

## ANÁLISE DOS MASTÓCITOS DO ÍLEO DE *Rattus norvegicus* APÓS INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea*

Luana Vitoria de Araujo Duarte (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Amanda Gubert Alves dos Santos, Maria José Pastre, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, Claudia Nara de Almeida Lino-Bratti (Co-orientadora), Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo (Orientadora), e-mail: ganmelo2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências da Saúde; Farmácia

**Palavras-chave:** Toxoplasmose, produtos naturais, intestino delgado

### Resumo:

O protozoário *T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose e a infecção pelo parasito ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos, carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais e ainda pela transmissão congênita. Devido às drogas existentes apresentarem efeitos indesejáveis a longo prazo, novas opções terapêuticas vêm sendo estudadas para o tratamento da infecção, como extratos de plantas. Dentre as plantas podemos citar a *E. purpurea* que vem apresentando bons resultados frente a infecção por *T. gondii*. O íleo, última parte do intestino delgado, especializado em absorção, possui vilos e criptas, e, na lâmina própria, células imunes. Os mastócitos estão na linha de frente do intestino contra infecções. Este estudo visou quantificar os mastócitos presentes no íleo de ratos (*Rattus norvegicus*) infectados por *T. gondii* e ao tratamento com *E. purpurea*. Para isso foram utilizados 24 ratos divididos em dois grupos (n=12), sendo um grupo controle (GC), grupo controle tratado (GC-EP), grupo infectado (GI) e grupo infectado tratado (GI-EP). Após o período experimental, os animais foram submetidos a eutanásia e o íleo de cada animal coletado, fixado e corados por azul de toluidina. A contagem foi realizada em microscópio óptico em 100 campos aleatórios, na objetiva de 100x. Não obteve-se aumento significativo dos mastócitos, porém pode-se observar uma influência da infecção sobre o número de mastócitos.

### Introdução

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasito intracelular obrigatório *T. gondii*. A contaminação ocorre através da ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água contaminada, ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais ou ainda de forma congênita (NEVES *et al*, 2019).

Uma vez ingerido, o *T. gondii* chega ao trato gastrointestinal e pode cruzar rapidamente a barreira epitelial do lúmen intestinal e ser encontrado na superfície do epitélio e na lâmina própria do intestino (PASTRE *et al.* 2019) desencadeando a resposta imune inata, que recruta entre outras células, os mastócitos, as principais células efetoras de inflamação no intestino que tem como uma de suas funções a proteção do órgão, impedindo maiores danos à entrada de vírus, bactérias e parasitos (BISCHOFF *et al.*, 2012).

O intestino delgado é dividido em três segmentos distintos: duodeno, jejuno e íleo, que juntos realizam a função de secreção, digestão e absorção (JUNQUEIRA, *et al.*, 2017). Estudo envolvendo a infecção por oocistos de cepa de genótipo II de *T. gondii* no jejuno de ratos demonstrou um aumento significativo no número de mastócitos 6 horas após a infecção (PASTRE *et al.*, 2019).

Devido aos casos assintomáticos da doença e ao fato das drogas utilizadas no tratamento mostrarem-se tóxicas quando usadas por tempo prolongado, o tratamento só é recomendado em alguns casos, como em gestantes e pacientes imunossuprimidos (NEVES *et al.*, 2016).

Portanto, estudos envolvendo extratos vegetais e de plantas vêm sendo realizados nos últimos anos, procurando encontrar melhores formas de tratamento para essa infecção. Dentre as plantas estudadas, está a *Echinacea purpurea* (EP), capaz de induzir efeitos imunomoduladores, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antioxidantes, citotóxicos e que vem apresentando bons resultados frente a infecção por *T. gondii*, reduzindo o número de taquizoítos no fluido peritoneal e nas impressões hepáticas de camundongos (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2016).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente as possíveis alterações dos mastócitos no íleo de ratos infectados cronicamente ou não com oocistos da cepa RH de *T. gondii* e tratados ou não com *E. purpurea*.

## Materiais e métodos

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob nº 7633021018. Foram utilizados 24 ratos linhagem Wistar (n=12) obtidos do Biotério Central da UEM.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: um grupo tratado com *E. purpurea* por 28 dias e o segundo, com água fervida. Após esse período, seis animais de cada grupo (tratado e não tratado) receberam 1 mL de suspensão oral contendo 500 oocistos esporulados de cepa RH de *T. gondii*, enquanto os demais (controles) receberam apenas água fervida. Sete dias após a infecção, os grupos que haviam sido tratados previamente, continuaram sendo tratados com a mesma quantidade de *E. purpurea* por mais 28 dias e os grupos não tratados receberam água fervida. Assim, foram formados 4 grupos: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI); Grupo controle tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GC-EP) e Grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GI-EP). Os animais foram mantidos

em biotério com temperatura controlada e fotoperíodo de 12 horas, recebendo ração e água à vontade.

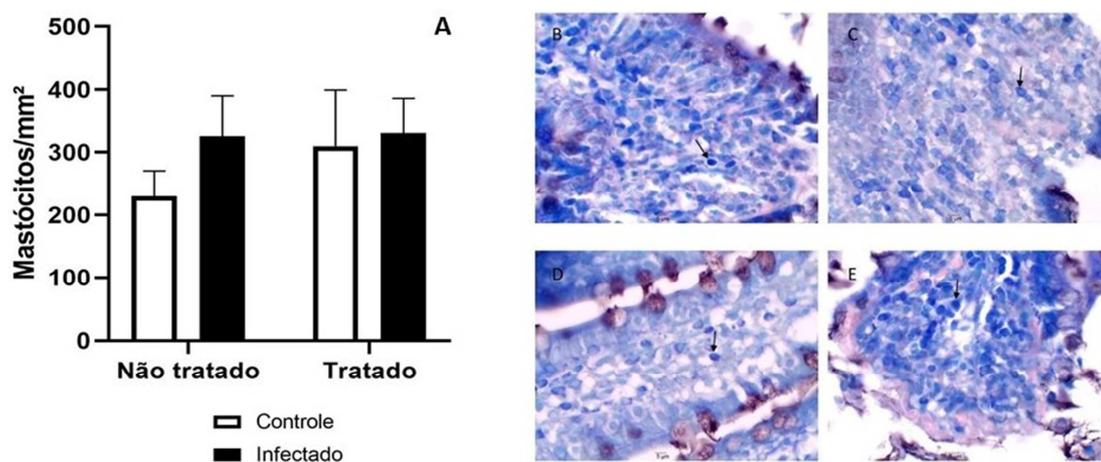
Com o término do período experimental, todos os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico. Após laparotomia, o íleo desses animais foi coletado e anéis de 1 cm foram utilizados para o processamento histológico. Após fixação em paraformaldeído 4% e inclusão em parafina, foram obtidos cortes semi-seriados de 4 µm que foram corados pela técnica de azul de toluidina para evidenciar os mastócitos.

A análise foi realizada em microscópio óptico, onde foram contados todos os mastócitos presentes em 100 campos microscópicos aleatórios utilizando objetiva de 100x. Os dados foram expressos em mm<sup>2</sup>.

A análise foi definida de acordo com a distribuição de dados pelo teste de Shapiro-Wilk no software BioEstat (versão 5.3). Os dados foram comparados pelo teste de Análise de Variância de duas vias seguido do pós-teste de Tukey (GraphPad Prism versão 8.0.1) e representados pela média ± desvio padrão. No teste foi considerado  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, as análises realizadas pelo teste ANOVA duas vias revelaram um efeito principal significativo para a infecção [(1,20) = 4.67,  $p = 0,0429$ ] figura 1.



**Figura 1** – (A) Número total de mastócitos/mm<sup>2</sup>; (B) Fotomicrografia do íleo de rato do grupo controle, (C) grupo infectado, (D) grupo controle tratado com *E. purpurea* e (E) grupo infectado e tratado com *E. purpurea*. Aumento de 100x, barra de escala de 5 µm.

Tendo em vista que após a ingestão, o *T. gondii* chega ao trato gastrointestinal e pode cruzar rapidamente a barreira epitelial do lúmen intestinal (PASTRE *et al.* 2019), uma intensa resposta imune é ativada, recrutando células como os mastócitos para proteger o intestino de maiores danos causados pelo parasito (BISCHOFF *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a EP tem sido usada há anos por seu efeito imunomodulador em diferentes processos infecciosos, inclusive naqueles

causados por protozoários. No entanto, o seu uso na infecção causada pelo *T. gondii* só foi verificado recentemente, em estudo envolvendo a infecção por cepas de genótipo I e II em camundongos e os resultados do mesmo sugerem importantes atividades protetoras da EP contra a infecção (GASPAROTTO JUNIOR *et al*, 2016).

Embora Pastre e colaboradores (2019) tenham encontrado mastocitose na infecção aguda por cepa de genótipo II de *T. gondii* no jejuno de ratos e Gasparotto Junior e colaboradores (2016) sugiram um efeito protetor da EP sobre a infecção aguda causada por cepas de diferentes genótipos, em nosso estudo, na infecção crônica por cepa de genótipo I e tratamento por 28 dias com EP não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

## Conclusões

Apesar de não ter aumentado significativamente, os nossos resultados demonstraram uma influência da infecção crônica por cepa RH de *T. gondii* sobre o número de mastócitos no íleo de ratos Wistar. Novos estudos são necessários para o melhor entendimento das alterações intestinais durante a infecção e ao tratamento com EP.

## Agradecimentos

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária, UEM, PBF e ao grupo de Neurogastroenterologia/UEM.

## Referências

BISCHOFF, S.C. et al. Food allergy and gastrointestinal syndromes. **J. allergy clin immunol**, v. 125, p. 287-303, 2012.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et. Al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3999-4005, out. 2016.

JUNQUEIRA, L.C.U. et al. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

PASTRE, M.J. et al. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108797, 2019.