

ANÁLISE DE MASTÓCITOS NO JEJUNO DE WISTAR COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS COM *Echinacea purpurea*

Bruna Micheli Amaral Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Bruna Cristina Pagliarini (PIBIC/CNPq/FA/Uem) Mariana Buranelo (Coautor) Maria José Pastre (Coorientador), Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientador), e-mail: dmgsantana@gmail.com

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

Área do conhecimento: Ciências Biológicas
Subárea: Morfologia

Palavras-chave: Toxoplasmose, intestino, tratamento

Resumo:

O *Toxoplasma gondii* é o parasito causador da toxoplasmose. Através da infecção oral, o parasita transpõe a barreira intestinal para se disseminar. Os mastócitos são células imunorreguladoras. Atualmente o tratamento da toxoplasmose é realizado com o uso da pirimetamina. Já a *Echinacea purpurea* é um importante imunostimulante e anti-inflamatório. Foram utilizados 42 ratos Wistar (n=6), distribuídos em grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), grupo não infectado e tratado com pirimetamina (GC-P), grupo infectado e tratado com pirimetamina (GI-P), grupo não infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GI-EP). Os grupos infectados foram inoculados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH) via oral. Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg *Echinacea purpurea* 28 dias antes e depois infecção e os ratos dos grupos GC-P e GI-P receberam 12,5 mg/Kg de pirimetamina após a infecção. Os ratos foram mortos e os jejunos retirados. Foi realizado o processamento histológico, a coloração de Azul de toluidina e a contagem e análise estatística. Houve redução no número de mastócitos do GI-NT, GC-EP e GI-EP em relação ao GC. Os grupos GC-P, GI-P, GC-EP e GI-EP demonstraram um aumento em relação ao GI-NT e, o GI-EP evidenciou uma diminuição em relação ao GI-P. Conclui-se que a infecção crônica por *T. gondii* reduz o número de mastócitos no jejuno de ratos Wistar. No entanto, o tratamento com pirimetamina e *E. Purpurea* eleva a quantidade de mastócitos nos animais infectados.

Introdução

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasito causador da toxoplasmose, infecção parasitária difundida em todo o planeta. O *T. gondii* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, onde, os felídeos são os hospedeiros definitivos e os seres humanos e outros animais domésticos ou silvestres são os hospedeiros intermediários. De modo geral, sua infecção é dada por via oral, com a ingestão de alimentos ou água contaminada e, ao chegar no intestino, o *T. gondii* necessita transpor a barreira intestinal para se disseminar pelo organismo, esse evento causa um estado de alerta na mucosa marcado principalmente pela migração de linfócitos locais (PITTMAN & KNOLL, 2015). Os mastócitos são células com importante função imunorreguladora, principalmente na mucosa gastrointestinal e participam da reação inflamatória (RAMSAY, 2010). Na atualidade, o tratamento da toxoplasmose se dá pelo uso de pirimetamina combinado com sulfadiazina, porém, o uso excessivo dessas drogas acarretou a seleção de cepas resistentes do *T. gondii* (RADKE et al., 2018). Por sua vez, a *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*), é uma planta já conhecida como importante imuno-estimulante e com papel anti-inflamatório e vem apresentando resultados promissores em estudos in vitro e in vivo com camundongos (KUMAR & RAMAIAH, 2011). No presente estudo, objetivou-se analisar o número de mastócitos presentes na mucosa jejunal de ratos Wistar submetidos a infecção crônica por *T. gondii* e tratados com *Echinacea purpurea*.

Materiais e métodos

Delineamento Experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob parecer nº 7633021018. Foram utilizados 42 ratos Wistar, machos (n=6), com 94 dias de vida, distribuídos em grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), grupo não infectado e tratado com pirimetamina (GC-P), grupo infectado e tratado com pirimetamina (GI-P), grupo não infectado e tratado com *E. purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GI-EP). Os grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) por via oral. Os animais foram mantidos em biotério setorial com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6h - 18h), ração padrão e água filtrada ad libitum. A infecção foi confirmada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg de *E. purpurea*, 28 dias antes e 28 depois da infecção diariamente por via oral. A *E. purpurea* foi preparada a fresco em concentração de 4% de extrato aquoso em 100 mL de água destilada e os ratos dos grupos GC-P e GI-P receberam doses de 12,5 mg/Kg de pirimetamina após a infecção. Os ratos dos grupos GC e GI-NT receberam água fervida pela mesma via.

Coleta de amostra e processamento histológico

Todos os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de Isoflurano e, após laparotomia vertical, o jejuno foi retirado e fixado paraformaldeído tamponado a 4%. Depois, foram realizados cortes transversais semi-seriados de 4 μm do jejuno de cada animal, utilizando o micrótomo. Esses cortes foram dispostos em lâminas de vidro, passaram por baterias de desparafinização e corados pela técnica de Azul de Toluidina, que permite a evidenciação de mastócitos totais.

Contagem dos mastócitos e análise estatística

A contagem dos mastócitos foi realizada diretamente em microscópio óptico, realizando a contagem em 100 campos microscópicos observados na lente objetiva de 100x. A análise estatística foi realizada por meio do *software* GraphPad Prism 5.01. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Os dados apresentaram distribuição normal e foram apresentados em média \pm desvio padrão. Foi realizado o teste de variância Anova e o pós teste de Tukey's para comparar os grupos. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

A infecção foi confirmada pela imunofluorescência indireta que detectou a presença de IgG Anti-*T. gondii* no sangue dos animais infectados e, resultado negativo para os animais não infectados.

Os mastócitos estão envolvidos na resposta ao *T. gondii* e desempenham várias funções necessárias para a homeostase contribuindo para o controle da barreira intestinal (FERREIRA et al., 2004). No presente estudo, observou-se uma redução no número de mastócitos no grupo GI-NT ($540.8 \pm 69.60 \text{ mm}^2$) em relação ao GC ($725.1 \pm 124.1 \text{ mm}^2$), que pode ter ocorrido devido a manutenção na barreira epitelial após a passagem do parasita. Houve, ainda, redução nos grupos GC-EP ($594.8 \pm 66.23 \text{ mm}^2$) e GI-EP ($614.6 \pm 83.70 \text{ mm}^2$) em relação ao GC, que pode ser explicado pela ação anti-inflamatória da *E. purpurea* (KUMAR & RAMAIAH, 2011). Pode-se notar também um aumento na quantidade de mastócitos em todos os grupos tratados, GC-P ($775.5 \pm 59.03 \text{ mm}^2$), GI-P ($774.7 \pm 92.98 \text{ mm}^2$), GC-EP e GI-EP, em relação ao GC, isso indica uma resposta inflamatória mais eficiente, pois quando ativados, os mastócitos secretam mediadores inflamatórios na mucosa intestinal (RAMSAY, 2010). Entretanto, observou-se aumento no número de mastócitos no grupo GI-P em relação ao GI-EP, o que pode indicar que a pirimetamina induz maior produção de mastócitos (Os resultados são demonstrados nas figuras 1 e 2).

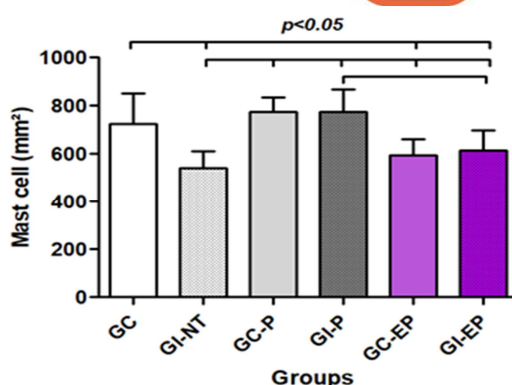


Figura 1 - Contagem de mastócitos por mm² corados pela técnica de Azul de Toluidina.

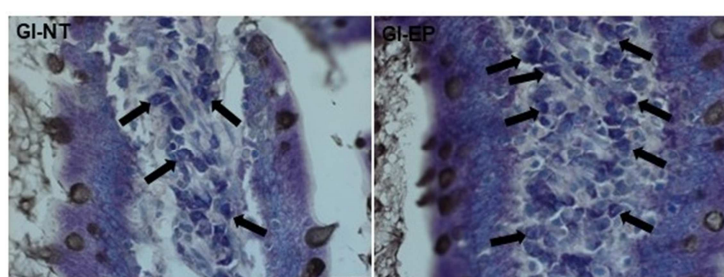


Figura 2 - Fotomicrografias da coloração de azul de toluidina no jejuno de ratos, demonstrando aumento no número de mastócitos no GI-NT em comparação ao GI-EP. As setas pretas indicam os mastócitos.

Conclusões

Conclui-se que a infecção crônica por *T. gondii* reduz o número de mastócitos no jejuno de ratos Wistar. No entanto, o tratamento com pirimetamina e *E. Purpurea* eleva a quantidade de mastócitos nos animais infectados, demonstrando ação na defesa do hospedeiro. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender melhor a atividade desses compostos diante da infecção pelo *T. gondii* no jejuno de ratos.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica e ao Departamento de Ciências Morfológicas da UEM onde o trabalho foi desenvolvido.

Referências

KUMAR, K. M.; RAMAIAH, S. PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF *ECHINACEA PURPUREA*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 304–314, 2011.

PITTMAN, K. J.; KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma*

gondii during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 79, n. 4, p. 387–401, 2015.

RADKE, J. B. *et al.* Evaluation of current and emerging anti-malarial medicines for inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in vitro. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 8, p. 1264-1274, 2018.

RAMSAY, D. B, *et al.* Mast cells in gastrointestinal disease. **Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 12, p. 772, 2010.

FERREIRA, G. L. S. *et al.* *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions in vivo and in vitro: experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Microbes and infection**, v. 6, n. 2, p. 172-181, 2004.