

ANÁLISE QUANTITATIVA DE POPULAÇÃO TOTAL DE NEURÔNIOS E CÉLULAS DA GLIA PRESENTES NO PLEXO MIOENTÉRICO DO JEJUNO DE RATOS INFECTADOS CRONICAMENTE COM *Toxoplasma gondii* E IMUNOESTIMULADOS COM *Echinacea purpurea*

Anna Carolina Ponhozi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Henrique Cazanti Sona (Participante), Amanda Gubert Alves dos Santos (Participante), Maria José Pastre (Participante), Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana (Orientador). E-mail: dmgsana@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas/ Morfologia

Palavras-chave: SNE, fitoterápico, resposta imune.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose. O intestino é afetado diretamente pela infecção, sendo danoso aos neurônios e células da glia entérica. A espécie vegetal *Echinacea purpurea* possui efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Assim este trabalho quantificou os neurônios e células da glia presentes no plexo mioentérico de jejuno de ratos Wistar com infecção crônica por *T. gondii* e imunoestimulados com *E. purpurea*. Foram utilizados 24 ratos, distribuídos aleatoriamente em: GC (Grupo Controle), GI-IN (Grupo infectado e não imunoestimulado), GC-EP (Grupo não infectado e imunoestimulado com *E. purpurea*) e GI-EP (Grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpurea*). Os grupos infectados receberam inóculo de 500 oocistos esporulados de *T. gondii*. E os imunoestimulados receberam solução de 100 mg/kg de *E. purpurea*. Os animais foram submetidos à eutanásia, coletado 7 cm do jejuno, em seguida fixados e dissecados para obtenção do plexo mioentérico. Posteriormente incubados com anticorpos HuC/HuD (pan-neuronal) e S100 (pan-glial), para evidenciar os neurônios e células da glia. Foi realizada a captura de 32 campos microscópios, objetiva de 20x, para a contagem de neurônios totais e células da glia. Os dados foram processados pelo teste ANOVA seguido de Tukey (significância de 5%). Verificou-se alterações na população total de neurônios e células da glia entérica com a combinação do tratamento de *E. purpurea* e infecção crônica de *T. gondii*.

INTRODUÇÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* apresenta ciclo de vida heteroxeno, com os felídeos sendo hospedeiro definitivo com a produção de oocistos. A principal forma de infecção é pela ingestão dos oocistos em alimentos ou pela ingestão de carne contendo cistos teciduais. Após a ingestão, ocorre o rompimento dos oocistos e liberação de esporozoítos e bradizoítos que invadem todos os tipos celulares nucleados, se diferenciando em taquizoítos, sendo a fase aguda da doença. Em resposta a ações imunes ocorre o encistamento do parasito, caracterizando a fase crônica da infecção (Gangneux, Dardé, 2012).

Durante a infecção o parasito possui grande capacidade de dispersão pelo organismo hospedeiro, causando alterações em diversos órgãos, entre eles o intestino. Este é formado por 4 camadas, a mucosa, caracterizada por realizar a absorção, a submucosa, com função imune e de sustentação, as musculares, que realizam os movimentos peristálticos intestinais e serosa (Gangneux, Dardé, 2012). Entre as musculares encontra-se o plexo mioentérico, composto por neurônios e células da glia que controlam diversas funções intestinais (Oriá; Brito, 2016).

O tratamento da toxoplasmose geralmente inclui a combinação de sulfadiazina com pirimetamina (Gangneux, Dardé, 2012). Dessarte, novas terapias, como a fitoterapia, vem sendo analisadas para outras medidas de tratamento. A planta *Echinacea purpurea* possui atividades imunomoduladora e anti-inflamatória, que potencializam o sistema de defesa e é capaz de produzir citocinas inflamatórias, podendo atuar no trato gastrointestinal (Barnes *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desta planta sobre os neurônios intestinais. Este estudo teve como objetivo analisar quantitativamente a população total de neurônios e células da glia no plexo mioentérico do jejuno de ratos infectados por *T. gondii* e imunoestimulados por *E. purpurea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob nº 7633021018. Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* machos (21 dias de vida) e divididos em: grupo controle (GC); grupo infectado e não imunoestimulado (GI-NI); grupo não infectado e imunoestimulados com *E. purpurea* (GC-EP); grupo infectado e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI-EP). Os grupos GC-EP e GI-EP receberam por via oral 100 mg/Kg de solução de *E. purpurea* por 28 dias antes e 28 dias depois da infecção para tratamento. Enquanto os grupos GC e GI-NI a solução salina estéril. Os grupos infectados receberam por via oral 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) por via oral e os grupos não infectados receberam solução salina.

Após o período experimental os animais sofreram a eutanásia com aprofundamento anestésico com vapor de Isoflurano, para que fosse coletado 7 cm de segmento do jejuno, lavados com PBS e fixado em paraformaldeído 4%. Posteriormente foi segmentado em frações de 1 cm, que sofreram microdissecção em estereomicroscópio, obtendo-se o plexo mioentérico. Para realizar bloqueio e a adição de anticorpos primários HuC/HuD (pan-neuronal) e S100 (pan-glia) incubado por 48h. Logo após adicionado o conjugado com Anti-corpo secundário fluorescente,

para montagem das lâminas. Capturou-se 32 campos de cada animal em microscópio eletrônico, objetiva de 20x. Quantificando o número total de células da glia e neurônios, obtida a razão de células da glia entérica (EGCs) por neurônios. As análises foram realizadas pelo software Image Pro Plus®.

Os dados foram analisados por ANOVA seguido de Tukey e apresentados como média \pm desvio padrão, considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de observar um discreto aumento do número de neurônios do grupo infectado (GI-NI), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparamos com o GC. Neste caso, nem infecção pelo *T. gondii* e nem o tratamento com *E. purpurea* nos grupos controle (GC-EP) e infectado (GI-EP) foram suficientes para alterar significativamente o número de neurônios. Entretanto, provavelmente devido a esse discreto aumento, foi observado que, quando comparamos os grupos GC-EP e GI-EP ao grupo infectado (GI-NI), há diferença estatística. Contudo esse resultado é semelhante ao GC. Também não houve diferença significativa para a contagem de células da glia entérica (EGCs) entre os grupos no material analisado. (Figura 1).

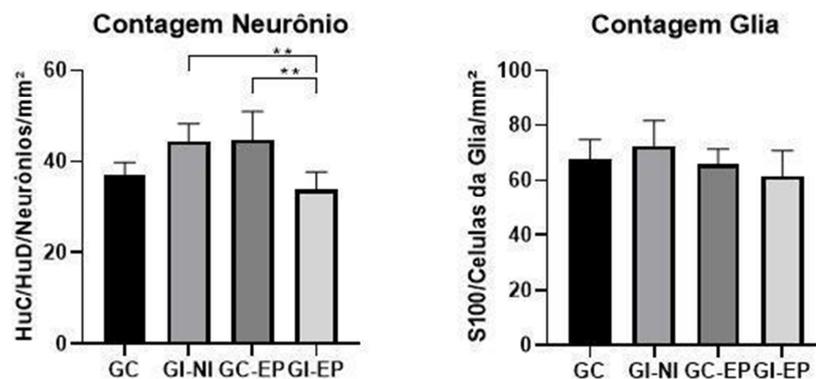


Figura 1. Análise quantitativa de população total de neurônios e células da glia presentes no plexo mioenterico de ratos infectados com *T. gondii* e imunoestimulados com *E. purpurea*. Grupo controle (GC), grupo infectado e não imunoestimulado (GI-NI), grupo não infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e imunoestimulado com *E. purpurea* (GI-EP). ($p \leq 0,05$).

A diminuição na população total de neurônios no grupo GI-EP pode ser devido a infecção do *T. gondii* que leva a um aumento na quantidade de células imune e maiores níveis de TGF- γ , induzindo a produção de óxido nítrico, que causa citotoxicidade em neurônios, levando a morte celular (Mordue et al., 2001). Para as células da glia, não houve alteração significativa, isso pode ser devido sua resistência, por estar em contato mais direto com patógenos, compostos inflamatórios e outros tipos celulares (Mendes, 2013).

CONCLUSÃO

A infecção crônica de *T. gondii* combinado com o tratamento de *E. purpurea* causa alterações na população total de neurônios ou de células da glia entérica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Universidade Estadual de Maringá, a Universidade Estadual de Londrina, aos Laboratórios de Parasitologia Clínica e Neurogastroenterologia da UEM e Laboratório de Parasitologia Veterinária da UEL.

REFERÊNCIAS

BARNES J. *et al.* *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2005. n. 8, v. 57, p. 929-54.

GANGNEUX, F. R.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clin. Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

MENDES, C. **Estudos das células glias entéricas imunorreativas aos receptores p2x2 e p2x7 do íleo de ratos submetidos a isquemia e reperfusão intestinal.** Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42131/tde-13032014-173541/publico/CristinaEusebioMendes_Mestrado_P.pdf. Acesso em: 27 de agosto de 2024.

MORDUE, D. G. *et al.* Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **Journal of Immunology**, 2001. n. 8, v. 167, p.4.574-4.584. DOI:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4574>.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema Digestório: Integração Básica-Clínica.** Editora Blucher, São Paulo, 2016.