

AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE COLÁGENO NO DUODENO DE *Rattus norvegicus* COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS COM *Echinacea purpurea*

Bruna Micheli Amaral Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Mariana Buranelo (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, colágeno.

Resumo:

O *Toxoplasma gondii* é o parasito causador da toxoplasmose. Através da infecção oral, o parasita transpõe a barreira intestinal para se disseminar. O colágeno é a proteína mais abundante no organismo e no intestino, predomina-se os tipos I e III. A *Echinacea purpurea* é uma planta já reconhecida como imunoestimulante e pelo seu papel anti-inflamatório. Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* machos (n=6), distribuídos em grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), 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, genótipo I) via oral. Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg *Echinacea purpurea* por 28 dias antes e depois da infecção. Os ratos foram mortos e os duodenos retirados. Foi realizado o processamento histológico e a coloração pelas técnicas de Picro Sirius Red. As fibras colágenas tipo I e III foram quantificadas pela área polarizada em vermelho e verde, respectivamente. Houve aumento na área ocupada pelo colágeno tipo I nos animais do grupo GI-EP em relação ao GC, GI-NT e GC-EP e no grupo GC-EP em relação a GC. Na área do colágeno tipo III foi observado redução no grupo GC-EP em relação ao GC, no entanto, ocorreu um aumento no grupo GI-EP em relação ao GC-EP. Concluímos que a infecção pelo *T. gondii* e o tratamento com *E. purpurea* pode influenciar na remodelação do colágeno estrutural.

Introdução

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasito causador da toxoplasmose, infecção parasitária difundida em todo o planeta. 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 (PITTMAN; KNOLL, 2015). O duodeno é o primeiro segmento do

intestino delgado, local onde ocorre a maior liberação de esporozoítos de *T. gondii* (SPENCE; LAUF; SHROYER, 2012). O colágeno é o tipo de proteína mais abundante no organismo e está presente entre as túnicas dos diversos segmentos do intestino. Os tipos mais importantes no intestino são o colágeno I e III: o colágeno I está presente no de tecido conjuntivo remodelado e maduro, enquanto o colágeno III, presente em fibras reticulares, tem menor resistência mecânica, sendo encontrado nas fases iniciais da cicatrização de feridas (WYNN; RAMALINGAM, 2013). 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 imunostimulante 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 avaliar a distribuição dos colágenos tipo I e tipo III no duodeno de *Rattus norvegicus* submetidos a infecção crônica por *T. gondii* e tratados com *E. 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 24 *Rattus norvegicus*, *Wistar*, machos (n=6), distribuídos em grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), grupo não infectado e tratado com *Echinacea 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. 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. Foram utilizadas as partes aéreas floridas da *E. purpurea* que foram secas ao ar livre a 37 °C por 5 dias, após, este material foi ressuscitado a fim de preparar o extrato aquoso em concentração de 4% em 100 mL de água destilada que foi preparada e filtrada imediatamente antes da administração. Os ratos dos grupos GC e GC-INT receberam água fervida pela mesma via.

Coleta de amostra e processamento histológico

Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de Isoflurano. Foram coletados anéis de 1 cm do duodeno e fixados em paraformaldeído tamponado a 4%. Depois, foram realizados cortes transversais semi-seriados de 4 µm do duodeno de cada animal. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro, passaram por baterias de desparafinização e foram corados pelas técnicas de Picro Sirius Red para análise dos colágenos tipo I e tipo III.

Análise de fibras colágenas totais, do tipo I e do tipo III

Foram capturadas 16 imagens por animal com auxílio de uma câmera acoplada (Roper Scientific Photometrics®) a um microscópio óptico (Olympus®) na 46 objetiva de 20x associada a um polarizador de luz (Olympus®). As fibras colágenas tipo I e III foram quantificadas pela área polarizada em vermelho e verde, respectivamente, na tela submucosa em μm^2 , com o auxílio do *software* Image Pro Plus®.

Para estatística, foi utilizado o *software* Bioestat 5.3®. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste D'Agostino-Pearson. Os dados apresentaram distribuição livre e, portanto, foram apresentados em mediana e percentis (Mediana; P25; P75). Foram realizados o teste de variância Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparar os grupos. O nível de significância utilizado é 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.

No presente estudo, observou-se um aumento na área ocupada pelo colágeno tipo I nos animais do grupo GI-EP (11,82 (9,77; 15,78) mm^2) em relação ao GC (8,22 (5,71; 11,34) mm^2), GI-NT (8,78 (6,16; 12,42) mm^2) e GC-EP (10,63 (7,07; 14,09) mm^2) e no grupo GC-EP em relação a GC. Na área do colágeno tipo III foi observado redução no grupo GC-EP (6,98 (5,61; 8,56) mm^2) em relação ao GC (10,28 (7,39; 14,26) mm^2), no entanto, ocorreu um aumento no grupo GI-EP (9,06 (7,14; 12,46) mm^2) em relação ao GC-EP (Figura 1).

O tratamento com *E. purpurea* resultou na remodelação das fibras de colágeno do tipo I e tipo III no duodeno. Essas alterações relacionadas ao tratamento com *E. purpurea* demonstram uma possível capacidade em estimular a remodelação colágena, além de ser capaz de ocasionar regeneração ou cicatrização e estimular fibroblastos na produção de colágeno durante o tratamento da infecção por *T. gondii*, uma vez que a fibrogênese normalmente ocorre em doenças inflamatórias intestinais para reparar o tecido lesado (PRINCIPI et al., 2013).

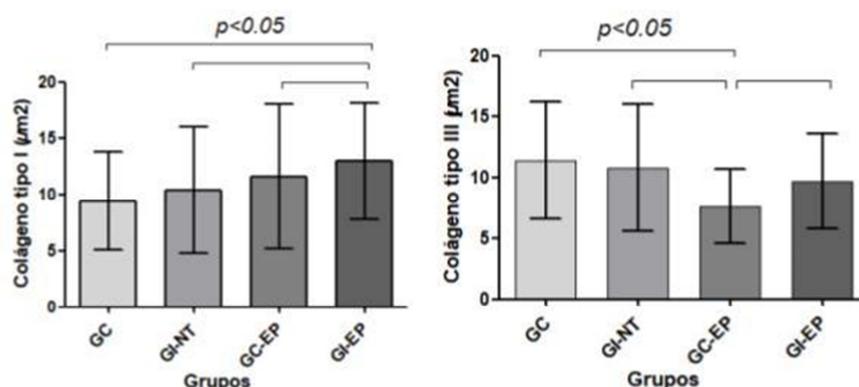


Figura 1 - Gráfico demonstrando as alterações na área ocupada pelo colágeno tipo I e tipo III no duodeno de ratos infectados cronicamente por *T. gondii* e tratados com *E. purpurea* ($p < 0,05$).

Conclusões

Concluimos que o tratamento com *Echinacea purpurea* pode influenciar na remodelação do colágeno estrutural em animais infectados cronicamente por *Toxoplasma gondii*.

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, n. 4, p. 304-14, 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.

PRINCIPI M, GIORGIO F, LOSURDO G, et al. Fibrogenesis and fibrosis in inflammatory bowel diseases: Good and bad side of same coin? **World J Gastrointest Pathophysiol** 2013; 4: 100-107. PURUSHOTHAMAN et al., 2013.

RADKE, J. et al. Evaluation of current and emerging anti-malarial medicines for inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in vitro. **ACS Infectious Diseases**, p. acsinfecdis.8b00113, 2018.

SPENCE, J. R.; LAUF, R.; SHROYER, N. F. Vertebrate Intestinal Endoderm Development. **NIH Public Access**, v. 240, n. 3, p. 501–520, 2012.

WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**. v. 18, n.7, p. 1028-1040, 2013.