

ANÁLISE DOS PLEXOS ENTÉRICOS DE RATOS INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii* TRATADOS COM EXTRATO AQUOSO de *Echinacea purpurea*

Vinícius França Scanavaca, Claudia Nara de Almeida Lino-Bratti, Emerson Luiz Botelho Lourenço, Maria José Pastre, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana. E-mail: ra118008@uem.br.

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

Ciências da Saúde/Parasitologia.

Palavras-chave: Toxoplasmose; neurônios entéricos; plantas medicinais.

RESUMO

A toxoplasmose apresenta alta prevalência no Brasil e é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Estudos sobre tratamentos alternativos à base de extratos naturais e plantas medicinais têm apresentado resultados positivos contra infecções parasitárias, como o uso de extrato aquoso de *Echinacea purpurea*. *T. gondii* infecta o hospedeiro através do intestino. Porém, estudos sobre alterações morfológicas e morfométricas intestinais em casos de toxoplasmose tratada com medicamentos naturais são escassos e alguns estudos evidenciam que o parasito pode alterar a forma e a quantidade de neurônios entéricos durante a infecção. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os neurônios entéricos de ratos infectados por *T. gondii* tratados com extrato aquoso de *E. purpurea*, utilizando a técnica de imunohistoquímica em corte histológico. Notou-se uma redução de aproximadamente 15% em neurônios mioentéricos HuC/HuD-IR no grupo infectado devido ao dano persistente, além de diminuição de neurônios nNOS-IR sob efeito da infecção e do tratamento com *E. purpurea*, além do aumento de neurônios 5-HT-IR, evidenciando os efeitos imunomoduladores da *E. purpurea*.

INTRODUÇÃO

Os estudos acerca do uso de plantas medicinais têm ganhado muita atenção nos últimos anos. A área farmacêutica tem buscado novos extratos vegetais para serem utilizados no desenvolvimento de novos fármacos, em uma alternativa natural e com efeitos colaterais reduzidos, comparando-se a medicamentos alopáticos (GASPAROTTO et al., 2016). Várias plantas possuem efeitos antiprotozoários e antihelmínticos, como a *Matricaria chamomilla* e a *E. purpurea* (ELAZAB et al., 2020).

Nesse contexto, o tratamento mais efetivo para toxoplasmose é de base quimioterápica, com alta toxicidade e baixa sensibilidade, afetando apenas a forma taquizoíta do parasito. Dentre as plantas medicinais, a *E. purpurea*, conhecida por seus efeitos anti-inflamatórios e imunoestimulantes, mostra diminuição na carga parasitária de *T. gondii* (GASPAROTTO et al., 2016).

A toxoplasmose, parasitose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, é uma doença de ampla distribuição geográfica que atinge mais de 80% da população em determinados países, sendo o Brasil um dos países que apresenta as maiores taxas de prevalência em todo o mundo (NEVES et al., 2022).

A transmissão desse parasito ocorre tanto por meio da ingestão de oocistos em água ou alimentos crus contaminados, ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida ou ainda pela transmissão congênita. Ao ser ingerido, o parasito chega ao trato gastrointestinal e atravessa a barreira epitelial do intestino delgado, de onde vai para diversos órgãos do corpo, desencadeando resposta inflamatória. Diversos estudos apontam alterações intestinais causadas pela infecção por *T. gondii*, como alterações nas camadas intestinais e alterações morfológicas e quantitativas nos neurônios entéricos. Portanto, é importante entender o papel, tanto da infecção por *T. gondii* quanto do tratamento *E. purpurea*, nos neurônios entéricos, sendo este o objetivo desse trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos que receberam tratamento antiparasitário por via oral (500 mg/kg de suspensão de Metronidazol por cinco dias e 50 mg/kg de suspensão de Fembendazol em dose única). Seis dias após o término do tratamento, a ausência de parasitos foi constatada pelo exame parasitológico de fezes. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n= 6): Grupo Controle (GC), Grupo infectado (GI), Grupo controle tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (EP) e Grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (IEP). Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada e fotoperíodo de 12 horas, recebendo ração padrão para roedores (Nuvilab, Colombo, PR, BR) e água filtrada *ad libitum*.

Os ratos dos grupos EP e IEP foram tratados com 100 mg/kg de *E. purpurea* por gavagem, diariamente, 28 dias antes e 28 dias depois da administração por gavagem de uma suspensão contendo 500 oocistos esporulados da cepa RH (genótipo I) de *T. gondii* nos animais pertencentes aos grupos infectados (GI e IEP). Já aqueles pertencentes aos grupos GC e GI receberam água fervida pela mesma via.

Eutanásia e coleta das amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano, os íleos foram coletados por laparotomia vertical e processados conforme as técnicas histológicas e imunohistoquímicas.

Análises quantitativas e morfométricas de neurônios mioentéricos

Anéis de 1 cm foram utilizados para o processamento histológico. Foram obtidos cortes semi-seriados de 4 µm que foram submetidos a técnica de imunohistoquímica

para a quantificação da subpopulação de neurônios serotoninérgicos, anti-HuC/HuD para a quantificação da população total de neurônios e anti-nNos para a avaliação da subpopulação de neurônios nitrérgicos.

Técnica de imunohistoquímica para marcação de neurônios mioentéricos

Após a obtenção dos cortes, foi realizada técnica para recuperação antigênica utilizando tampão citrato à 92°C em banho-maria. Posteriormente, as lâminas foram expostas aos anticorpos primários: anti-HuC/HuD (Invitrogen®) na diluição de 1:100, anti-nNos (Invitrogen®) na diluição de 1:400 e anti-5-HT (Sigma®) na diluição de 1:100, overnight. Em seguida, foi adicionado polímero conjugado com peroxidase por 30 minutos, que foi posteriormente revelado pela diaminobenzidina (DAB) por 15 minutos. Por fim, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer. As quantificações neuronais foram realizadas em microscópio óptico, onde foram avaliados 35 gânglios mioentéricos aleatórios em objetiva de 40x. Os resultados foram expressos como número de neurônios/gânglio.

Análise estatística

Para a avaliação da normalidade dos dados foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk ou D'Agostino-Pearson no software BioEstat (versão 5.3). Os dados que apresentaram distribuição livre foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prism versão 5) e apresentados por mediana e percentis. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste de Análise de Variância de duas vias seguido do pós teste de Tukey (GraphPad Prism versão 8.0.1) e foram apresentados por média \pm desvio padrão. Para todos os testes foi utilizado $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se uma perda de aproximadamente 15% nos neurônios HuC/HuD-IR no grupo infectado ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Nos neurônios nNos-IR, o teste de ANOVA de duas vias indicou significância para o tratamento [F (1,20) = 5.698 $p = 0,027$] e interação entre as variáveis [F (1,20) = 6.063 $p = 0,023$], observada pela diminuição dos neurônios nNos-IR nos grupos GI e EP quando comparados ao GC. Em contrapartida, houve um aumento de aproximadamente 17% nos neurônios 5-HT-IR do grupo controle tratado ($p = 0,013$) quando comparado ao GC (Figura 1). Esses resultados demonstraram perda de neurônios HuC/HuD-IR do plexo mioentérico, devido ao dano persistente causado pela infecção. Observou-se também uma diminuição dos neurônios mioentéricos nNos-IR sob efeito da infecção por *T. gondii* e do tratamento com *E. purpurea*. O óxido nítrico, neurotransmissor inibitório, tem por função induzir a morte do parasito. Dessa forma, um excesso de óxido nítrico pode levar à perda neuronal por citotoxicidade.

Em contraste, os neurônios mioentéricos 5-HT-IR aumentaram nos dois grupos tratados com *E. purpurea*, indicando um efeito reparador do extrato.

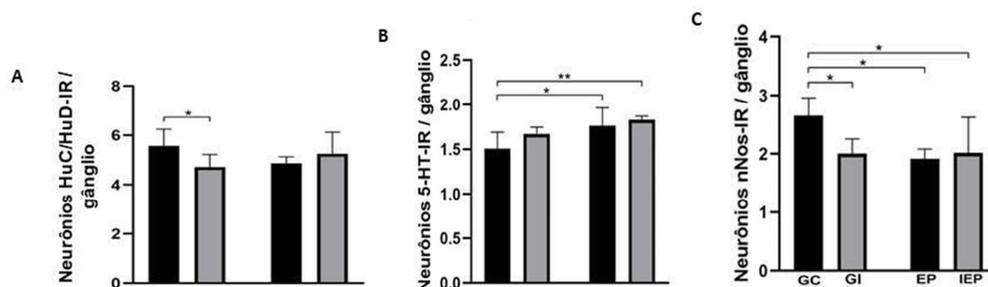


Figura 1. Dados representados por média e desvio padrão. À esquerda, GC (Grupo controle, em preto); GI (Grupo infectado, em cinza); À direita, EP (Grupo controle tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea*, em preto); IEP (Grupo infectado e tratado com *E. purpurea*, em cinza).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram alterações persistentes no sistema nervoso entérico, como a diminuição dos neurônios HuC/HuD-IR e nNos-IR. Também foram constatados os efeitos imunomoduladores da *E. purpurea*, devido ao aumento de neurônios 5-HT-IR e diminuição dos neurônios nNos-IR, indicando também a intensificação dos efeitos causados pela infecção.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, às professoras Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo e Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana e aos membros do laboratório de Neurogastroenterologia.

REFERÊNCIAS

GASPAROTTO A.; et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.** 2016;115(10):3999-4005.

ELAZAB S. T.; et al. Effect of some plant extracts from Egyptian herbal plants against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **J Vet Med Sci.** 2021 Jan 14;83(1):100-107. doi: 10.1292/jvms.20-0458. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33268605; PMCID: PMC7870401.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana.** 14. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2022.