

ANÁLISE DAS FIBRAS ELÁSTICAS DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATAMENTO 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@uem.br.

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

Área e subárea: morfologia e histologia

Palavras-chave: fibrina, parasitose, zoonose

Resumo:

A toxoplasmose é uma disbiose intestinal de ampla distribuição, causada pelo *Toxoplasma gondii*, levando a um desarranjo nas estruturas do intestino, como as fibras elásticas, cuja função é atribuir flexibilidade ao órgão. Com o surgimento de cepas resistentes, faz-se necessário a busca de novos tratamentos. A *Echinacea purpurea*, possui propriedades imunoestimulante e anti-inflamatória. Foram utilizados 28 ratos ($n = 7$), distribuídos aleatoriamente em grupos controle não infectado e não imunoestimulado (GC), grupo infectado e não imunoestimulado (GI-NT), grupo controle e imunoestimulado com *E. purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GI-EP). Os grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii* por via oral. Os grupos imunoestimulados receberam 100 mg/Kg de *E. purpurea*, por 28 dias antes e depois da infecção. Após o período experimental os animais foram mortos, coletados e mensurados os jejunos, fixados e posteriormente incluídos em parafina para realização de cortes transversais semiseriados de 4 μm depositados em lâminas. Depois foram desparafinizados e corados por Fucsina-Resorcina de Weigert, evidenciando as fibras elásticas. Em seguida, foram capturadas 32 imagens em lente objetiva de 40x e mensurada a área ocupada (μm^2) por fibras elásticas. Realizou-se o teste ANOVA ($p < 0,05$). Ocorreu a redução das fibras elásticas do GI-EP em comparação ao GC. A infecção crônica por *T. gondii* e a imunoestimulação com *E. purpurea* levou a redução da porcentagem de fibras elásticas ($\%/\mu\text{m}^2$) na tela submucosa do jejuno.

Introdução

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório cosmopolita, com alta taxa de infecções na população humana. Sendo a ingestão de alimentos e água contaminados sua principal forma de transmissão. Seu ciclo sexual

ocorre no interior dos enterócitos intestinais dos felídeos, fazendo com que liberem milhares de oocistos em suas fezes. Em outros animais que ingerem os oocistos, ocorre seu ciclo assexuado, com o rompimento dos oocistos no intestino delgado, liberando esporozoítos e bradizoítos que infectam as células intestinais e se diferenciam em taquizoítos, sendo a fase aguda da doença. Após a sua difusão pelo corpo do hospedeiro, os taquizoítos formam os cistos teciduais para se protegerem, caracterizando a fase crônica (GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

O intestino delgado é o local de absorção de nutrientes, tendo contato direto com diversos compostos e microrganismos, com estrutura que garante funcionamento e proteção e possuindo um epitélio simples justapostos com células secretoras e absorptivas (GANGNEUX, DARDÉ, 2012). Abaixo dele há presença de tecido conjuntivo com células imunes, fibras colágenas, que conferem força e resistência a trações e flexibilidade ao tecido durante os movimentos peristálticos realizados pela camada muscular (ASTRAND, et al. 2011) e feixes de fibras elásticas que se estendem em direção à túnica mucosa e envolvem a base das glândulas intestinais (MELLO, E. V. S. L.; MIRANDA, NETO, M. H.; NATALI, 1996).

A primetamina combinada com sulfadiazina é utilizada para o tratamento da toxoplasmose, por atuarem como inibidores enzimáticos bloqueando a síntese de DNA do *T. gondii*. Porém, muitas cepas passaram a ser resistentes ao tratamento, sendo necessária a busca de novos meios terapêuticos. O uso de imunostimuladores advindos de extratos florais, como a *Echinacea purpurea*, possui características anti-inflamatórias, citotóxicas e imunomoduladoras que podem atuar contra infecções parasitárias intestinais (JUNIOR, et al. 2016). Este estudo objetivou a avaliação das fibras elásticas presentes na tela submucosa do jejuno de ratos infectados por *T. gondii* e imunostimulados com *E. purpurea*.

Materiais e métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, nº 7633021018. Foram utilizados 28 *Rattus norvegicus* com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Posteriormente foi realizado o tratamento antiparasitário por via oral (500 mg/Kg de suspensão de Metronidazol/5 dias e 50 mg/Kg de suspensão de Fenbendazol em dose única). Após o período de 7 dias foi realizado exame parasitológico de fezes, para verificação da ausência de parasitos.

A partir dos 33 dias de vida, os ratos foram distribuídos aleatoriamente (n = 7) em 4 grupos: grupo controle não infectado e não imunostimulado (GC), grupo controle infectado e não imunostimulado (GI-NT), grupo controle não infectado e imunostimulado *Echinacea purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e imunostimulado com *Echinacea purpurea* (GI-EP). Os grupos imunostimulados (GC-EP e GI-EP) receberam 100 mg/Kg *Echinacea purpurea* a fresco em concentração de 4% de extrato aquoso em 100 mL de água destilada por 28 dias antes da infecção e 28 dias depois. Os ratos dos

grupos não imunoestimulados (GC e GI-NT) receberam água fervida no mesmo período. Já os grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, genótipo I) ressuspensos em 1 mL de solução salina estéril por via oral, enquanto que os não infectados 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, recebendo ração padrão (Nuvilab, Colombo, PR, BR) e água filtrada *ad libitum*.

Para confirmação da infecção dos animais, foi realizado a coleta de sangue da cauda e realizado o teste de aglutinação direta, para verificação da presença de anticorpo IgG anti-*T. gondii*, considerando positivo títulos acima de 25.

Após o período experimental todos os ratos foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano. Foi realizada uma laparotomia vertical, retirado e mensurado o jejuno em relação a sua largura e comprimento. Foi coletado anéis de 2 cm do jejuno e fixados em paraformaldeído tamponado a 4% por 6 horas. Em seguida, foram incluídos em parafina, realizado cortes transversais semi-seriados de $4 \mu\text{m}$ e depositados sobre lâminas de vidro. Os cortes sofreram desparafinização e foram corados pela técnica de Fucsina-Resorcina de Weigert, permitindo a visualização de fibras elásticas. Foram capturadas 32 imagens por animais em lente objetiva de 40x com auxílio de uma câmera digital (Pro series 3CCD camera) acoplada no microscópio óptico (Olympus BX50). Foi mensurada a área ocupada (μm^2) por fibras elásticas evidenciadas pela coloração na tela submucosa do jejuno. A análise foi realizada no software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

Foi realizado o teste de D'Agostino-Pearson para verificação da distribuição dos dados e teste ANOVA seguido de Tukey. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A análise das fibras elásticas demonstrou que houve redução em todos os grupos, porém apenas o GI-EP apresentou significância ($p < 0,05$).

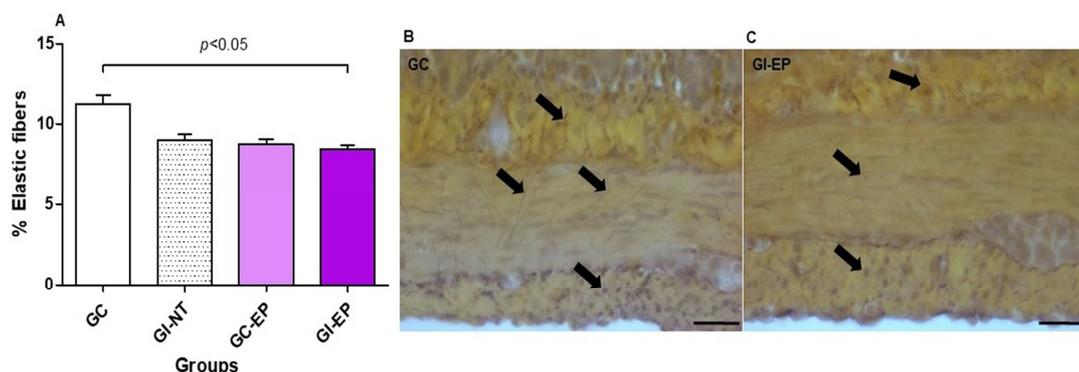


Figura 2. Análise quantitativa de fibras elásticas. Média \pm desvio padrão do percentual de fibras de elásticas, por área analisada ($\%/\mu\text{m}^2$), no jejuno de ratos do grupo controle (GC),

grupo infectado e não imunoestimulado (GI-NT), grupo controle e imunoestimulado com *Echinacea purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e imunoestimulado com *Echinacea purpurea* (GI-EP). (A) Gráfico da análise do percentual das fibras elásticas (n=7) presentes no jejuno. $p < 0,05$. Fotomicrografias representativas demonstrando a distribuição das fibras elásticas no jejuno de ratos (B) GC e (C) GI-EP indicada por setas. Técnica histoquímica para coloração de Fucsina-Resorcina de Weigert. Lente objetiva de 40x; barra de 40 μm .

Acreditamos que o processo inflamatório decorrente da infecção crônica por *T. gondii* pode ter levado a degradação de fibras elásticas, corroborando com Astrand et al. (2011), que relata processos degradativos das fibras elásticas ocorre naturalmente durante a vida, e que suas proporções são alteradas por outros componentes, como o colágeno. Além desse processo, o sistema imune atua na reorganização extracelular, principalmente os macrófagos possuem função de mediação na degradação da elastina (PELLICORO et al. 2012). Assim em tecidos que foram lesados devido uma infecção podem apresentar menor número de fibras elásticas devido os processos inflamatórios que levam a degradação da matriz extracelular para uma fácil transposição das células imunes no tecido.

Conclusões

A imunoregulação com *E. purpurea* associada a infecção crônica por *T. gondii* levou a redução na proporção de fibras elásticas na tela submucosa do jejuno de ratos, diminuindo a flexibilidade do órgão.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES, CNPq, UEM, PBF, DCM e equipe de neurogastroenterologia.

Referências

- ASTRAND, H. et al. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 1, p. 176–187, 2011.
- 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.
- MELLO, E. V. S. L.; MIRANDA, NETO, M. H.; NATALI, M. R. M. Morfologia Do Colo Proximal De Ratos. **Unimar**, v. 18, p. 369-386, 1996.

PELLICORO, A. et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. **Hepatology**, n. 55, v. 6, p. 1965-75, 2012.