and special articles on all aspects of gastroenterology and hepatology and related fields. The editors will consider and publish the following categories of manuscripts:

- Original Articles: basic or clinic research.
- Reviews (including systematic reviews and meta-analyses): basic or clinical topics.
- Special Category Articles: such as meeting reports (per approval of the editor-in-chief), comments on medical policy, or opinion pieces.
- Case Reports: in general, case reports are not encouraged; the editors will limit the number of case reports per issue and will only consider particularly novel and important clinical observations.
- Editorials: comment on papers published elsewhere in the issue and solicited by the editor-in-chief, and occasional special topics or announcements from the editors.
- Correspondence: concise opinions on papers published in Digestive Diseases and Science online within the past six months. In special circumstances, free-standing concise correspondence related to a unique clinical experience will be considered.
- Stanford Multidisciplinary Seminars: specifically allocated for the Stanford Multidisciplinary Seminars submitted by authors from Stanford and coordinated by the editor for this series.
- Industry Sponsored Articles and Reviews: provided that the relationship is clearly stated in the manuscript, editors will consider industry sponsored articles and reviews.

- **DDS New Digestive Science:** a forum for presenting exciting new basic science or clinical research findings that are important and novel, warranting early communication in brief. Findings presented in this format must be robust, innovative, and eventually important to medical practice.
- **Medical Education and Practice:** Scientific articles that focus on medical education or on common facets of medical practice.

Manuscripts should be concise, well organized, and clearly written. Acceptance of manuscripts will be based on originality and importance to the field of digestive diseases. Submitted manuscripts are reviewed by the editor-in-chief and associate editors and, in the majority of cases, by two or more experts in the field. The editors can choose to reject a manuscript without peer review if the manuscript is of insufficient quality or relevance to warrant acceptance. Manuscripts based on or those describing the experimental or therapeutic use of complex mixtures of chemically undefined substances such as plant-derived extracts will be returned without further review. The editors reserve the right to reject poorly written manuscripts even if their scientific content is potentially suitable for publication. Authors are responsible for the use of grammatically correct English. Springer reserves the right to copy edit accepted manuscripts. Proofs will be sent to the corresponding author for final approval, and must be returned within 48 hours of receipt.

### ETHICS AND DISCLOSURE POLICIES

Material submitted to Digestive Diseases and Sciences (DDS) must be original and not published or submitted for publication elsewhere. Meeting abstracts do not constitute prior publication. Authors who have related material under consideration or in press elsewhere should upload a clearly marked copy at the time of their submission to DDS. If part of a contribution has appeared or will appear elsewhere in press, the author must specify the details in the covering letter accompanying the DDS submission. Duplicate publication (by the same author) and plagiarism (by a different author) must be avoided in accordance with "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" developed by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>). Each author must have participated substantially in the work and approve the final version of the manuscript. Where applicable, the following must be disclosed: all financial arrangements (research support, stock ownerships, equity interest, consultancies, or major honoraria) with a company whose product figures prominently in the manuscript; a statement of specific funding support; and identification of third party individuals who provided writing assistance. Reports of clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The clinical trial registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section.

<http://dds.edmgr.com>

### INVESTIGATIONS INVOLVING HUMAN SUBJECTS

The journal requires that investigations performed on human subjects have the prior approval of the appropriate institutional or other independent ethics committee on human experimentation. This attestation should appear in the methods section of the manuscript. In countries where such mechanisms for approval do not exist, authors are required to indicate that the research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A similar assurance is required to document that animal experimentation was performed under appropriate circumstances.

### SUBMISSION

Manuscripts should be submitted online using Springer's manuscript submission and review system, Editorial Manager, at <http://dds.edmgr.com>. Editorial Manager supports a wide range of submission file formats:

- Manuscripts: Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX
- Figures: TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript (Color art is FREE for both online and print publication!)

(Please note that PDF is not an acceptable file format for manuscripts or figures.)

Manuscript submission requires the uploading of at least one manuscript file (including references), but a cover letter, figures, figure legends, and tables may also be uploaded as separate files. Files should ideally be posted in the following order (order can be changed after uploading):

1. Cover letter
2. Manuscript
3. Tables
4. Figure legends (if separate)
5. Figures
6. Other

For all article types except correspondence and editorials, submission also requires the suggestion of four to six peer reviewers (experts in the topic area of the manuscript and not recent collaborators or from the same institution as the author[s]), including name, department, institution, and email address.

Once the manuscript is uploaded to Editorial Manager, the corresponding author will receive an email requesting approval of the PDF created from the source files. If not done immediately following upload, it is important to review and approve the PDF to initiate review by the editors.

Should any difficulties arise while submitting manuscripts online, please contact the responsible editorial assistant by clicking "Contact Us" in the Editorial Manager toolbar at the top of each page. Once submitted, a manuscript's progress through the review process may be tracked in real time.

## MANUSCRIPT STYLE

- Text should conform to accepted standards of American English style and usage. Before submitting an article to DDS, authors for whom English is a second language are encouraged to have their manuscripts reviewed and professionally edited by an individual whose native language is English.
- All manuscripts should be typed in 12-point font size and double-spaced with 1-inch margins. One space only should be used after periods and commas. Authors should retain a copy of all materials.
- The manuscript, if an original article, should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Keywords, Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figure Legends, and Figures.
- The title page should include the title of the article, name(s) of author(s) and highest academic degree(s), department and institution from which the work originated, email and postal addresses of all authors, name of the corresponding author, acknowledgment of grant support, and disclosure of financial arrangements related to the research or assistance with manuscript preparation. Personal acknowledgments, if any, should be given in a separate section at the end of the article.
- Titles should state the main findings of the article, not focus on design of the research, and should not exceed 120 characters in length. Do not use abbreviations in titles.
- Authors of original articles should submit a structured abstract of no more than 250 words organized as applicable into the following categories: Background, Aims, Methods, Results, and Conclusions. Review articles should include a general abstract (i.e., the above categories are not required) also of no more than 250 words. Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations such as HCV, GERD, etc. Case reports should not include an abstract, though a short introduction as well as a brief discussion highlighting the key lessons from the case are both welcome.
- A list of four to six keywords should be provided directly below the abstract and for case reports, on the title page. Keywords should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes and should preferably be terms from the Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH) list.
- Editorials are invited by the editor and should be no longer than 1,500 words. Editorials should not have an abstract. The total number of references should be limited to a maximum of 10. Authors are encouraged to include a table or figure.
- Correspondence should be limited to 500 words and should relate to papers published in DDS within the past six months.
- Case reports should not exceed 600 words and should not include an abstract or more than ten references. Case reports should ideally include a short introduction and brief discussion, the latter highlighting key lessons from the case. There is no maximum word count or number of references (or figures) for case series including several cases or for all other manuscript types. (Case series can be submitted as article type Case Report or Original Article, depending in part

on the number of cases being reported.)

- DDS New Digestive Science articles should be limited to 2,000 words, including an abstract of less than 250 words, and should include no more than a total of 3 tables and figures and fewer than 25 references. These submissions will be reviewed in standard fashion, but if accepted, the journal will ensure rapid online and expedited print publication.
- In the body of the manuscript, the ethical guidelines followed should be identified and the statistical methods employed should be outlined. When describing results, report P values and/or confidence intervals. Only standard abbreviations should be used and identified with first usage. Generic names of drugs should be used, although the brand name may be inserted in parentheses.
- Tables should be double-spaced on separate pages, with the table number and table title centered above the table and explanatory notes below the table.
- The figure title and caption material should appear in the legend and not on the figure. Legends should be typed double-spaced on pages separate from the text. Figures should be numbered in one consecutive series in the order in which they are cited in the text. Please include sufficient information in the legends to interpret the figures without reference to the text.
- Illustrations should be clear, with sharp contrast, especially where fine lines such as those of grids or traces are to be retained. Illustrations should be no larger than 8½ × 11 inches, but preferably of a size not needing enlargement or reduction. Non-traceable (raster) line-art and photographs should ideally be provided as TIFFs of at least 600 dpi resolution. Please provide traceable (vector) figures in EPS format. Halftone photographs should be provided as TIFFs of at least 200 dpi resolution.
- References should be cited in the text by Arabic numerals enclosed in square brackets. Only literature that is published or in press (with the name of the journal) may be numbered and listed. Abstracts and letters to the editor may also be cited, but should ideally be less than three years old and identified as such after the title, e.g., [Abstract] or [Letter to Editor]. The references section should be typed double-spaced on pages separate from the text and numbered consecutively in the order in which references are cited in text. Included are last names and initials of authors, title of article, name of publication, year published, volume, and inclusive pages. For references with more than six authors, the fourth and subsequent authors should be replaced with "et al."; for references with between one and six authors all the authors should be listed. Abbreviations should conform to those used in Index Medicus. References must be verified by the authors against original documents. We recommend the use of tools such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. The style and punctuation of the references conform to the following examples (text enclosed in [ ] symbols below, should be italicized in the manuscript):

Article:

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch–anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. [ ]*Dig Dis Sci*[ ]. 1995;40:1471–1483.

Book:

Banks PA. [ ]*Pancreatitis*[ ]. New York, NY: Plenum Medical; 1979.

Contribution to a Book:

Creutzfeldt W. Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Wellmann KF, eds. [ ]*The Diabetic Pancreas*[ ]. New York, NY: Plenum Medical; 1977:551–590.

Electronic:

ISI Web of Knowledge. Journal Citation Reports, 2007 JCR Science Edition. Available at: <http://isiwebofknowledge.com>. Accessed June 20, 2008.

For authors using EndNote, an output style is available that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 1 kB)

## COPYRIGHT

Submission of a manuscript to Digestive Diseases and Sciences is a representation that the manuscript has not been published previously in any form, including symposia and proceedings of meeting, except in brief abstract form, and is not currently under consideration for publication elsewhere. Once a manuscript is accepted by the editorial office, authors (or their employers, if they hold the copyright) must sign a statement transferring copyright to Springer

Science+Business Media, Inc., before the manuscript can be officially accepted for publication. Authors will receive the statement via email from the production editor; they need not provide a copyright transfer at manuscript submission. Such a written transfer, which previously was assumed to be implicit in the act of submitting a manuscript, is necessary under the U.S. Copyright Law in order for the publisher to carry through the dissemination of research results and reviews as widely and effectively as possible.

### SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition, is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit <http://www.springeronline.com/openchoice> to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

<http://www.springeronline.com/openchoice/>

### ABBREVIATION

The correct abbreviation of Digestive Diseases and Sciences for abstracting and indexing purposes is: Dig. Dis. Sci. or Dig Dis Sci.

### ISSN AND EISSN

The international standard serial number (ISSN) for Digestive Diseases and Sciences is 0163-2116, and the electronic international standard serial number (EISSN) is 1573-2568.

### DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz English editing for scientists

### For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

### For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

### For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다

니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

## INQUIRIES

All inquiries should be addressed to the editor-in-chief or to the managing editor, preferably by email:

Editor-in-Chief

Jonathan D. Kaunitz, MD, FACP, AGAF

UCLA School of Medicine

Bldg. 114, 217E

West Los Angeles VAMC

Los Angeles, CA 90073

Managing Editor

Meghan Keeffe

Email: [dds.journal@gmail.com](mailto:dds.journal@gmail.com)

Fax: 415-383-8428

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

INFORMED CONSENT

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

[Online First Articles](#)

[All volumes & issues](#)

FOR AUTHORS AND EDITORS

2013 Impact Factor

**2.550**

[Aims and Scope](#)

[Submit Online](#)

[Open Choice - Your Way to Open Access](#)

[Instructions for Authors](#)

[Author Academy: Training for Authors](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

[Contacts](#)

[Download Product Flyer](#)

[Shipping dates](#)

[Order back issues](#)

[Pharma Reprints](#)

[Bulk Orders](#)



[Advertising Rate Card 2013 \(pdf, 299 kB\)...](#)

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in [Digestive Diseases and Sciences](#).

Your E-Mail Address

SUBMIT

Please send me information on new Springer publications in [Gastroenterology](#).

