EFEITOS DO TRATAMENTO COM NEBIVOLOL NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII*

Maria Clara Lima Barbosa (PIC/UEM), Luana do Nascimento Fahur (PIC/UEM), Giovanna de Carvalho (PCS/UEM), Vinícius França Scanavaca (PCS/UEM), Tania Cristina Alexandrino Becker (PCS/UEM), Priscilla de Laet Sant'Ana (Coorientadora), Bruna Muller Cardoso (Orientadora). E-mail: bmcardoso@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde / Patologia

Palavras-chave: Nitrito; Reação de Griess; Reposicionamento de fármacos.

RESUMO

A toxoplasmose crônica cerebral, causada pela persistência de cistos de *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central, é pouco responsiva aos tratamentos convencionais e apresenta efeitos adversos relevantes. O nebivolol, antagonista beta-1 adrenérgico que estimula a produção de óxido nítrico (NO), é promissor para o reposicionamento terapêutico nessa infecção. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com nebivolol na produção de óxido nítrico em tecido cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, estimada indiretamente pela dosagem de nitrito pela reação colorimétrica de Griess. A técnica foi previamente padronizada com sobrenadante de tecido intestinal de camundongos tratados com cúrcuma, como matriz biológica de referência. A padronização demonstrou viabilidade analítica, com diferença estatística significativa entre os grupos pela ANOVA one-way ($p<0,001$) e diferença pontual pelo pós-teste de Tukey entre os grupos V e VII ($p=0,0433$). Entretanto, quando aplicada às amostras de tecido cerebral dos camundongos infectados, tratados e não tratados com nebivolol, não foi possível quantificar os níveis de nitrito, que permaneceram abaixo da faixa de quantificação do ensaio (5-60 µM). Esse resultado é discutido como decorrente da baixa e localizada produção de NO na fase crônica da infecção cerebral e das limitações da reação de Griess frente a matrizes biológicas complexas em baixas concentrações. Conclui-se que, embora a técnica tenha sido padronizada e validada com sucesso, sua sensibilidade não foi suficiente para quantificar NO em tecido cerebral na fase crônica da toxoplasmose murina, recomendando-se métodos analíticos mais sensíveis em estudos futuros.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que acomete aproximadamente um terço da

população mundial. Na fase crônica, os bradizoítos alojam-se em cistos teciduais, especialmente no sistema nervoso central, tornando o parasita pouco acessível às terapias convencionais baseadas em pirimetamina e sulfadiazina, que apresentam eficácia limitada sobre os cistos e efeitos adversos relevantes (DAHER *et al.*, 2021). O nebivolol (NBV), antagonista seletivo de receptores beta-1 adrenérgicos que estimula a produção de óxido nítrico (NO) pela via da L-arginina, tem demonstrado atividade anti-*T. gondii* e potencial neuroprotetor e imunomodulador (HANIF *et al.*, 2023; DA SILVA BELLINI RAMOS *et al.*, 2024), justificando sua investigação na forma crônica cerebral da doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com nebivolol na produção de óxido nítrico em tecido cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, estimada indiretamente pela dosagem de nitrito pela reação de Griess.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi conduzido no Laboratório de Patologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A dosagem de nitrito foi realizada pela reação de Griess, conforme técnica descrita por CARDOSO *et al.* (2015). A técnica foi previamente padronizada com sobrenadante de tecido intestinal de camundongos tratados com extrato de *Curcuma longa*, como matriz biológica de referência. O reagente de Griess foi preparado com N-(1-naftiletil)etilenodiamina, sulfanilamida e ácido ortofosfórico; a curva padrão foi construída com nitrito de sódio nas concentrações de 5, 10, 30 e 60 µM. Em placa de 96 poços, 50 µL das amostras e do reagente de Griess foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, com leitura em 550/620 nm. Após a padronização, o mesmo protocolo foi aplicado a amostras de tecido cerebral de camundongos *Swiss* cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, tratados e não tratados com nebivolol (2 mg/kg/dia, gavagem, 21 dias). As análises estatísticas foram conduzidas no RStudio, com testes de normalidade de Shapiro-Wilk, homocedasticidade de Levene, ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey ($p<0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização da técnica em tecido intestinal apresentou diferença estatisticamente significativa entre os sete grupos avaliados (ANOVA *one-way*, $p<0,001$), com diferença pontual entre os grupos V e VII pelo pós-teste de Tukey ($p=0,0433$) (Tabela 1), confirmando a capacidade do ensaio de detectar e discriminar concentrações de nitrito na faixa de quantificação estabelecida (5-60 µM).

Tabela 1 – Concentração de derivados de nitrito (µM) nos grupos experimentais de padronização em tecido intestinal.

Grupo	Concentração de nitrito (µM) — x̄ ± DP
I	0,92 ± 0,02
II	3,49 ± 2,31
III	5,33 ± 1,52
IV	4,29 ± 3,07
V	5,63 ± 0,46
VI	2,00 ± 1,77
VII	0,73 ± 0,45

Legenda: I – controle negativo, diluente do DMH; II – indução com DMH (20 mg/kg, i.p.); III e IV – DMH + extrato de C. longa (250 e 500 mg/kg); V e VI – extrato de C. longa sem indução (250 e 500 mg/kg); VII – veículo do extrato (Tween 20 a 5%).

Entretanto, quando o mesmo protocolo foi aplicado a amostras de tecido cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, tratados e não tratados com nebivolol, não foi possível quantificar os níveis de nitrito, que permaneceram abaixo da faixa de quantificação do ensaio, o que pode ser observado pela ausência de coloração nos poços correspondentes às amostras de tecido cerebral, em contraste com a coloração observada nos poços da curva padrão (Figura 1).

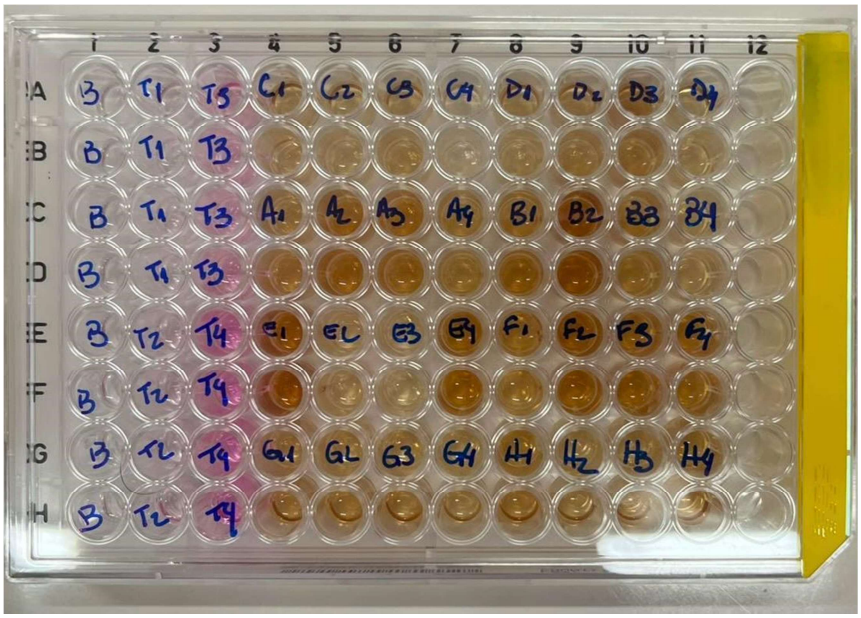


Figura 1 – Ensaio de dosagem de nitrito pela reação de Griess em amostras de sobrenadante de tecido cerebral. Os poços correspondentes às amostras não apresentaram coloração visível, indicando níveis de nitrito abaixo da faixa de quantificação do ensaio, enquanto os poços da curva padrão (T1-T4) exibiram gradiente de coloração rósea proporcional à concentração conhecida de nitrito. B: branco da reação.

Esse resultado é compatível com a baixa e localizada produção de NO característica da fase crônica da infecção cerebral, associada ao predomínio de citocinas anti-inflamatórias e à expressão reduzida de iNOS nessa fase, somada às limitações

intrínsecas da reação de Griess frente a matrizes biológicas complexas em baixas concentrações (GUEVARA *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 2024).

CONCLUSÕES

A técnica de dosagem de nitrito pelo método de Griess foi padronizada e validada com sucesso em tecido intestinal, mas sua sensibilidade não foi suficiente para quantificar óxido nítrico em tecido cerebral na fase crônica da toxoplasmose murina. Recomenda-se a investigação de métodos analíticos mais sensíveis para elucidar o papel do nebivolol na modulação dessa via em estudos futuros. Isso poderá contribuir para terapias mais eficazes contra a toxoplasmose cerebral crônica.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciências Básicas da Saúde e ao Laboratório de Patologia da Universidade Estadual de Maringá pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Cardoso, B. M. et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 8, p. 1024-1034, 2015.

Daher, A. et al. Toxoplasmose: aspectos clínicos e terapêuticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 54, e02882020, 2021.

Da Silva Bellini Ramos, T. et al. Nebivolol reduces *Toxoplasma gondii* infection in vitro and in vivo in a murine model. **Acta Tropica**, v. 242, p. 106933, 2024.

Ghosh, P. et al. Estimating nitric oxide (NO) from MDSCs by Griess method. **Methods in Cell Biology**, v. 184, p. 149-158, 2024.

Guevara, I. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

Hanif, A. et al. Nebivolol: Beyond blood pressure control – a comprehensive review of its pleiotropic cardiovascular and systemic effects. **Pharmacological Research**, v. 187, p. 106590, 2023.