

ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS VIPÉRGICOS NO JEJUNO DE *Rattus norvegicus* INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii* E IMUNOESTIMULADOS COM *Echinacea purpurea*

Henrique Cazanti Sona (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria José Pastre (coorientadora),
Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientador). E-mail: ra113368@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Morfologia.

Palavras-chave: VIP; sistema nervoso entérico; tratamento.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* causa diversas alterações intestinais, levando ao desequilíbrio na homeostase do órgão. Os neurônios vipérgicos atuam na permeabilidade venosa e epitelial, auxiliando no controle imune do órgão. A *Echinacea purpurea* é uma planta que apresenta em seus extratos capacidade anti-inflamatória, antimicrobiana e imunoreguladora. Foram utilizados 24 ratos machos (n=6), divididos em grupo controle (GC), grupo infectado e não imunoestimulado (GI-NI), grupo não infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GI-EP). Os grupos imunoestimulados receberam extrato de *E. purpurea* por 28 dias antes e 28 dias depois da infecção. Grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii*. Posteriormente ao tempo experimental os animais foram mortos, retirado o jejuno, fixado em paraformaldeído, embocado em parafina e posteriormente cortado e depositados os cortes semiseriados em lâminas de vidro que sofreram recuperação antigênica e foram expostos a anticorpo primário anti-VIP (1:400) e revelados por meio de polímero conjugado e DAB. Com os neurônios vipérgicos evidentes, foram contados 50 gânglios do plexo submucoso na lente objetiva de 40x. Foi realizado o teste ANOVA e apresentado como média \pm desvio padrão. Houve aumento do GI-IN e GC-EP em comparação com o controle. Logo, a infecção e a imunoestimulação levam ao aumento nos neurônios vipérgicos do plexo submucoso de jejuno.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das doenças tropicais negligenciadas, causada pelo parasito *Toxoplasma gondii*. A maioria dos casos são assintomáticos, apresentando severidade apenas em pessoas imunodeprimidas ou gestantes, podendo levar a morte e a deformações fetais. O *T. gondii* realiza sua reprodução sexuada e produção de oocistos nos felídeos o qual elimina nas fezes. A contaminação ocorre por meio da ingestão de cistos presentes em carnes ou oocistos na água ou alimentos mal higienizados. Os cistos e oocistos ingeridos rompem-se no interior do

intestino delgado, liberando taquizoítos, formas infectantes, com altas taxas de replicação, caracterizando a fase aguda da doença. Posteriormente com a resposta imune, ocorre o encistamento do parasito nos tecidos nervosos e musculares, podendo ficar nessa forma pelo resto da vida do hospedeiro, sendo esta a fase crônica (DUBEY, 2010).

Na organização intestinal, a tela submucosa é formada por células imunes, tecido conjuntivo e gânglios nervosos do sistema entérico que atuam no controle fisiológico local por meio da liberação de neurotransmissores como o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), responsável por regular a permeabilidade do epitélio intestinal, células imunes e movimentos intestinais (IWASAKI et al., 2019).

O tratamento padrão para toxoplasmose é por meio de pirimetamina e sulfadiazina, ao qual realizam o bloqueio da síntese de DNA do parasito, porém causam reações adversas. Os extratos de plantas vêm demonstrando compostos que podem auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos e terapias complementares. Dentre estes está a *Echinacea purpurea*, com capacidades imuno-estimulantes, anti-inflamatórias e imunoreguladoras podendo auxiliar na plasticidade intestinal após algum dano (KUMAR; RAMAIAH et al., 2011).

Diante disso, o experimento busca a avaliação da quantidade de neurônios vipérgicos presentes na camada submucosa de jejuno de ratos infetados com *Toxoplasma gondii* e imunoestimulados com *Echinacea purpurea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob parecer nº 7633021018. Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* machos com 21 dias de vida, provenientes do Biotério central da UEM. Os animais foram distribuídos aleatoriamente (n=6) em 4 grupos: Grupo controle e não imunoestimulado (GC); Grupo controle infectado e não imunoestimulado (GI-NI); grupo não infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GC-EP) e Grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GI-EP). Os animais foram mantidos em biotério com temperatura e fotoperíodo controlados ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), recebendo ração padrão para roedores (Nuvilab, Colombo, PR, BR) e água filtrada *ad libitum*.

Para a imunostimulação foi utilizado solução de *E. purpurea* a fresco com concentração de 2% de extrato aquoso em 100 mL de água destilada. Os animais do grupo GC-EP e GI-EP receberam *E. purpurea* por via oral por 28 dias antes e 28 dias depois da infecção e os grupos não imunoestimulados receberam solução salina no mesmo período. Os ratos dos grupos infectados (GI-NI e GI-EP) receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) por via oral e os grupos não infectados (GC e GC-EP) receberam apenas solução salina.

Após o período experimental, foi realizada a eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de Isoflurano. Em seguida realizado a laparotomia vertical, coletando o jejuno, que foram fixados em Paraformaldeído tamponado a 4%, posteriormente desidratados e incluídos em parafina para obtenção de corte semi-seriados de 4 μm por meio de micrótomo e dispostos em lâminas de vidro, que

foram desparafinizadas e realizada a recuperação antigênica em banho maria a 92°C. Subsequentemente foram expostas ao anticorpo primário anti-Vip produzido em mouse (1:400) over night, em seguida adicionado polímero conjugado com peroxidase por 30 minutos e revelados por meio de coloração castanha de cromógeno diamino benzidina (DAB) por 10 minutos. Por fim, realizado a contra-coloração por hematoxilina de Mayer e efetuada a montagem de lâminas com permont. A contagem de neurônios vipérgicos foi realizada em microscópio óptico, em 50 gânglios do plexo submucoso na lente objetiva de 40x.

Para análise estatística foi realizado os testes D'Agostino-Pearson e ANOVA seguido por Tukey e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreu o aumento no número de neurônios vipérgicos no plexo submucoso nos grupos GI-IN e GC-EP, porém ocorreu redução no GI-EP em comparação com GC-EP, como visualizado na figura 1.

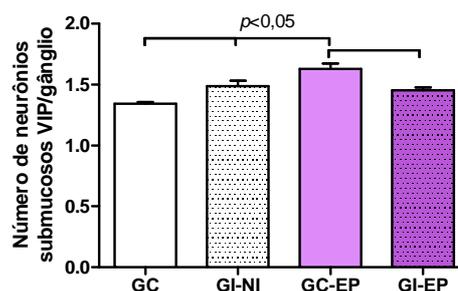


Figura 1. Análise quantitativa de neurônios vipérgicos no plexo submucoso de jejuno de ratos. Média \pm desvio padrão na quantidade de neurônios por gânglios presentes no Grupo controle (GC), Grupo infectado e não imunoestimulado (GI-IN), Grupo não infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GC-EP) e Grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpúrea* ($p < 0,05$).

Tanto a infecção como a imunoestimulação levaram ao aumento no número de neurônios vipérgicos. Como descrito por Góis et al. (2023), a invasão do *T. gondii* pode desencadear alterações na quantidade de neurônios entéricos. O grupo imunoestimulado teve uma elevação superior destes neurônios, isso pode ter ocorrido devido as ações imunoestimuladoras da *E. purpurea* e desencadeado a ativação e liberação de neurotransmissores VIPérgicos para que ocorra função motora e secretomotora inibitória e assim, menor permeabilidade intestinal, protegendo o órgão de possíveis patógenos e danos (IWASAKI et al., 2019). Já a combinação imunoestimulação e infecção apresentou um menor número destes neurônios, chegando próximo ao GC que pode ter ocorrido pelo fato de que o VIP ativa a liberação de TGF- β pelos linfócitos T ao qual mantém a homeostase intestinal regulando a resposta imunológica (Chandrasekharan et al., 2013).

CONCLUSÕES

Tanto a infecção com 500 oocistos *T. gondii* (cepa RH) como o grupo controle de imunoestimulação apresentaram aumento na quantidade de neurônios VIP, porém, a imunoestimulação com *E. purpurea* associado a infecção causou redução neste número.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária, UEM, UNIPAR, PBF, DCM e o grupo de pesquisa em neurogastroenterologia.

REFERÊNCIAS

CHANDRASEKHARAN, B.; NEZAMI, B. G.; SRINIVASAN, S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.304, p.949-957, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537176/>. Acesso em: 8 ago. 2023

DUBEY, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/251306664_Review_of_Toxoplasmosis_of_Animals_and_Humans_Second_Edition_by_JP_Dubey. Acesso em: 8 ago. 2023.

GÓIS, M.B. et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. **Experimental parasitology**, v. 164, p. 56-63, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489416300236?via%3Dihub>. Acesso em: 8 ago. 2023.

IWASAKI, M. et al. Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system. **F1000Research**, v. 8, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6743256/>. Acesso em: 9 ago. 2023.

KUMAR, K. M.; RAMAIAH, S. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 304–314, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/286314200_Pharmacological_importance_of_Echinacea_purpurea. Acesso em: 8 ago. 2023.