

# ALTERAÇÃO POPULACIONAL DE CÉLULAS NA CAMADA INTRAEPITELIAL E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA PAREDE INTESTINAL CAUSADA PELA INFECÇÃO POR *Toxocara vitulorum* EM BEZERROS BÚFALOS (*Bubalus Bubalis*)

MARIA FRANCISCA NEVES<sup>1</sup>; WILMA A. STARKE-BUZETTI<sup>2</sup>

**ABSTRACT:-** NEVES, M.F.; STARKE-BUZETTI, W.A. [Populational alteration of cells in the intestinal intraepithelial layer and morphological changes of the intestinal wall elicited by *Toxocara vitulorum* infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*)]. Alteração populacional de células na camada intraepitelial e alterações morfológicas da parede intestinal causada pela infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos (*Bubalus Bubalis*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 4, p. 133-140, 2005. Departamento de Biologia e Zootecnia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), Campus de Ilha Solteira, Av. Brasil n. 56, Centro, Ilha Solteira, SP, 15385-000, Brasil. E-mail: starke@bio.feis.unesp.br

To understand the development of the inflammatory responses in the wall of the gut, during the process of expulsion of the parasites from the host, samples of tissues were removed from the small intestines from four groups of naturally infected buffalo calves with *Toxocara vitulorum* during the beginning of the infection, at the peak of egg output, during the period of expulsion and post-expulsion of the worms, as well as from uninfected calves. Cells (mast cells, eosinophils, intraepithelial lymphocytes - IEL and goblet cells) present in the epithelial layer (intraepithelial) of the small intestine were counted. In the duodenum, jejunum and ileum, the population of mast cells, eosinophils and lymphocytes increased significantly during the peak of the infection. Goblet cell numbers increased also during the beginning and at the peak of the infection. The decline of the number of these cells occurred during the periods of expulsion of the worms reaching to uninfected control counts at the post-expulsion period indicating a role of these cells in the process of expulsion of *T. vitulorum* by the buffalo calves. The layers of the intestinal wall (villus, crypt, submucosa and muscular) were also measured. Morphological examinations showed a significant villar atrophy, particularly in the duodenum during the beginning, peak and during the period of expulsion of the worms, but smooth muscle hypertrophy or other alteration was not observed in any period of the infection.

**KEY WORDS:** *Toxocara vitulorum*, buffalo, inflammatory cells, morphological changes.

## RESUMO

Para estudar o papel de células imune/inflamatórias no processo de expulsão de *Toxocara vitulorum* por bezerros búfalos naturalmente infectados, realizou-se a quantificação de mastócitos, eosinófilos, linfócitos intraepiteliais (LIE) e células caliciformes na camada intraepitelial da mucosa do intestino delgado. Para isto, amostras de tecidos foram retiradas do duodeno, jejuno e íleo de seis grupos de animais, de acordo com o resultado do exame coprológico, ou seja: animais que

estavam no início ou ascensão (1) e no pico (2) do parasitismo e durante os períodos de declínio ou expulsão (3), e de pós-expulsão dos parasitas (4), além de dois grupos controles de animais não parasitados por *T. vitulorum* com idade entre 30 (C30) e 50 (C50) dias. No duodeno, jejuno e íleo, a população de LIE, mastócitos, eosinófilos e células caliciformes começou a aumentar no início da infecção com número significativo, principalmente durante o pico, com aumento mais acentuado para LIE no jejuno e eosinófilos no duodeno. Em seguida, estas células começaram a declinar durante o período de expulsão, aproximando-se do nível de animais não infectados (controle) no período de pós-expulsão. Esta hiperplasia celular mais intensa, particularmente na fase de pico, indica uma participação destas células no processo de expulsão de *T. vitulorum* pelos bezerros búfalos. Para o estudo das alterações morfológicas da

<sup>1</sup> Departamento de Patologia Veterinária, UNESP-Campus de Jaboticabal, SP, Brasil. Pesquisador FAPESP proc. 02/02466-2.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia e Zootecnia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), Campus de Ilha Solteira, Av. Brasil n. 56, Centro, Ilha Solteira, SP, Brasil, 15385-000. E-mail: starke@bio.feis.unesp.br

parede intestinal em relação ao parasitismo, as camadas da parede intestinal (vilo, cripta, submucosa e muscular) foram mensuradas. Por estas mensurações, constatou-se somente uma significativa atrofia vilar no duodeno, durante as fases de ascensão, de pico e de expulsão do parasita, mas a hipertrofia muscular não foi observada.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxocara vitulorum*, búfalo, células inflamatórias, alterações morfológicas.

## INTRODUÇÃO

*Toxocara vitulorum* é um nematódeo pertencente à família Ascarididae que parasita o intestino delgado de ruminantes (SMITH, 1994) principalmente de búfalos (*Bubalus bubalis*) (ROBERTS, 1989). *Toxocara vitulorum* é prevalente para bezerros búfalos com até quatro meses de idade onde o pico máximo da infecção ocorre em torno dos 30 aos 50 dias. A partir de então ocorre uma auto-cura onde os búfalos eliminam espontaneamente os parasitas com as fezes e, em seguida, raramente apresentam reinfecção intestinal (STARKE et al., 1983; NEVES, 2003).

Na literatura, é reportado que os nematódeos parasitas intestinais raramente causam infecções fatais mas, a longo prazo, debilitam os animais e alteram as funções normais e a estrutura intestinal. Além disso, observa-se também que os animais parasitados podem adquirir uma imunidade contra estes parasitas, tornando o ambiente intestinal impróprio para o desenvolvimento dos parasitas possibilitando, assim, eliminá-los para o meio exterior. Neves et al. (2003) verificaram a ocorrência do aumento do número de mastócitos e eosinófilos na lâmina própria da mucosa (vilo e cripta) do intestino delgado de bezerros búfalos infectados por *T. vitulorum* durante o período de pico e de expulsão deste nematódeo do trato intestinal e concluíram que estas células contribuíram para este processo. Outro parâmetro verificado por Neves et al. (2003) foi a eosinofilia sanguínea durante todo o período de parasitismo patente. Em estudos sobre as reações inflamatórias contra infecções por helmintos parasitas gastrointestinais realizados em roedores ficou evidenciada a ocorrência de mastocitose e eosinofilia (JARRET; MILLER, 1982; STARKE; OAKS, 2001). Além disso, há relatos de que a ativação no local da infecção e a elevação dos níveis de produtos sistêmicos de mastócitos têm sido associados à expulsão de certos parasitas (BEFUS; BIENENSTOCK, 1982; JARRET; MILLER, 1982). Starke e Oaks (1999) estudando em ratos a fase de recuperação da infecção por *Hymenolepis diminuta*, observaram que após a expulsão dos parasitas, ocorria uma involução da mastocitose e da eosinofilia tecidual ao nível de mucosa intestinal. A diminuição na população destas células pode ocorrer por apoptose local (STARKE; OAKS, 1999) ou pela migração dos eosinófilos para os linfonodos mesentéricos e dos mastócitos para o baço (FRIEND et al., 2000).

Trabalhos recentes mostram a participação de células do sistema imune no processo de expulsão de nematódeos (STARKE; OAKS, 2001; MEEUSEN; BALIC, 2002; NEVES et al., 2003) e acredita-se que linfócitos intraepiteliais (LIE) formem uma primeira linha de defesa contra infecções em mucosas

pela ação de citocinas e de atividades reguladoras (SIMECKA, 1998). O aumento na população de células caliciformes parece estar associado à expulsão de helmintos do trato intestinal, onde as mudanças físicas na superfície luminal do intestino causada pelo aumento do muco liberado por estas células pode ter um importante papel na interação física entre o hospedeiro e o parasita e assim dificultar sua migração dentro do intestino (CLAMP, 1984; CARROLL et al., 1984; CARLISLE et al., 1991; NAWA et al., 1994; STARKE; OAKS, 2001).

No entanto, a participação de mastócitos, eosinófilos, linfócitos intraepiteliais e células caliciformes neste processo ainda permanece obscura. Muitos trabalhos foram feitos para esclarecer o papel destas células no processo de expulsão dos nematódeos, mas a grande maioria dos experimentos, no entanto, foi realizada em animais de laboratório (ratos e camundongos) (JARRET; MILLER, 1982; STARKE; OAKS, 2001) e alguns em ovinos (ROTHWELL, 1993; WINTER et al., 1997), mas muito pouco em búfalos (NEVES et al., 2003). Além disso, pouco se conhece sobre as reações inflamatórias e imunológicas nestes animais, ao nível celular na mucosa intestinal, que favorecem a expulsão destes parasitas pelos hospedeiros. Acredita-se que ocorra migração de mastócitos e eosinófilos para a camada intraepitelial do intestino, que as células caliciformes e linfócitos intraepiteliais sofram hiperplasia e que ocorra uma alteração morfológica na camada epitelial do duodeno e do jejuno, local onde se encontra o maior número de parasitas adultos. O presente trabalho procurou monitorar a participação das células intraepiteliais e a alteração morfológica do intestino delgado durante os períodos de início ou ascensão, pico do parasitismo, expulsão e pós-expulsão do *T. vitulorum* do trato intestinal.

## MATERIALE MÉTODOS

### 1. Local do experimento

O experimento foi executado na Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Universidade Estadual Paulista (UNESP - Ilha Solteira), situada à margem direita do Rio Paraná, no município de Selvíria, do Estado de Mato Grosso do Sul. A execução laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia/Imunologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP - Ilha Solteira.

### 2. Animais e exames parasitológicos

O rebanho bubalino foi constituído de 20 búfalas adultas mestiças (Mediterrâneo x Murrah), seus respectivos bezerros e um touro búfalo. Os bezerros que participaram deste experimento nasceram de janeiro a maio nos anos de 2001 e 2002, ou seja, foram constituídos dois grupos de 20 bezerros para cada ano. Estes bezerros permaneceram juntos com as mães em um piquete de 12 ha formado com *Brachiaria brizantha* e por um lago. As búfalas não foram ordenhadas durante todo o período de execução da pesquisa e os bezerros foram desmamados naturalmente.

Para os exames coprológicos, as fezes foram colhidas diretamente do reto de todos os bezerros búfalos do rebanho e estes exames foram realizados semanalmente, durante o primeiro mês de vida e quinzenalmente durante os cinco meses seguintes, no Departamento de Biologia e Zootecnia da Unesp de

Ilha Solteira. Os exames coprológicos foram realizados em câmaras de McMaster, segundo a técnica de WHITLOCK (1948).

As búfalas, cujos bezerros pertenciam aos grupos controles (C) não parasitados, foram tratadas com anti-helmíntico uma semana antes e no mesmo dia do parto com fosfato de levamisol "Ripercol" na dose de 3,75 mg/Kg pv (20 ml). Nos bezerros dos grupos controles o mesmo anti-helmíntico foi administrado no dia do nascimento e em seguida semanalmente para evitar que os animais se infectassem. Além disso, estes animais também foram tratados contra coccidiose com medicamento à base de sulfadiazina "Sulfamax" na dose de 5 ml/animal. As fezes foram colhidas semanalmente para exames coprológicos. Os animais dos grupos controles tinham em média aproximadamente 30 (n = 5; idades 22, 22, 27, 30 e 45 dias) e 50 dias de idade (n = 3; idades 49, 51 e 52 dias).

As mães e os bezerros pertencentes aos grupos parasitados não foram tratados com anti-helmínticos, mas apenas com sulfa. Após o nascimento, estes bezerros foram separados em quatro grupos de acordo com o resultado do OPG (ovos por grama de fezes):

1) Grupo da ascensão - ASC (n = 4): compreendeu animais no início da detecção dos ovos nas fezes e com idade média de 33 dias.

2) Grupo do pico de eliminação de ovos nas fezes - PICO (n = 5): este período foi estimado através de dados de trabalhos prévios, mostrando que os animais encontravam-se no pico entre 30 e 50 dias de idade e com OPG médio superior a 10.000 (Starke et al., 1983; Souza et al., 2001; Neves et al., 2003).

3) Grupo do declínio ou expulsão - DECL (n = 4): quando a quantidade de ovos começava a declinar nas fezes e com idade média de 59 dias.

4) Grupo da pós-expulsão - PE (n = 4): quando os ovos não foram mais encontrados nas fezes por até um mês consecutivo. Estes animais encontravam-se com idade média de 116 dias.

### 3. Necropsia e Histopatologia

Os animais foram previamente sedados com Xilazina 2% (dose = 0,25 a 1,50 ml/100 Kg pv IM) e anestesiados com Ketalar (dose = 0,15 mL/Kg pv IM). Após o animal estar completamente anestesiado este foi posicionado em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta. Após ser devidamente identificada cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foi seccionada; o duodeno na sua região cranial ou mediana, o jejuno em sua região cranial e mediana e o íleo também em sua porção cranial e mediana, porém, preferencialmente onde o enovelado dos parasitas era perceptível. Em seguida ocorreu a retirada dos segmentos. Os segmentos seccionados foram de aproximadamente 15 cm e abertos no sentido longitudinal. Estes segmentos foram lavados em solução salina tamponada (1,93g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,37g de KCl e 14,4g de NaCl) e transferidos abertos para uma folha de isopor umedecida com salina tamponada e em temperatura ambiente. Com auxílio de bisturi, segmentos de dois a três centímetros foram seccionados, colocados abertos em papel cartão e transferidos imediatamente para o fixador. O fixador utilizado foi a solução de Bouin. Após a coleta dos tecidos, os animais foram sacrificados com cloreto de potássio.

Após 12 horas de fixação os tecidos foram desidratados em álcool com concentrações crescentes de 70% à 100%, clarificados em xilol e embebidos em parafina (ponto de fusão 56°C). Secções das amostras em parafina foram cortadas (5µm) e montadas em lâminas. Para a contagem de mastócitos e eosinófilos intraepiteliais, foram utilizadas as técnicas de coloração específica pelo Azul de Astra e "Direct Red", respectivamente, segundo Duffy et al. (1993). Para a contagem de linfócitos intraepiteliais foi utilizada a técnica de coloração pela hematoxilina e eosina. As células caliciformes foram coradas com o método de coloração do ácido Periódico de Schiff (PAS). Para exames morfológicos, as secções intestinais foram coradas pela hematoxilina e eosina (H.E.).

### 4. Contagem de células e análise morfológica

A contagem de células foi feita no epitélio das vilosidades, contando-se as células presentes entre as células epiteliais de 20 vilos consecutivos. Estas contagens foram realizadas a "duplo cego" em microscópio de luz branca e três lâminas de cada animal foram analisadas. Os tecidos utilizados para estas contagens celulares pertenciam aos animais dos grupos: controle com 30 dias de idade (C30), ascensão, pico, declínio e pós-expulsão dos parasitas.

Para a análise morfológica, foram analisadas 20 unidades vilocripta, escolhendo-se as vilosidades que mais se igualavam em altura e largura, onde a altura do vilos, a profundidade da cripta, espessura da submucosa e da camada muscular longitudinal e circular foram medidas com auxílio de uma ocular micrométrica em microscópio de luz. Estas medidas foram realizadas sob o microscópio e três lâminas de cada animal foram analisadas. Os tecidos utilizados para estas medidas pertenciam aos animais dos grupos: controles com 30 (C30) e 50 dias de idade (C50), ascensão, pico, declínio e pós-expulsão dos parasitas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Hiperplasia de células intraepiteliais no intestino delgado

*Toxocara vitulorum* é um parasita de grande porte presente no lúmen do intestino delgado de bezerros búfalos, principalmente nas primeiras porções (duodeno e jejuno proximal), que quando numerosos podem permanecer enovelados comprimindo e traumatizando a mucosa intestinal, o que leva a uma sensibilização das células imune/inflamatórias em defesa ao hospedeiro. No presente trabalho, estudou-se a participação de componentes celulares nas diferentes fases da infecção natural por *T. vitulorum*, no sentido de relacioná-los ao processo de expulsão dos parasitas pelo hospedeiro o que normalmente ocorre nos bezerros búfalos quando eles atingem em torno de 40 a 60 dias de idade. Desta forma, pela quantificação de células presentes na camada intraepitelial nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), constatou-se que o número de mastócitos, eosinófilos, linfócitos intraepiteliais (LIE) e células caliciformes apresentaram um aumento significativo nos animais infectados naturalmente por *T. vitulorum* (fase de ascensão e pico) quando comparado com o grupo não infectado.

Os LIEs, no duodeno (Figura 1), apresentaram-se em número significativamente mais elevado na fase de pico do

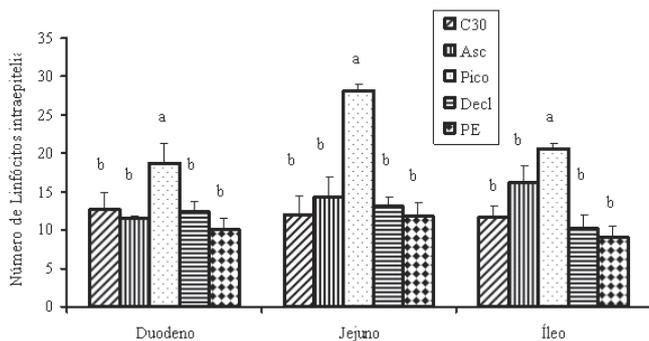


Figura 1. Número médio de linfócito intraepitelial (LIE) no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.  $P \leq 0,05$

parasitismo ( $18,75 \pm 2,61$ ) quando comparado com o grupo controle ( $12,62 \pm 2,24$ ). Este número regrediu rapidamente e retornou ao nível do controle na fase de pós-expulsão do parasita ( $10,02 \pm 1,46$ ). Esta dinâmica celular foi semelhante no jejuno e no íleo, apesar do número destas células encontrar-se bem mais elevado no jejuno ( $28,15 \pm 0,83$ ) do que no íleo ( $20,6 \pm 0,81$ ). Este aumento de LIE, principalmente na fase de pico do parasitismo, coincidiu também com as maiores contagens de OPG e o maior número dos helmintos adultos no intestino (Tabela 1). Embora não se conheça exatamente a ação deste tipo celular no parasitismo, Simecka (1998) não descartou a possibilidade de que os LIEs possam ajudar na defesa da mucosa contra infecções parasitárias do lúmen intestinal. Estas células podem ter o papel de liberar citocinas para o lúmen ou podem ter atividade citotóxica. Estas suposições podem ser amparadas pelos estudos de Flexman et al. (1983) que sugeriram que os LIEs podem efetuar uma atividade de células exterminadoras naturais, o que confere a estas células a função de defesa do hospedeiro contra o parasita. Além disso, o aumento de LIE pode ser explicado pelo fato destas células localizarem-se entre as células epiteliais e de constituírem o

Tabela 1. Dados médios de OPG e de contagens de *Toxocara vitulorum* adultos encontrados durante as necropsias de bezerros búfalos do grupo controle (C) e dos grupos infectados nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio ou expulsão (DECL) e ausência ou pós-expulsão (AUS) do parasitismo. Ilha Solteira, SP.

Grupos	OPG Média ± DP	Número de Parasitas Adultos (machos e fêmeas)	
		Variação	Média ± DP
C	0	0	0
ASC	4.150 ± 3.566	3 - 20	10 ± 8
PICO	46.950 ± 29.245	11 - 51	27 ± 18
DECL	1.812 ± 3.175	0 - 2	0,5 ± 1
AUS	0	0	0

DP = Desvio Padrão

\* = A média foi calculada, tendo como base somente os animais positivos.

primeiro componente do sistema imune exposto aos antígenos intestinais (SIMECKA, 1998). Os dados deste trabalho concordam com os de Carroll et al. (1984), porém com a diferença de que o aumento na população de LIEs nos ratos, foi observado somente algumas semanas após a expulsão de *Strongyloides ratti*.

O número de eosinófilo presente na camada intraepitelial do duodeno (Figura 2), foi drasticamente e significativamente aumentado durante o período de pico do parasitismo ( $10,96 \pm 5,81$ ) quando comparado com o grupo controle ( $0,08 \pm 0,16$ ), demonstrando que os eosinófilos que normalmente não estão presentes nesta camada migram da lâmina própria para a camada intraepitelial em resposta à presença dos parasitas juvenis e adultos no lúmen intestinal. Outros autores como Eversole et al. (1999) observaram eosinófilos migrando da cripta para o vilão, em direção à região subepitelial e atravessando a lâmina basal para a região intraepitelial na infecção por *N. brasiliensis* em camundongos. Além disso, estudos *in vitro* mostram que eosinófilos aderem a uma variedade de helmintos opsonizados com imunoglobulinas e complemento, liberando o conteúdo de seus grânulos e secretando fatores solúveis para matar larvas helmínticas (BUTTERWORTH, 1984). Recentemente, Meeusen e Balic (2002) reportaram que mastócitos, células exterminadoras naturais (NK) e LIEs, poderiam secretar IL-5 induzindo a proliferação e a migração de eosinófilos da medula óssea. No jejuno (Figura 2), embora levemente inferior ao duodeno, a população de eosinófilos também encontrava-se elevada em animais na fase de pico ( $3,27 \pm 1,71$ ) quando comparada com os animais controles ( $0,25 \pm 0,16$ ), retornando à normalidade após este período. O aumento na população de eosinófilos associado com helmintos gastrointestinais já foi relatado também por vários autores em diversas espécies animais (ROTHWELL, 1993; WINTER et al., 1997; STARKE; OAKS, 2001; ALDAWEK et al., 2002; KLION; NUTMAN, 2004). Já em búfalos, Neves et al. (2003) verificaram que os eosinófilos começaram a aumentar em número já no início da infecção por *T. vitulorum* tanto na cripta como no vilão do duodeno e do jejuno. Estas células continuaram sempre em número elevado durante o pico e durante a

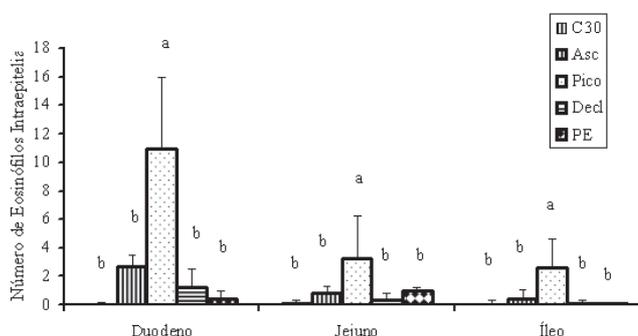


Figura 2. Número médio de eosinófilo na camada intraepitelial do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.  $P \leq 0,05$

fase de expulsão dos parasitas pelos bezerros búfalos, para alcançar o nível do controle após a expulsão dos mesmos. Estes autores não detectaram eosinófilos na camada muscular do intestino, sugerindo que os eosinófilos provavelmente chegaram até à lâmina propria através de vasos sanguíneos presentes neste local ou na submucosa e daí migraram para a camada intraepitelial à mediada em que a infecção progredia.

Outro tipo celular também bastante importante e sempre associado a infecções parasitárias são os mastócitos. Estas células também não são encontradas em condições normais na camada intraepitelial mas, no presente trabalho, estas células estavam hiperplásicas nesta camada, tanto no duodeno como no jejuno e no íleo, durante a ascensão e o pico da infecção (Figura 3). No duodeno, o número médio  $\pm$  desvio padrão destas células foi de  $0,04 \pm 0,08$  no controle (C30), de  $1,63 \pm 1,08$  no período de ascensão e de  $2,0 \pm 0,95$  no pico. Já nos períodos de expulsão e pós expulsão, estes números que foram de  $0,67 \pm 0,72$  e  $0,17 \pm 0,13$ , respectivamente, retornaram próximos ao do controle. A hiperplasia de mastócitos na ascensão e no pico da infecção por *T. vitulorum*, com retorno à normalidade após a expulsão dos vermes, sugere que estas células, além das outras células mencionadas e discutidas aqui, desempenharam um importante e coordenado papel na expulsão do parasita pelo hospedeiro. Possivelmente mastócitos sejam uma das primeiras células a chegar ao local da infecção e, com a liberação de seus mediadores inflamatórios, atraíam outras células inflamatórias na tentativa de provocar um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasita e facilitar a expulsão pelo hospedeiro. Jones e Emery (1991) observaram altos níveis de mediadores inflamatórios (prostaglandina F, leucotrienos (C4), tromboxanos (B2) e histaminas) no muco intestinal de ovinos imunizados frente a *T. colubriformis*, principalmente no período em que ocorreu a expulsão do parasita pelo hospedeiro, indicando a importância dos mediadores de mastócitos neste processo. Além disso, pelo exame histológico, ficou evidente no presente trabalho a presença de mastócitos na camada epitelial e, algumas vezes, atravessando-a em direção ao lúmen intestinal, provavelmente atraído pelo parasita para poder liberar seus mediadores o mais próximo possível do lúmen. O entendimento deste mecanismo ainda não está claro, mas sabe-

se que quando mastócitos são sensibilizados liberam citocinas importantes para a resposta imune, como a IL-3, IL-4, IL-5 e outras que induzem a proliferação celular na medula óssea, quimiotaxia de outras células e síntese de IgE pelos linfócitos B presentes na mucosa intestinal (MARSHALL; BIENENSTOCK, 1990) e podem também facilitar o fluxo de anticorpos para dentro do lúmen intestinal (MURRAY et al., 1968; ASKENASE, 1980). Além disso, a ação dos mediadores inflamatórios é bastante ampla podendo promover infiltração de eosinófilos, aumento da contração da musculatura lisa intestinal (MARSHALL; BIENENSTOCK, 1990), hipersecreção de muco (NUTMAN, 1993), agregação de plaquetas e aumento da permeabilidade vascular (TIZARD, 1996).

No jejuno (Figura 3), os mastócitos demonstraram um leve aumento na fase de pico, porém este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao controle. Talvez pela presença de *T. vitulorum* adultos em maior quantidade no duodeno, estas células tenham sido requeridas com maior intensidade nesta região onde, provavelmente, suas funções foram mais eficazes. No entanto, mesmo em menor número no jejuno, os mediadores liberados pelos mastócitos podem ter contribuído para o desencadeamento da resposta inflamatória local que, segundo Nutman (1993), contribuem para criar um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasita e facilitam sua expulsão. Além disso, Neves et al. (2003) também observaram que o número de mastócitos encontrava-se significativamente elevado na lâmina própria (vilo e cripta) do duodeno e jejuno de bezerros búfalos infectados por *T. vitulorum* durante o período de ascensão, pico e expulsão, retornando à normalidade após a expulsão do parasita.

As células caliciformes são encontradas normalmente na camada intraepitelial do intestino, mas mostraram-se hiperplásicas nos bezerros búfalos infectados com *T. vitulorum*. No duodeno elas estavam hiperplásicas, principalmente na fase de pico do parasitismo ( $24,30 \pm 0,73$ ) em comparação com o grupo controle ( $12,65 \pm 5,64$ ), mesmo período em que o OPG dos animais parasitados também encontrava-se elevado (Tabela 1 e Figura 4). A hiperplasia destas células pode estar diretamente relacionada com a tentativa do hospedeiro em expulsar o parasita, já que a principal função destas é lubrificar e proteger o epitélio intestinal. Essa lubrificação facilitaria a remoção do parasita para as regiões terminais do intestino. No jejuno também observou-se células caliciformes hiperplásicas nas fases de ascensão ( $25,33 \pm 2,33$ ) e pico ( $27,55 \pm 5,60$ ), declinando abruptamente durante a expulsão do parasita pelo hospedeiro ( $14,97 \pm 2,65$ ) (fase de declínio). O número destas células voltou à normalidade após a expulsão dos mesmos (Figura 4). Levy e Frondoza (1983), estudando a imunidade intestinal contra *N. brasiliensis*, verificaram que a eliminação dos parasitas do trato gastrointestinal provavelmente tenha ocorrido em resultado da combinação do aumento de anticorpos IgG e de muco secretado por uma população hiperplásica de células caliciformes, estimulados por mecanismos imune T-dependente, que podem interferir com a habilidade do parasita em sobreviver nos espaços entre os vilos do jejuno.

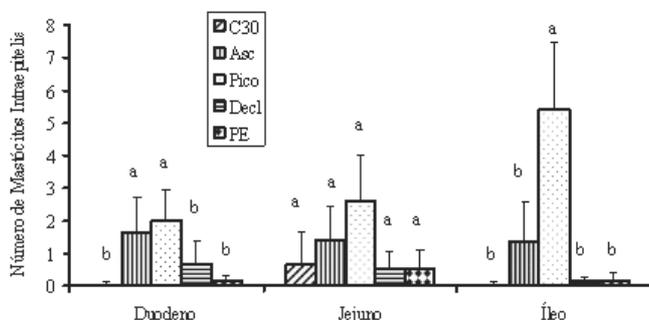


Figura 3. Número médio de mastócito na camada intraepitelial do duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.  $P \leq 0,05$

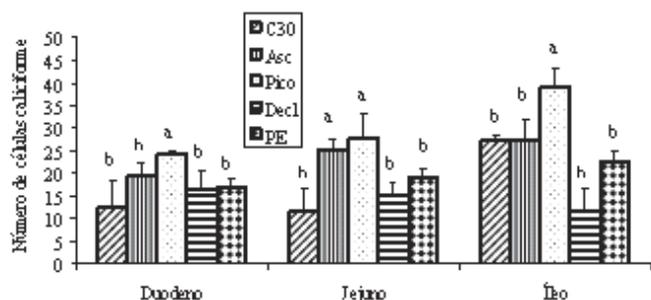


Figura 4. Número médio de células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo controle (C30) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante a ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Desvio padrão da média está representado pelas barras verticais acima das colunas.

$P \leq 0,05$

Interessante comentar que, embora os parasitas não tenham sido encontrados no íleo durante as necropsias dos bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*, todos os tipos celulares estudados no presente trabalho, como LIE (Figura 1), eosinófilos (Figura 2), mastócitos (Figura 3) e células caliciformes (Figura 4) foram observados aumentados na camada intraepitelial. As células caliciformes e os LIEs como são habitualmente encontrados em grande número na mucosa deste órgão, apresentaram um leve aumento, embora significativo. Já os eosinófilos apresentaram um aumento menos acentuado no íleo do que no duodeno e no jejuno, mas os mastócitos foram as células que mais se elevaram em quantidade neste órgão. Segundo Simecka (1998), apesar de um estímulo antigênico ocorrer em um local particular na mucosa intestinal, como por exemplo na primeira porção do intestino delgado, a resposta a este estímulo, como a secreção de mediadores inflamatórios e a sensibilização celular, poderia estender-se para outras porções intestinais, possivelmente através da circulação sanguínea ou linfática que drena toda a mucosa intestinal, as placas de Peyer e/ou os linfonodos mesentéricos. Desta forma, a mucosa de todo o intestino e mesmo as mucosas mais distantes, como por exemplo do trato urogenital e respiratório, estariam também protegidas contra possíveis invasores futuros. Esta explicação poderia ser aplicável ao estímulo antigênico do *T. vitulorum* que estaria sensibilizando os mecanismos efetores de toda a mucosa intestinal. No entanto, estudos posteriores deveriam ser realizados para comprovar esta hipótese.

#### Análise morfológica da parede intestinal

A altura do vilão, a profundidade da cripta, a espessura da submucosa e da camada muscular longitudinal e circular das diferentes regiões intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram analisadas morfológicamente nos animais infectados por *T. vitulorum*, em cada fase do parasitismo (ascensão, pico, declínio e pós-expulsão) e nos animais não infectados (grupos controles C30 e C50).

No duodeno, de acordo com os dados das medidas de comprimento dos vilos, nas fases de ascensão ( $0,5\text{mm} \pm 0,11$ ), pico ( $0,5\text{mm} \pm 0,02$ ) e declínio ( $0,4\text{mm} \pm 0,06$ ), observou-se que nesta região houve uma atrofia significativa quando os dados

foram comparados com os dos grupos controles C30 ( $0,65\text{mm} \pm 0,07$ ) e C50 ( $0,65\text{mm} \pm 0,05$ ). Esta atrofia decorreu-se em função da ação mecânica e irritativa dos helmintos sobre a mucosa intestinal. A cripta e a submucosa, no entanto, não apresentaram alterações morfológicas significativas, enquanto que as camadas musculares intestinais apresentavam-se significativamente hipertrofiadas nos animais que se encontravam na fase de ascensão ( $0,87\text{mm} \pm 0,07$ ), pico ( $0,91\text{mm} \pm 0,06$ ), declínio ( $1,0\text{mm} \pm 0,09$ ) e no período pós-expulsão dos parasitas ( $0,9 \pm 0,08$ ) quando estas medidas foram comparadas com as dos animais do grupo controle C30 ( $0,48\text{mm} \pm 0,05$ ) (Tabela 2). No entanto, este espessamento não foi significativo com relação ao grupo controle C50 onde os animais eram mais velhos (idade média de 50 dias). Desta forma, pôde-se inferir que este aumento nas medidas da musculatura do duodeno ocorreu mais em função do desenvolvimento dos animais do que propriamente em decorrência da infecção, provavelmente em função do pequeno número de helmintos que foi insuficiente para causar hipertrofia muscular.

Como pode ser visualizado nas Tabelas 3 e 4, pelas medidas do jejuno e do íleo, respectivamente, não foram detectadas alterações morfológicas significativas nas dimensões do vilão, cripta, submucosa e muscular em todas as fases parasitárias estudadas (ascensão, pico e declínio do parasitismo) quando comparadas aos controles. No entanto, Dwinell et al. (1998) e Starke e Oaks (1999) constataram no íleo de ratos infectados com *H. diminuta*, aumento na profundidade das criptas e hipertrofia da muscular, entre os dias 20 e 32 pós-infecção. Estas alterações morfológicas foram explicadas pelos autores como sendo em decorrência da migração noturna do parasita do íleo ao duodeno para ter acesso ao alimento ingerido pelo animal à noite. Esta movimentação do parasita alterou o padrão de contratibilidade intestinal e favoreceu o espessamento muscular. Segundo Gabella (1990) doenças de obstrução do intestino, com conseqüente diminuição do trânsito intestinal, resultaram em aumento do tamanho das células musculares próximas a esta estenose e no aumento do "trabalho" intestinal, ou seja, da contratibilidade, levando à hipertrofia da musculatura. Sabe-se que os ascarídeos,

Tabela 2. Dimensões do vilão, da cripta, da submucosa e da muscular do duodeno dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	Medidas do Duodeno (mm)			
	Vilão	Cripta	Submucosa	Muscular
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C30	$0,65 \pm 0,07$ a	$0,32 \pm 0,08$ a	$0,1 \pm 0,03$ ab	$0,48 \pm 0,05$ b
C50	$0,65 \pm 0,05$ a	$0,25 \pm 0,09$ a	$0,19 \pm 0,02$ a	$0,8 \pm 0,16$ a
Asc	$0,5 \pm 0,11$ bc	$0,31 \pm 0,02$ a	$0,13 \pm 0,04$ ab	$0,87 \pm 0,07$ a
Pico	$0,5 \pm 0,02$ bc	$0,31 \pm 0,04$ a	$0,12 \pm 0,07$ ab	$0,91 \pm 0,06$ a
Decl	$0,4 \pm 0,06$ c	$0,35 \pm 0,04$ a	$0,1 \pm 0,02$ b	$1,0 \pm 0,09$ a
PE	$0,6 \pm 0,08$ ab	$0,30 \pm 0,03$ a	$0,15 \pm 0,05$ ab	$0,9 \pm 0,08$ a

Médias com letras distintas nas colunas, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

DP = Desvio Padrão.

Tabela 3. Dimensões do vilo, da cripta, da submucosa e da muscular do jejuno dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	Medidas do Duodeno (mm)			
	Vilo	Cripta	Submucosa	Muscular
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C30	1,17 ± 0,16 a	0,32 ± 0,04 a	0,14 ± 0,02 a	0,57 ± 0,07 bc
C50	1,17 ± 0,1 a	0,22 ± 0,06 a	0,12 ± 0,04 a	0,51 ± 0,04 c
Asc	1,14 ± 0,03 a	0,32 ± 0,07 a	0,11 ± 0,06 a	0,56 ± 0,02 bc
Pico	1,12 ± 0,14 a	0,29 ± 0,03 a	0,11 ± 0,01 a	0,78 ± 0,02 ab
Decl	0,92 ± 0,1 a	0,24 ± 0,03 a	0,07 ± 0,02 a	0,68 ± 0,08 abc
PE	1,1 ± 0,1 a	0,28 ± 0,07 a	0,17 ± 0,09 a	0,83 ± 0,07 a

Médias com letras distintas nas colunas, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

DP = Desvio Padrão.

Tabela 4. Dimensões do vilo, da cripta e da muscular do íleo dos bezerros búfalos dos grupos controles (C30 e C50) e dos grupos infectados por *Toxocara vitulorum* durante o período de ascensão (Asc), pico, declínio ou expulsão (Decl) e pós-expulsão (PE). Ilha Solteira, SP.

Grupos	Medidas do Íleo (mm)		
	Vilo	Cripta	Muscular
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
C30	0,25 ± 0,02 a	0,26 ± 0,03 c	0,44 ± 0,09 a
C50	0,25 ± 0,03 a	0,26 ± 0,04 bc	0,38 ± 0,04 a
Asc	0,26 ± 0,05 a	0,30 ± 0,05 abc	0,42 ± 0,02 a
Pico	0,26 ± 0,03 a	0,36 ± 0,04 a	0,42 ± 0,02 a
Decl	0,27 ± 0,02 a	0,39 ± 0,04 a	0,42 ± 0,08 a
PE	0,28 ± 0,03 a	0,35 ± 0,05 ab	0,39 ± 0,06 a

Médias com letras distintas nas colunas, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

DP = Desvio Padrão.

por serem de grande porte e principalmente quando numerosos, formam enovelados e obstruem o lúmen intestinal dificultando a passagem do bolo alimentar e, desta forma, podem ocasionar alterações do padrão mioelétrico contrátil do intestino. Com relação ao *T. vitulorum*, quando bezerros encontram-se altamente infectados, com centenas de parasitas adultos no lúmen intestinal, é freqüente ocorrerem obstruções, impedimento na absorção alimentar (ENYENIHI, 1969b; SUKHAPESNA, 1981a) e alterações na mucosa e na camada muscular da parede intestinal (SRIVASTAVA, 1963). No entanto, no presente trabalho, embora tenha ocorrido aumento populacional de células imune/inflamatórias na parede intestinal levando, possivelmente, a uma maior contratilidade intestinal e à expulsão dos parasitas pelos hospedeiros, alterações morfológicas significativas, como por exemplo a hipertrofia muscular, não ocorreram. Uma explicação para este fato, pode ser em função do número de parasitas presentes (máximo de 51 exemplares adultos), que provavelmente não foi suficiente para causar a obstrução e dificuldades no trânsito intestinal, sobrecarregando a musculatura para manter o ritmo normal do peristaltismo e da homeostasia intestinal, como foi observado pelos autores acima citados.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados pôde-se concluir que a infecção por *T. vitulorum* em bezerros búfalos estimula a migração de células como mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal para a camada intraepitelial e o aumento da população de linfócitos intraepiteliais e células calcificiformes.

Estas alterações na migração e na hiperplasia celular, embora também observadas nos períodos de ascensão e expulsão dos parasitas, foram mais intensas durante o pico. Como a população destas células declinou e retornou quase à normalidade após a expulsão dos parasitas acredita-se que elas desempenhem um importante papel no processo de expulsão de *T. vitulorum* pelos hospedeiros.

A atrofia vilar foi evidente somente no duodeno, local preferencial do parasitismo, durante o período de ascensão, pico e expulsão do parasita, sugerindo que a irritação e o contato físico do parasita com a mucosa, tenha contribuído para esta alteração.

Não houve hipertrofia significativa da musculatura intestinal em nenhuma fase parasitária nas três regiões intestinais estudadas (duodeno, jejuno e íleo), possivelmente em função do número de parasitas (inferior a 51) no lúmen intestinal, não suficiente para causar obstrução e hipermotilidade intestinal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDAWEK, A.M.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; KOLODZIEYSKI, L.; SEVEIKOVÁ, Z.; DUBINSKY, P. Laval toxocariosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. *Veterinary Parasitology*, v. 105, n. 3, p. 207-214, 2002.
- ASKENASE, P.W. Immunopathology of parasitic diseases: involvement of basophils and mast cells. *Seminars in Immunopathology*, v. 2, p. 417-442, 1980.
- BEFUS, D.A.; BIENENSTOCK, J. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *Journal of Immunology*, v. 128, n. 6, p. 2475-80, 1982.
- BUTTERWORTH, A.E. Cell-mediated damage to helminthes. *Advances in Parasitology*, v. 23, p. 143-235, 1984.
- CARLISLE, M.S.; MCGREGOR, D.D.; APPLETON, J.A. intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology*, v. 74, n. 3, p. 546-551, 1991.
- CARROLL, S.M.; MAYRHOFER, G.; DAWKINS, H.J.S.; GROVE, D.I. Kinetics of intestinal lamina propria mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes, goblet cells and eosinophils in murine. *Article Allergy Aplicata Immunology*, v. 74, n. 4, p. 311-17, 1984.
- CLAMP, J.R. The relationship between the immune system and mucus in the protection of mucous membranes. *Biochemical Society Transactions*, v. 12, n. 5, p. 754-756, 1984.
- DUFFY, J.P.; SMITH, J.P.; CROCKER, J.; MATTHEWS, H.R. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. *Journal of Histochemistry*, v. 16, n. 2, p. 143-144, 1993.
- DWINELL, M.B.; BASS, P.; WISE, R.M.; OAKS, J.A. *Hymenolepis diminuta*: Mucosal mastocytosis and in-

- testinal smooth muscle hypertrophy in tapeworm infected rats. *Experimental Parasitology*, v. 89, n. 1, p. 92-102, 1998.
- ENYENIHI, U.K. Pathogenicity of *Neoascaris vitulorum* infections in calves. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, v. 17, n. 2, p. 171-178, 1969.
- EVERSOLE, R.; MACKENZIE, C.; CONDER, G.; JONSON, S.; BEUVING, L. Changes in the morphology and the distribution of rat intestinal eosinophils during infection with nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Laboratory Investigation*, v. 79, n. 7, p. 785-797, 1999.
- FLEXMAN, J.P.; SHELLAM, G.R.; MAYRHOFER, G. Natural cytotoxicity responsiveness to interferon and morphology of intraepithelial lymphocytes from the small intestine of the rat. *Immunology*, v. 48, n. 4, p. 733-41, 1983.
- FRIEND, D.S.; GURISH, M.F.; AUSTEN, K.F.; HUNT, J.; STEVENS, R.L. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocate to the spleen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. *Journal of Immunology*, v. 165, n. 1, p. 344-352, 2000.
- GABELLA, G. Hypertrophy of visceral smooth muscle. *Anatomy and Embriology*, v. 182, n. 5, p. 409-424, 1990.
- JARRET, E.E.; MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. In: KALLÓS, P. (ed.) *Immunity and concomitant immunity in infectious diseases. Progress in Allergy*. Basel: Karger, v. 31, p. 178-233, 1982.
- JONES, W.O.; EMERY, D.L. Demonstration of a range of inflammatory mediators released in Trichostrongylosis of sheep. *International Journal for Parasitology*, v. 21, n. 3, p. 361-3, 1991.
- KLION, A.D.; NUTMAN, T.B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 113, n. 1, p. 30-37, 2004.
- LEVY, A.M.; FRONDOZA, C. Immunity to intestinal parasites: role of mast cells and goblet cells. *Federation Proceedings*, v. 42, n. 6, p. 1750-1755, 1983.
- MARSHALL, J.S.; BIENENSTOCK, J. Mast cells. *Springer Seminars in Immunology*, v. 12, n. 2-3, p. 191-202, 1990.
- MEEUSEN, E.N.T.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites. *Parasitology Today*, v. 16, n.3, p. 95-101, 2002.
- MURRAY, M.; MILLER, H.R.P.; JARRETT, W.F. The globule leucocyte and its derivation from the subepithelial mast cell. *Laboratory Investigation*, v. 19, p. 222-233, 1968.
- NAWA, Y.; ISHIKAWA, N.; TSUCHIYA, K.; HORII, Y.; ABE, T.; KHAN, A.I.; BING-SHI, H.; ITOH, H.; IDE, H.; UCHIYAMA, F. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 7, p. 333-338, 1994.
- NEVES, M.F.; STARKE-BUZETTI, W.A.; CASTRO, A.M.M.G. Mast cell and eosinophils in the wall of the gut and eosinophils in the blood stream during *Toxocara vitulorum* infection of the water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 1, p. 59-72, 2003.
- NUTMAN, T.B. Mast cells and their role in parasitic helminth infection. In: KALINER, M.A.; METCALFE, D.D. *The mast cell in health and disease*. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 669-686.
- ROBERTS, J.A. The extraparasitic life cycle of *Toxocara vitulorum* in the village environment of Sri Lanka. *Veterinary Research Communications*, v.13, n. 5, p. 377-88, 1989.
- ROTHWELL, T.L.W. Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *International Journal for Parasitology*, v. 23, n. 2, p. 203-211, 1993.
- SIMECKA, J.W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.34, n. 2-3, p. 235-259, 1998.
- SMITH, J.D. *Introduction to animal Parasitology*. 3<sup>th</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 1994. 569 p.
- SOUZA, E.M.; STARKE-BUZETTI, W.A.; FERREIRA, F.P.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z. Humoral immune response of water buffalo monitored with three different antigens of *Toxocara vitulorum*. *Veterinary Parasitology*, v. 122, n. 1, p. 67-78, 2001.
- SRIVASTAVA, S.C. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782) Travassos, 1907, in intestinal perforation with is localization in liver of buffalo calves. *Indian Veterinary Journal*, v. 40, p. 758-762, 1963.
- STARKE, W.A.; ZOCOLLER, M.C.; MACHADO, R.Z.; HONER, M.R. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no município de Andradina (SP). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 35, n. 5, p.651-64, 1983.
- STARKE, W.A.; OAKS, J.A. *Hymenolepis diminuta*: Praziquantel removal of adult tapeworm is followed by apoptotic down-regulation of mucosal mastocytosis. *Experimental Parasitology*, v. 92, n. 3, p. 171-81, 1999.
- STARKE, W.A., OAKS, J.A. Ileal mucosal mast cell, eosinophil, and goblet cell populations during *Hymenolepis diminuta* infection of the rat. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 5, p. 1220-25, 2001.
- SUKHAPESNA, V. Ascariosis in buffalo calves. *Journal of the Thai Veterinary Medical Association*, v. 32, n. 1, p. 263-268, 1981.
- TIZARD, I. *Introdução à Imunologia Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 1996. 531p.
- WHITLOCK, A.V. Some modifications of the McMaster helminth eggs; counting technique and apparatus. *Journal of Helminthology*, v. 29, p. 177-80, 1948.
- WINTER, M.D.; WRIGHT, C.; LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. *Parasitology*, v. 114, n. 2, p. 189-93, 1997.

Recebido em 5 de novembro de 2004.

Aceito para publicação em 21 de outubro de 2005.