

AVALIAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES PRODUTORAS DE MUCINAS ÁCIDAS NO JEJUNO DE *Rattus norvegicus* COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS COM *Echinacea purpurea*

Henrique Cazanti Sona (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maria José Pastre (Co-orientadora), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientadora), e-mail: henriquesonac1@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área e subárea: Morfologia e histologia

Palavras-chave: mucinas, parasitose, zoonose.

Resumo:

O *Toxoplasma gondii* é causador da toxoplasmose, afeta diversos animais, acarretando uma disbiose intestinal. Seu tratamento utilizada-se pirimetamina e sulfadiazina, no entanto, está acarretando no surgimento de cepas resistentes. A *Echinacea purpurea* é considerada imunostimulante e anti-inflamatória. Foram utilizados 42 ratos (n=7) distribuídos em GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP (Grupo não infectado e tratado com *E. purpurea*), GI-EP (Grupo infectado e tratado com *E. purpurea*), GC-P (Grupo não infectado e tratado com pirimetamina) e GI-P (Grupo infectado e tratado com pirimetamina). Os grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com *E. purpurea* por 28 dias antes e depois da infecção. Os grupos GC-P e GI-P receberam pirimetamina. Os grupos infectados receberam 500 oocistos de *T. gondii*. Após o tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia, o jejuno foi coletado, fixado em paraformaldeído, incluídos em parafina e realizado cortes semiseriados de 4 µm. Posteriormente desparafinizados e corados por meio de Alcian blue 1.0 para evidenciar células caliciformes (CCs) secretoras de sulfomucinas e Alcian blue 2.5 para as CCs secretoras de sialomucinas. Foram contados 16 campos de 160 células epiteliais incluindo as CCs. Realizou-se o teste ANOVA por meio do software GraphPad Prism 5.01. Considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O número de CCs, nas duas colorações, aumentaram nos grupos GI-NT, GC-P e GI-P comparados ao GC. E diminuíram no GI-P em comparação com GI-NT e GI-P. A infecção crônica por *T. gondii*, como o tratamento com *E. purpurea* aumentaram o número de CCs.

Introdução

A toxoplasmose é uma doença de alta frequência na população humana. É causada pelo *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório. A sua principal forma de transmissão é por meio do consumo de alimento e água contaminada com oocistos. Seu ciclo sexual ocorre no interior dos enterócitos intestinais de felinos que eliminam fezes com milhares de oocistos no ambiente. Quando outro animal ou o homem ingerem os oocistos, estes se rompem no interior do intestino delgado, liberando esporozoítos e bradizoítos que infectam as células intestinais e se diferenciam em taquizoítos, caracterizando a fase aguda. Depois de estarem bem difundido pelo hospedeiro, começam a formar cistos teciduais por causa da resposta imunológica, caracterizando a fase crônica da doença (GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Como o intestino delgado é o local de início para diversas infecções, assim o epitélio é preparado para responder contra invasores intestinais. É composto principalmente por enterócitos que fazem a absorção de nutrientes e células caliciformes (CCs) com função de produzir mucinas neutras e ácidas, subdivididas em sulfatadas (sulfomucinas) e a não sulfatadas (sialomucinas). Este muco fica sobre o epitélio e o auxilia na proteção e no trânsito intestinal (MOAL; SERVIN, 2006).

O tratamento padrão para toxoplasmose é a pirimetamina combinada com sulfadiazina, que atuam como inibidor enzimático, bloqueando a síntese de DNA. Muitas cepas de *T. gondii* passaram a ser resistentes a estes medicamentos, sendo necessário a busca por novos meios terapêuticos. Os extratos de plantas, como a *Echinacea purpurea* vem se mostrando promissores para tratamentos contra infecções parasitárias, por ser anti-inflamatórios, imunomoduladores e citotóxicos (JUNIOR, et al. 2016).

O estudo objetivou a avaliação das células caliciformes presentes no jejuno de ratos infectados com *T. gondii* e tratados com *E. purpurea*.

Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pela CEAU-UEM (protocolo 7633021018). Foram utilizados 42 *Rattus norvegicus* machos com 21 dias de vida. Receberam antiparasitário por via oral (500 mg/Kg de suspensão de Metronidazol/5 dias e 50 mg/Kg de suspensão de Fembendazol em dose única). Foi realizado o exame parasitológico 7 dias após esse tratamento e verificado a ausência de parasitoses. Em seguida os ratos foram separados aleatoriamente em 6 grupos (n=7) sendo GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP (Grupo não infectado e tratado com *Echinacea purpurea*), GI-EP (Grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea*), GC-P (Grupo não infectado e tratado com pirimetamina) e GI-P (Grupo infectado e tratado com pirimetamina).

Os grupos GC-EP e GI-EP receberam 100mg/kg de *Echinacea purpurea* por 28 dias antes e 28 dias depois da infecção por via oral. Os GC-P e GI-P foram tratados com 12,5 mg/kg de pirimetamina pela mesma via e o GC e GI-NT receberam solução salina estéril. Os grupos infectados

receberam 500 oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) por gavagem. Todos os ratos foram mantidos em temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com foto-período de 12 horas, recebendo ração padrão para roedores (Nuvilab, Colombo, PR, BR) e água filtrada.

Após o período de experimentação, todos os ratos foram submetidos a eutanásia, o jejuno foi coletado e fixado em paraformaldeído tamponado 4%, depois incluído em parafina para obter cortes semiseriados de 4 μm em lâminas de vidro. Sofreram a desparafinização e a coloração de Alcian blue 1.0 para evidenciar células caliciformes sulfomucinas e o Alcian blue 2.5 para evidenciar as células caliciformes sialomucinas.

A contagem das células caliciformes foi realizada em microscópio óptico na lente objetiva de 40x. Foram contados 16 campos com 160 células epiteliais intestinais e células caliciformes presente entre elas por animal, totalizando 2560 células epiteliais. Posteriormente foi calculado a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais para análise estatística, utilizando o teste ANOVA por meio do software GraphPad Prism 5.01. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A contagem de células caliciformes demonstrou que houve aumento na quantidade destas células nos grupos GI-NT, em comparação ao GC, e aumento no GI-EP em comparação com o GC e GI-NT. No GI-P estas células reduziram em comparação ao GC, GI-NT e GI-EP na técnica de AB 1.0, e em comparação ao GI-NT na técnica de AB 2.5 (tabela 1).

Tabela 1. Média \pm desvio padrão da proporção de células caliciformes (CCs) coradas em Alcian Blue 1.0 e 2.5 no jejuno de ratos do grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), Grupo não infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GC-EP), Grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GI-EP), Grupo não infectado e tratado com pirimetamina (GC-P) e Grupo infectado e tratado com pirimetamina (GI-P). Os grupos GI-NT, GI-EP e GI-P foram infectados com 500 oocistos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH).

	Alcian Blue 1.0	Alcian blue 2.5
GC	26,65 \pm 6,77 ^a	25,54 \pm 6,01 ^a
GI-NT	29,30 \pm 6,50 ^{ab}	30,13 \pm 6,19 ^{ab}
GC-EP	29,74 \pm 5,24 ^a	25,90 \pm 4,35 ^d
GI-EP	29,80 \pm 5,16 ^{abc}	30,92 \pm 6,28 ^{abcd}
GC-P	28,14 \pm 5,24 ^{ab}	28,66 \pm 4,03 ^{ab}
GI-P	25,53 \pm 4,99 ^{abc}	26,18 \pm 4,81 ^{bc}

Valores seguidos por letras iguais na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

A infecção crônica com *T. gondii* levou ao aumento das CCs elevando a secreção de muco para proteger o órgão de maiores danos (MOAL; SERVIN, 2006), (VICENTINO-VIEIRA, et al. 2017). O tratamento com *E. purpúrea* aumentou ainda mais estas células, evidenciando o importante

papel das mucinas e muco na imunidade da mucosa, auxiliando na seletividade e regulação de microrganismos da microbiota e colaborando na redução ou prevenção de microrganismos patogênicos. Já o tratamento com pirimetamina levou a redução na quantidade de CCs produtoras de sulfomucinas. Estudos demonstram que o muco abundante em sulfomucinas e peptídeos antimicrobianos atribui ao hospedeiro maior proteção a infecções desencadeadas pelo *T. gondii* (VICENTINO-VIEIRA, et al. 2017). Ademais, a secreção de sulfomucina e sialomucina leva a maior fluidez do bolo alimentar que auxilia na limpeza do intestino impedindo que bactérias oportunistas causem mais dano ao epitélio, assim o órgão tenta estabilizar a homeostasia para o bom funcionamento (MOAL; SERVIN, 2006).

Conclusões

O tratamento com *E. purpurea* levou ao aumento da quantidade de células caliciformes secretoras de sialomucinas e sulfomucinas garantindo a proteção e homeostasia do jejuno.

Agradecimentos

Agradeço pela CAPES, CNPq, UEM, UNIPAR, PBF, DCM e ao grupo de pesquisa em neurogastroenterologia.

Referências

GANGNEUX, F. R.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clin. Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

JUNIOR, A. G.; COSMO, M. L. A.; REIS, M. P.; SANTOS, P. S.; GONÇALVES, D. D.; GASPAROTTO, F. M.; NAVARRO, I. T.; LOURENÇO E. L. B. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with diferente strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 115, n. 10, p. 3999-4005, 2016.

MOAL, V. L.; SERVIN, A. L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. **Clin. Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 315-337, 2006.

VICENTINO-VIEIRA, S. L.; GÓIS, M. B.; TREVIZAN, A. R.; LIMA, L. L.; LEATTE, E. P.; MELO, G. A. N.; GARCIA, J. L.; ARAUJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. G. M. *Toxoplasma gondii* infection causes structural changes in the jejunum of rats infected with diferente inoculum doses. **Life sciences**, v. 191, p. 141-149, 2017.