



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA**



LUANA ARAUJO DAS MERCES

**EFEITOS DA IMUNOESTIMULAÇÃO PELA *Echinacea purpurea*
(L.) MOENCH SOBRE A HISTOARQUITETURA DA PAREDE
DO CÓLON DE RATOS INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii***

Salvador, BA

2023

LUANA ARAUJO DAS MERCES

**EFEITOS DA IMUNOESTIMULAÇÃO PELA *Echinacea purpurea*
(L.) MOENCH SOBRE A HISTOARQUITETURA DA PAREDE
DO CÓLON DE RATOS INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para o processo de defesa da dissertação e obtenção do título de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Biondaro Gois

Coorientadora: Profa. Dra. Sibeles de Oliveira Tozetto Klein

Salvador, BA

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M554 Mercês, Luana Araujo das

Efeitos da imunostimulação pela *Echinacea purpúrea* (L.) Moench
sobre a histoarquitetura da parede do cólon de ratos infectados por
Toxoplasma gondii/Luana Araújo das Mercês. – Salvador, 2023.
96 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Biondaro Gois; Coorientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Sibeles de Oliveira Tozetto Klein.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.
Inclui referências e anexos.

1. Toxoplasmose. 2. Compostos bioativos. 3. Imunohistoquímica.
4. Imunostimulação. 5. Serotonina. 6. Mastócitos. I. Gois, Marcelo
Biondaro. II. Klein, Sibeles de Oliveira Tozetto. III. Universidade Federal
da Bahia. IV. Título.

CDU 616.993.19:577.27

Título em outro idioma: Effects of immunostimulation by *Echinacea purpurea* (L.)
Moench on the histoarchitecture of the colon wall of rats infected by *Toxoplasma gondii*

À minha mãe, **Ana Lúcia**, por sempre acreditar em mim e por ter abdicado de grande parte da sua vida em prol da minha criação.

Aos meus irmãos **Gustavo e Isabela**, por sua preocupação, carinho e incentivo.

À minha avó **Talice** (*In memoriam*), que me formou enquanto ser humano.

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Expressar meus agradecimentos é uma dificuldade infinita quando se há tanto para dizer. Mas, não posso começar essas linhas sem agradecer a força motriz que me trouxe até aqui: Deus.

Obrigada Senhor pelas tremendas obras que tem realizado em minha vida e por seus planos para mim serem maiores do que um dia eu ousei sonhar. A paixão pelo ensino/pesquisa mostrou-se pulsante em toda a minha trajetória. Hoje, olhando para trás, vejo inúmeras pessoas que contribuíram para que eu hoje, alcance esse tão sonhado título e não poderia deixar de demonstrar aqui, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao professor Marcelo Biondaro Gois, meu orientador e mentor, agradeço a confiança em mim depositada, pela oportunidade que mudou a minha vida e pelas trocas e ensinamentos ao longo desses dois anos. Agradeço também a minha co-orientadora professora Sibeke Klein pela oportunidade de aprender tanto em todos os meus dias no CCS.

Dedico também essa conquista *In memoriam*: A minha amada avó Anatalicia (*Talice*) alma gêmea dessa e de todas as vidas que virão, meu avô Pedro Francisco, tia Zezita, tio Sandoval, (Jamba). Perdas duríssimas ao longo dessa jornada, que me fizeram questionar o propósito de tudo, mas que hoje me acompanham, sempre guiando meus passos não me deixando desistir. Eu sinto vocês comigo!

Reforço o meu agradecimento a minha incrível mãe Ana Lúcia. Obrigada por acolher minhas angústias e por acalmar o meu coração nos dias em que eu pensei que não conseguiria. Essa vitória é nossa! Aos meus irmãos Gustavo e Isabela, que me ensinam todos os dias com o amor que compartilhamos. Em especial a Gustavo, por sempre me fazer acreditar que eu posso alcançar qualquer coisa, basta querer. Aos demais membros do meu núcleo familiar, minha vizinha Dira, minhas tias Cristiane e Cristina e tio Lú.

À minha doce Camilla, que reafirma todo dia o meu propósito nessa vida. Gratidão por caminhar ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda durante os detalhes finais dessa dissertação, especialmente por sempre acolher minhas angústias com um sorriso e um abraço reconfortante. Eu amo você!

Aos meus amigos do mestrado Rildo Freire e Bruna Tosta que compartilharam comigo todas as angústias, incertezas e inseguranças que surgiam a cada semestre.

À Mônica Gomes, Tiago de Freitas, Renata Cerqueira, Guilbert Bispo e Laize Lima, amigos de uma vida inteira e que acreditam em mim, mas do que eu mesmo.

À Janete Dias Galvão. Ela que sempre acreditou no meu potencial e é uma das principais responsáveis pela obtenção desse título hoje, não me deixando desistir frente as dificuldades. Dona Janete, Meu coração sempre será grato pelo seu apoio.

Aos professores do PPGIM que me auxiliaram e que enriqueceram minha trajetória acadêmica, fica aqui o meu singelo agradecimento. Aos demais prestadores de serviço da UFBA, agradeço a paciência, em especial a Aline que sempre recebeu minhas dúvidas e aflições com gentileza.

A FAPESB por ter acreditado no meu projeto, dando ao mesmo o aporte necessário para que pudéssemos desenvolvê-lo.

E a UFRB – Campus Santo Antônio de Jesus e ao Centro de Ciências da Saúde (CCS) pelo apoio no desenvolvimento da minha pesquisa.

Em linhas gerais, quero demonstrar também o meu agradecimento a todos que participaram da minha trajetória até a obtenção do título, mas não foram diretamente citados. Sou profundamente grata! vocês são o meu norte, eu amo vocês!

EPIGRAFE

“Mesmo através da fase mais escura
Seja fácil ou difícil
Sempre marcha alguém corajoso
Aqui embaixo da minha pele”

Constant Craving – K.D Lang

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório causador da toxoplasmose. A infecção ocorre após a ingestão de oocistos, cistos teciduais, bradizoítos ou taquizoítos. Expostas ao *T. gondii*, as células o reconhecem e secretam citocinas pró-inflamatórias, induzindo uma resposta inflamatória para a resistência do hospedeiro, mas que podem também, causar danos ao mesmo. Estudos evidenciam que o tratamento utilizado já não causa o efeito esperado. O estudo objetivou avaliar as alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon de ratos inoculados com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com 100 mg/kg de *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Vinte e quatro *Rattus norvegicus* machos foram separados aleatoriamente em quatro grupos (n=6): grupo controle (GC); grupo infectado e não imunoestimulado (GI); grupo controle imunoestimulado (GC+EP); e grupo infectado e imunoestimulado (GI+EP). O protocolo experimental (nº 7633021018) foi aprovado pelo comitê de ética e aos 93 dias de idade, os ratos foram eutanasiados. O cólon foi coletado, fixado e analisado. A infecção, bem como a imunoestimulação causaram alterações histomorfométricas, aumento na distribuição de mastócitos totais, mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT e na proporção de linfócitos intra-epiteliais no cólon de ratos. Houve aumento de células caliciformes avaliadas no epitélio do cólon. Em adição, a infecção causou alterações histopatológicas à parede do cólon as quais foram atenuadas pela imunoestimulação. Diante do exposto, nossos resultados sugerem que parte das alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon foram atenuadas pela imunoestimulação com *E. purpurea*.

Palavras-chave: toxoplasmose, compostos bioativos, imunoestimulação; serotonina, mastócitos, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a mandatory intracellular protozoan causing toxoplasmosis. Infection occurs after ingestion of oocysts, tissue cysts, bradizoites or tachyzoites. Exposed to *T. gondii*, the cells recognize it and secrete pro-inflammatory cytokines, inducing an inflammatory response to host resistance, but which can also cause damage to it. Studies show that the treatment used no longer causes the expected effect. The study aimed to evaluate the alterations in cells and tissues that make up the colon wall of rats inoculated with 500 sporulated oocysts of *T. gondii* (RH strain, genotype I) and immunostimulated with 100 mg/kg of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Twenty-four male *Rattus norvegicus* were randomly separated into four groups (n=6): control group (CG); infected and non-immunostimulated group (GI); immunostimulated control group (GC+EP); and infected and immunostimulated group (GI+EP). The experimental protocol (no. 7633021018) was approved by the ethics committee and at 93 days of age, the rats were euthanized. The colon was collected, fixed and analyzed. Infection as well as immunostimulation caused histomorphometric changes, increased distribution of total mast cells, mast cells and enterochromaphous cells that express 5-HT and in the proportion of intraepithelial lymphocytes in the colon of rats. There was an increase in goblet cells evaluated in the epithelium of the colon. In addition, the infection caused histopathological changes to the colon wall which were attenuated by immunostimulation. In view of the above, our results suggest that part of the changes in cells and tissues that make up the colon wall were attenuated by immunostimulation with *E. purpurea*.

Keywords: toxoplasmosis, bioactive compounds, immunostimulation; serotonin, mast cells, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Fonte: Fonte: Adaptada do Centers for Disease Control and Prevention, (2020) 25
- Figura 2** Taquizoítos corados com Giemsa (A), cisto tecidual (B) e oocisto esporulado de *T. gondii* (C) Fonte: Adaptado de Dubey, 2021. 27
- Figura 3** Fotomicrografia da parede do cólon. Coloração HE, pequeno aumento. Fonte: Histologia básica I L.C. Junqueira e Carneiro (2013). 31
- Figura 4** Ativação da imunidade celular efetora na infecção por *T. gondii*. Fonte: SOUZA, W.; BELFORT JR., 2014. 39
- Figura 5** Fotografia ilustrativa da *E. purpurea*. Fonte: milenio.com - Cinco benefícios de la equinácea [Internet]. [cited 2022 November 3]. 41
- Figura 6** Esquema da metodologia utilizada no estudo. Fonte: Própria (adaptada pelo autor) 50
- Figura 7** Mediana e desvio-interquartilício da distribuição dos mastócitos totais (A) e mastócitos que expressam 5-HT (B) presentes na lâmina própria, células enterocromafins que expressam 5-HT (C) e linfócitos intra-epiteliais (D) presentes no epitélio da mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP) Fonte: Própria (adaptada pelo autor) 57
- Figura 8** Mediana e desvio-interquartilício do número de células caliciformes PAS+ (A), AB pH 2,5+ (B) e AB pH 1,0+ (C) presentes na mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP) Fonte: Própria (adaptada pelo autor) 59
- Figura 9** Mediana e desvio-interquartilício do percentual de fibras de colágeno dos tipos I (A) e III (B), por área analisada ($\%/ \mu\text{m}^2$), na parede do colón de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Fonte: Própria (adaptada pelo autor) 61
- Figura 10** Mediana e desvio-interquartilício da quantificação (score) dos achados histopatológicos (A) na mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Fonte: Própria (adaptada pelo autor) 63

Figura 11 (Adicional) Mediana e desvio-interquartílico da distribuição dos linfócitos intra-epiteliais presentes no epitélio da mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP), infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP), não infectados e tratados com pirimetamina (GC+P) e infectados e tratados com pirimetamina (GI+P)..... **96**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de anticorpos usados	52
Tabela 2. Histomorfometria dos estratos que compõem a parede do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de <i>T. gondii</i> (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com <i>E. purpurea</i> (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com <i>E. purpurea</i> (GI+EP)	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais descobertas acerca da toxoplasmose	21
---	-----------

LISTA DE SIGLAS

(AB) pH 1,0 - Alcian-Blue

(AB) pH 2,5 - Alcian-Blue

5-HT - Serotonina

AMPs - Peptídeos antimicrobianos

ANOVA - Análise de Variância

anti-*T. gondii* - Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

CD4+ - Linfócitos T CD4

CD8+ - Linfócitos T CD8

NK - Células Natural Killer

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

DAT - Teste de aglutinação direta

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

GAPs - Passagens de antígenos associadas a células caliciformes

GC - Grupo Controle

GC+EP - Grupo Controle imunoestimulado com Echinacea Purpurea

B1 - Gene

GI - Infectado e não imunoestimulado

GI+EP - Grupo Infectado imunoestimulado com Echinacea Purpurea

HE - Hematoxilina e eosina

HEUP - Herbário da Universidade Paranaense

IFAT - Testes de Anticorpos de Fluorescência Indireta

IFN- γ - Interferon Gamma

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-4 - Interleucina 4

Kg - Quilograma

LIEs - Linfócitos Intra-epiteliais

MEC - Matriz Extracelular

Mg - Miligrama

MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

NO - Óxido Nítrico

PAS - Periodic Acid-Schiff

PCNA - Antígeno nuclear de célula proliferante

PCR - Proteína c-reativa

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

Ph - Potencial Hidrogeniônico

RETN-1 β - Beta do tipo resistina

RH - Tipo de cepa toxoplásmica

SARS-Cov2 - Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência Animal Laboratorial

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento

Tradicional Associado

TFF3 - Trefoil Fator-3

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Resposta Imunológica

TLRs - Receptores do tipo Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TREGs - Células T regulatórias

UEM - Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> e a toxoplasmose	21
2.2	Taxonomia e ciclo biológico	23
2.3	Epidemiologia	28
2.4	Vias de transmissão	29
2.5	Cepas de <i>T. gondii</i> e virulência	30
2.6	Histomorfologia do cólon	31
2.7	Populações celulares e matriz extracelular no cólon	33
2.8	Perspectivas terapêuticas e <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	39
3	OBJETIVOS	43
4	CAPÍTULO 1: Artigo Científico	44
4.1	Introdução	46
4.2	Material e métodos	48
4.2.1	Aspectos Éticos e Legais	48
4.2.2	Preparação do extrato aquoso	48
4.2.3	Delineamento experimental	48
4.2.4	Eutanásia, coleta e processamento de amostras	50
4.2.5	Análise histomorfométrica da parede do cólon	51
4.2.6	Análise de mastócitos totais	51
4.2.7	Imuno-histoquímica para detecção de mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT	51
4.2.8	Análise quantitativa dos linfócitos intra-epiteliais e células caliciformes	52
4.2.9	Análise quantitativa de colágeno I e III	52
4.2.10	Análise histopatológica da parede do cólon	53
4.2.11	Análise Estatística	53
4.3	Resultados	54
4.4	Discussão	64

4.5	Referências	70
5	CONCLUSÃO GERAL	74
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7	ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO GERAL

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, uma zoonose de distribuição mundial (ALMERIA; DUBEY, 2021; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). *T. gondii* têm como hospedeiros definitivos membros da família Felidae e como hospedeiros intermediários outros animais homeotérmicos durante seu ciclo de vida (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Uma vez ingerido, o parasito invade a mucosa intestinal, passando pelo epitélio, multiplica-se e invade novas células e disseminam-se via sangue e linfa (BARRAGAN; DAVID SIBLEY, 2003; BARRAGAN; HITZIGER, 2008; COURRET et al., 2006). Após a exposição ao *T. gondii*, células do epitélio intestinal e imunes reconhecem o parasito por meio de receptores de reconhecimento de padrão na superfície celular, como os receptores Toll-like (TLRs) (KIVIT et al., 2014), que ativam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12 e IFN- γ que, por sua vez, induzem uma resposta Th1 subsequente, essencial para a resistência do hospedeiro (SUZUKI et al., 1988; RAETZ et al., 2013). Porém, apesar de controlar o parasito, este mecanismo de resistência pode ser prejudicial ao hospedeiro e causar imunopatologia (GAZZINELLI et al., 1996; HEIMESAAT et al., 2006; OLDENHOVE et al., 2009).

Vários estudos demonstraram que a toxoplasmose modifica o trato gastrointestinal (CASAGRANDE et al., 2022; GÓIS et al., 2016; PASTRE et al., 2019b; SANT'ANA et al., 2012; TREVIZAN et al., 2016; VICENTINO-VIEIRA et al., 2015), outros evidenciam que o medicamento utilizado no tratamento da toxoplasmose já não causa o efeito esperado (FAYE et al., 2011). Atualmente, o tratamento da toxoplasmose é realizado com o uso de pirimetamina combinado com sulfadiazina que inibem as enzimas diidrofalato redutase e dihidropteroato sintase bloqueando a síntese de DNA do parasito (RADKE et al., 2018). Porém, o uso demasiado dessas drogas levou a seleção de cepas resistentes do parasito (FALCIPARUM; REYNOLDS; ROOS, 1998), tornando fundamental o desenvolvimento de terapêuticas alternativas. Além disso, o uso deste fármaco pode causar distúrbios colaterais como leucopenia, efeitos dermatológicos e gastrointestinais (RIBEIRO; CARVALHO, 2022).

Diante desse cenário, fica evidente a necessidade de estudos voltados para descoberta de compostos bioativos capazes de mitigar os efeitos da infecção toxoplásmica ou de estimular o sistema imune do hospedeiro (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2016). Assim, extratos vegetais

têm grande importância na pesquisa por substâncias tendo em vista o desenvolvimento de novos medicamentos (JUNIOR et al., 2016). Dentre as possibilidades está a *Echinacea purpurea* (L.) Moench, planta já reconhecida por seus resultados anti-inflamatórios e imunológicos promissores relatados em estudos *in vitro* e *in vivo* (BURLOU-NAGY et al., 2022; CHOI; JIANG; CHU, 2013; VIMALANATHAN et al., 2022).

E. purpurea (L.) Moench é também conhecida como “coneflower” púrpura (KUMAR; RAMAIAH, 2011) e pertence à família das Asteraceae, um grupo de plantas silvestres e perenes cujas principais características são as raízes apumadas, cilíndricas, estriadas longitudinalmente, que desprendem odor aromático e sabor adocicado provocando um discreto adormecimento na língua (MCKEOWN, 1999; PELLATI et al., 2005). Estudos fitoquímicos de *E. purpurea* mostraram a presença de derivados de ácido cafeico, polifenóis, polissacarídeos, proteoglicanos, alquilamidas lipofílicas, glicosídeos de ácido chicórico e substâncias com atividade imunoestimulante (LUPING et al., 2005; ONISZCZUK et al., 2019).

A *E. purpurea* é amplamente utilizada para a prevenção e tratamento de resfriados, infecções do trato respiratório e trato urinário e como imunoestimulante (DAPAS et al., 2014; PARNHAM, 1996) e por seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidante (BORCHERS et al., 2000; BURLOU-NAGY et al., 2022; HUDSON; VIMALANATHAN, 2011; KUMAR; RAMAIAH, 2011; VIMALANATHAN et al., 2022). Devido a sua composição química (KUMAR; RAMAIAH, 2011), vários autores sugerem que seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes decorrem da ativação de células do sistema imunológico, tais como macrófagos e células natural killer (NK) (BARRETT, 2003; BURLOU-NAGY et al., 2022; CHOI; JIANG; CHU, 2013; VIMALANATHAN et al., 2022).

Sabe-se que o cólon é um local de grande interação antigênica (YOO; MAZMANIAN, 2017) devido à sua intensa relação com microrganismos comensais que interagem no lúmen para manter os mecanismos tolerogênicos na mucosa, absorção de nutrientes, manutenção da barreira epitelial e fazer frente aos desafios deflagrados no epitélio intestinal (LOZUPONE et al., 2012; TUNIS; MARSHALL, 2014; SENDER et al., 2016; MARGOLIS; GERSHON, 2016; YOO; MAZMANIAN, 2017).

Devido a esta exposição, o cólon possui importantes mecanismos de defesa os quais dependem da integridade das células e tecidos que compõem a sua parede. Considerando as propriedades naturais da *E. purpurea*, bem como os danos que podem ser causados pela infecção toxoplásmica, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon de ratos inoculados com oocistos de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com 100 mg/kg de *E. purpurea* (L.) Moench.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose. Foi descrito pela primeira vez em 1908 por pesquisadores da Tunísia em um roedor parecido com hamster, o gundi, *Ctenodactylus gundii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) e simultaneamente no Brasil, no coelho doméstico *Oryctolagus cuniculus* (SPLENDORE, 1908). Inicialmente, os achados relacionados à infecção foram atribuídos a *Leishmania*; os quais foram corretamente atribuídos como sendo de *T. gondii* somente em 1909 (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

Em homenagem e comemoração, diversos autores revisaram o tema (AJIOKA; MORRISSETTE, 2009; DUBEY, 2016; FERGUSON, 2009; DUBEY, 2008) A seguir, elencamos alguns dos principais desdobramentos desde então.

QUADRO 1 – Principais fatos históricos sobre a o *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose

ANO	FATOS HISTÓRICOS	REFERÊNCIA
1937	O primeiro isolado viável de <i>T. gondii</i> obtido de um animal	Albert B. Sabin e Peter K. Olitsky
1939	O Primeiro isolado de <i>T. gondii</i> em humano.	David Cowen e Beryl Paige
1941	provou serem iguais os isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de humanos ou animais	Albert B. Sabin
1942	O tratamento da toxoplasmose foi introduzido. O uso de Sulfonamidas, incluindo a sulfadiazina, foi eficaz contra <i>T. gondii</i> em estudos realizados	Albert B. Sabin e J. Warren
1943	O primeiro caso de toxoplasmose congênita fatal e um caso de toxoplasmose aguda fatal foram descritos no Brasil	Guimarães et al.
1953	A pirimetamina demonstrou sinergia com sulfadiazina contra taquizoítos em divisão em estudos realizados	D. E Eyles e N. Coleman
1957	Ficou comprovado que a adição de ácido fólico melhora a atividade da sulfadiazina e da pirimetamina	J. K. Frenkel e G. H. Hitchings
1948	É desenvolvido um teste sorológico denominado “Teste de Sabin-Feldman”	Albert B. Sabin e Harry A. Feldman
1949	A patogênese da toxoplasmose, incluindo uma descrição de hidrocefalia, foi detalhada pela primeira vez	Jacob K. Frenkel
1952	Estabelece-se a “Tétrade de Sabin” atribuindo retinocoroidite, hidrocefalia, encefalite seguida de	Albert B. Sabin e colaboradores

	calcificação cerebral e distúrbios psicomotores aos sinais da toxoplasmose congênita	
1959	É desenvolvido o primeiro teste de aglutinação direta (DAT - direct agglutination test), o qual não logrou sucesso devido a sua baixa especificidade e a necessidade de grande número de taquizoítos em cada teste	J. D. Fulton e J. L. Turk
1968	Descreve-se um teste para detectar anticorpos da classe IgM no sangue do cordão umbilical	Jack S. Remington e colaboradores
1980	O teste de aglutinação direta de Fulton e Turk foi aperfeiçoado	Georges Desmonts e Jack S. Remington
1995	É validado um teste sorológico utilizando o isolamento do parasito como padrão	Dubey e colaboradores

Fonte: Compilado bibliográfico adaptado pelo autor.

A partir de então, os testes sorológicos melhoraram e diversificaram-se ao longo dos anos. Desde sua descoberta, o teste de Sabin-Feldman tem sido o padrão-ouro por muitos anos em termos de sensibilidade e especificidade. Muitos métodos foram desenvolvidos, desde testes indiretos como IFAT (Indirect Fluorescence Antibody Tests) (REMINGTON, 1969) até hemaglutinação; ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay); e ELISA de captura (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; WEISS; KIM, 2007). Atualmente, a maioria dos laboratórios clínicos utilizam a técnica de ELISA para a triagem de rotina de IgG e IgM específicos, enquanto outras técnicas são reservadas principalmente para laboratórios de referência.

Apesar de sua relevância clínica, somente a partir de 1960 que o complexo ciclo de vida do *T. gondii* começou a ser esclarecido (HUTCHISON et al., 1969; JACOBS; REMINGTON; MELTON, 1960a, 1960b). Através da descoberta dos felídeos como hospedeiros definitivos (FRENKEL, 1973), a transmissão de oocistos por meio das fezes desses animais, classificação e caracterização dos três estágios infecciosos do *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos (em cistos teciduais) (DUBEY; FRENKEL, 1976; FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970) e os esporozoítos (em oocistos) (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970) foi possível o completo entendimento do seu ciclo de vida (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Em 1988, Y. Suzuki e colaboradores demonstraram o papel do IFN- γ na imunidade e proteção contra o *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988). E em 1991, o pesquisador Brasileiro, Ricardo

T. Gazzinelli e seus colaboradores definiram a função das células CD4+ e CD8+ na proteção contra o *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1991).

Em 1989, J L Burg e colaboradores utilizaram o teste de PCR para detectar DNA de *T. gondii* a partir do gene B1 (BURG et al., 1989), a qual facilitou grandemente o diagnóstico, bem como a descrição e genotipagem de isolados de *T. gondii*. Para tanto, os avanços na compreensão da diversidade genética e das diferentes cepas do *T. gondii* foram essenciais. A descrição de cepas recombinantes (PFEFFERKORN; PFEFFERKORN, 1980), o uso de isoenzimas para distinguir cepas (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992) e a análise do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP) (SIBLEY et al., 1992) permitiram distinguir linhagens clonais clássicas ou arquetípicas de *T. gondii* e agrupá-las em tipos I–III (HOWE; SIBLEY, 1995).

Em 2005, Asis Khan e colaboradores mapearam genoma do *T. gondii* (KHAN et al., 2005).

Em 2008, a pesquisadora brasileira, Hilda F. J. Pena e colaboradores descreveram a estrutura populacional do *T. gondii* no Brasil e agrupou as diferentes linhagens em quatro grupos denominados tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008).

2.2 Taxonomia e ciclo biológico

T. gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae, sendo *T. gondii* a única espécie do gênero *Toxoplasma* identificada até o momento (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) (SPLENDORE, 1908) (BERTRANPETIT et al., 2017; LEVINE, 1988) (AJIOKA; FITZPATRICK e REITTER 2001). A etimologia que denomina o gênero *Toxoplasma* provém do grego *toxon*= arco e *plasma*= corpo e recebeu esse nome, devido a sua morfologia, que é semelhante a uma lua crescente (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) (SOUZA; BELFORT JR., 2014).

Apresentam ciclo biológico heterógeno facultativo, ou seja, podem depender ou não de mais de um hospedeiro para realizarem seu ciclo de vida (SOUZA; BELFORT JR., 2014). *T. gondii* tem como hospedeiros definitivos membros da família Felidae e como hospedeiros

intermediários outros animais homeotérmicos durante seu ciclo de vida (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O ciclo de vida do *T. gondii* (Figura 1) apresenta a fase sexuada que ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (felídeos) (GOLDMAN; CARVER; SULZER, 1958) e a fase assexuada, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários por multiplicação rápida (taquizoítos) (DUBEY; FRENKEL, 1972). Sua morfologia depende do estágio do parasito e suas formas infectantes dividem-se em: taquizoítos presentes nos fluídos corporais, bradizoítos presentes em cistos teciduais (DUBEY; FRENKEL, 1976; FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970) e esporozoítos alojados em esporocistos no interior de oocistos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970) (HARITO et al., 2017).

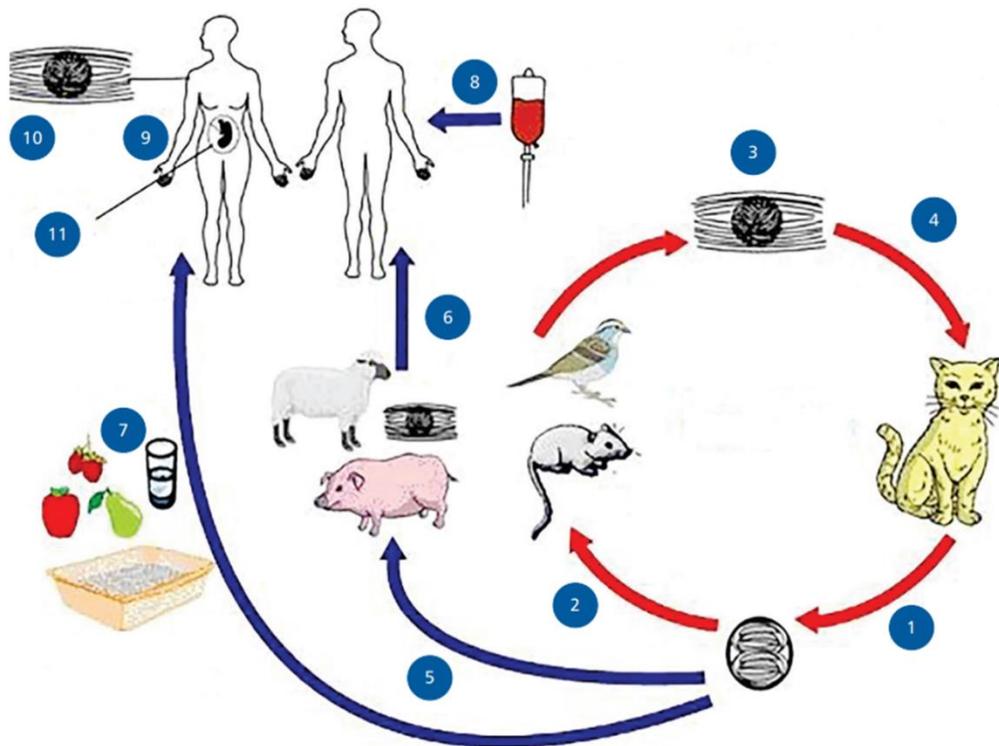


Figura 1: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Fonte: Adaptada do Centers for Disease Control and Prevention, 2020 (<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>). 1: os oocistos são eliminados em grande número nas fezes do gato, geralmente durante uma a três semanas, e levam de um a cinco dias para se tornarem infectantes (esporulados); 2: os hospedeiros intermediários na natureza (incluindo pássaros e roedores) são infectados após o consumo de solo, água ou material orgânico contaminado com oocistos esporulados; 3: os oocistos transformam em cistos teciduais nos hospedeiros intermediários; 4: os gatos são infectados após consumir hospedeiros intermediários que abrigam cistos de *T. gondii* no tecido (carnivorismo) ou infectam-se diretamente pelo consumo de oocistos; 5: animais criados para consumo humano e caça selvagem também podem ser infectados após o consumo de oocistos do ambiente, e o agente se alojará em seus tecidos; 6: o consumo de carne crua ou mal passada de animais com cistos teciduais pode transmitir toxoplasmose; 7: consumir alimentos ou água contaminada com oocistos ou manusear caixas de areia com fezes de um gato que está eliminando oocistos sem os devidos cuidados podem transmitir toxoplasmose pela via oral; 8: transfusão de sangue ou transplante de órgãos de indivíduos com toxoplasmose pode transmitir o parasito; 9: fetos podem ser infectados por transmissão vertical; 10: em hospedeiro humano, os parasitos formam cistos nos tecidos, mais comumente no músculo esquelético, no miocárdio, no cérebro e nos olhos. Esses cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro; 11: o diagnóstico de infecções congênitas também pode ser realizado pela detecção do DNA do *T. gondii* no líquido amniótico por meio de métodos moleculares.

Os taquizoítos estão presentes na fase inicial e aguda da infecção (Figura 2A). Diferem-se das demais formas infectantes devido a sua rápida capacidade de replicação, independente da célula hospedeira (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Taquizoítos invadem as células nucleadas por penetração ativa e formam um vacúolo parasitóforo que o protege do sistema imune do hospedeiro, multiplicando-se rapidamente por fissão binária até que ocorra a ruptura da célula e liberação dos taquizoítos (SIBLEY; ANDREWS, 2000). Os quais invadem novas células e o ciclo intracelular se repete (DUBEY, 2021). Essa destruição celular é responsável pela manifestação dos sinais clínicos da toxoplasmose. Após determinado número de divisões, os taquizoítos se multiplicam de forma mais lenta e se acumulam nos tecidos em forma de cistos teciduais. Alguns taquizoítos que sobrevivem passam por um estágio de conversão para bradizoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) Sabe-se que os taquizoítos são capazes de modular o sistema imunológico de seu hospedeiro para evitar a resposta imune (HUNTER; SIBLEY, 2012). Em sua morfologia, observa-se formato característico de meia-lua (NICOLLE; MANCEAUX, 1909), chegando a medir aproximadamente 2 a 6µm onde sua extremidade anterior é pontiaguda e posterior arredondada (SOUZA; BELFORT JR., 2014) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Bradizoítos podem ser encontrados em diversos tecidos e estabelecem a fase crônica da toxoplasmose (Figura 2B). Podem persistir por toda a vida de um hospedeiro imunocompetente, geralmente sem causar danos. Entretanto, quando hospedeiros infectados cronicamente se tornam imunocomprometidos (hospedeiros com baixa imunidade, consideradas imunossuprimidas, apresentam enfraquecimento do sistema imunológico), os bradizoítos transformam-se em taquizoítos e causam diversos tipos de lesões (BUZONI-GATEL et al., 2006). Bradizoítos correspondem à forma lenta de proliferação e estão presentes em cistos teciduais (DUBEY; FRENKEL, 1976; FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970). O tamanho dos cistos é variável pelo número de bradizoítos em seu interior, podendo chegar até 200 µm de diâmetro (FREPPPEL et al., 2019). São formas resistentes a enzimas, como tripsina e pepsina e podem permanecer viáveis nos tecidos por vários anos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os cistos do *T. gondii* podem ser encontrados com predominância no sistema nervoso, músculos esquelético e cardíaco (PEREIRA et al., 2017), porém outros tecidos podem alojar o parasito como, por exemplo, o intestino delgado (BRAGA et al., 2011; VICENTINO-VIEIRA et al., 2015).

Oocistos correspondem à forma de resistência e são encontrados no meio ambiente após serem eliminados por felinos durante a primo-infecção (Figura 2C). Os oocistos eliminados nas fezes não são infectantes. No meio ambiente, os oocistos passarão pela maturação, um processo chamado esporogonia, para então serem infectantes (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MAI et al., 2009). Os oocistos são estruturas sub-esféricas de 10 a 13 μm de diâmetro, com uma multicamada extremamente resistente. Após sua esporulação cada oocisto apresenta dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (oito formas infectantes por oocisto). É importante ressaltar que os oocistos são produzidos exclusivamente em hospedeiros definitivos, mas podem infectar os intermediários, pois ao serem excretados nas fezes dos felídeos, podem contaminar o ambiente e manter-se vivo durante grandes períodos em condições ambientais adequadas, sendo sua viabilidade em solo úmido já relatado em literatura por meses a anos (DUMÈTRE et al., 2013; FREPPEL et al., 2018).

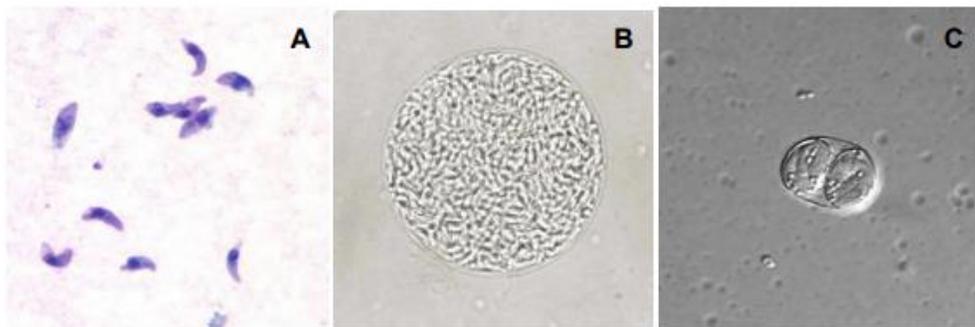


Figura 2. Taquizoítos corados com Giemsa (A), cisto tecidual (B) e oocisto esporulado de *T. gondii* (C). Fonte: Adaptado de Dubey (2021).

Humanos infectam-se naturalmente pela ingestão de cistos teciduais em carne mal-cozida ou crua e/ou pela ingestão de oocistos esporulados presentes na água ou alimentos contaminados (DUBEY, 2010; 2021). Após a ingestão, os bradizoítos são liberados dos cistos teciduais e os esporozoítos dos oocistos, a seguir invadem a túnica mucosa do trato gastrintestinal infectando enterócitos, células caliciformes e linfócitos intra-epiteliais (BARRAGAN; HITZIGER, 2008; BUZONI-GATEL et al., 2006; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; LIESENFELD, 2002). Estas duas formas de adquirir a toxoplasmose fazem da via oral a principal via de infecção (LIESENFELD, 2002; BARRAGAN; SIBLEY, 2003; SANT'ANA et al., 2012). Além disso, o parasito pode ser adquirido por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos e por transmissão congênita (HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; REMINGTON, 2008).

2.3 Epidemiologia

No mundo, a prevalência da toxoplasmose pode variar de 10% a 80% da população (ALMERIA; DUBEY, 2021; FLEGR et al., 2014; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Essa diferença percentual decorre de fatores como hábitos alimentares, culturais, econômicos e sociais, qualidade da água e a presença de saneamento (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Estudos demonstraram que a toxoplasmose está disseminada por várias regiões do mundo e que há grande variação da prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, desde 6,1% em Durango – México (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2006) até 75,2% na República Democrática de São Tomé e Príncipe, localizado no Golfo da Guiné (HUNG et al., 2007).

Apesar da elevada taxa de infecção, a maioria dos indivíduos são assintomáticos, devido a efetiva ação do sistema imune (FLEGR et al., 2014). No Brasil, em torno de 50% das crianças em idade escolar, bem como 50 a 80% das mulheres que estão em idade fértil possuem anticorpos anti-*T. gondii*. Na população brasileira em geral, sua prevalência varia de 50 a 80% (DUBEY et al., 2012), semelhante a outros países latino-americanos tais como a Argentina (BERNSTEIN et al., 2018). Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, entre 2015 e 2020, no Brasil, foram registrados 25 surtos e cinco óbitos por toxoplasmose (ALMERIA; DUBEY, 2021; BRASIL 2021). Considerando a toxoplasmose em gestantes, no Brasil estudos relatam diferentes taxas de prevalência variando de 31 a 91,6% (ALMERIA; DUBEY, 2021;

CÂMARA; SILVA; CASTRO, 2015; CAMPOS et al., 2014; MITSUKA-BREGANÓ; LOPES-MORI; NAVARRO, 2010).

2.4 Vias de transmissão

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer de forma adquirida ou congênita. A toxoplasmose adquirida caracteriza-se pela infecção do indivíduo por meio da ingestão de água (DUBEY, 2004) ou alimentos contaminados pelo *T. gondii* (ALMERIA; DUBEY, 2021; HILL; DUBEY, 2002). A toxoplasmose congênita, toxoplasmose adquirida durante a gestação, também denominada transmissão vertical, se dá quando a primo-infecção ocorre durante o período gestacional e apresenta especial relevância pelos danos causados ao desenvolvimento do feto (DUNAY et al., 2018) (ALMERIA; DUBEY, 2021; DUNAY et al., 2018; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; HILL; DUBEY, 2002; MUNIZ, 2021). Dessa forma, as três formas de infecção mais comuns para humanos são:

1. Forma adquirida via oral (fecal-oral): Ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felinos infectados presentes em jardins, caixas de areia, latas de lixo, água de esgoto ou disseminados por moscas, baratas ou minhocas (DUBEY, 2004);
2. Forma adquirida via oral (via alimentar, via natural): Ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal-cozidas (ALMERIA; DUBEY, 2021).
3. Congênita (vertical): Transmissão da mãe infectada e na fase aguda da doença para o bebê por via transplacentária. Neste caso, a toxoplasmose adquirida durante a gestação, também denominada transmissão vertical, apresenta especial relevância pelos danos que podem ser causados ao feto (ALMERIA; DUBEY, 2021; DUNAY et al., 2018; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; REMINGTON, 2008; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; WEISS; KIM, 2013).

A taxa de transmissão transplacentária é de 25% no primeiro, 54% no segundo e 65% no terceiro trimestre de gestação (TABILE et al., 2015), sendo que as sequelas para os recém-nascidos são mais graves quando a infecção ocorre no primeiro trimestre (PRADO et al., 2011; ANDRADE et al., 2018; SOUZA et al., 2021).

Outras formas de transmissão como transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais também podem ocorrer (HILL; DUBEY, 2002).

2.5 Cepas de *T. gondii* e virulência

T. gondii apresenta população altamente clonal e por isso é subclassificada em genótipos em razão de sua baixa variabilidade genética. A classificação mais utilizada distribui o parasito em três populações de linhagens clonais denominadas genótipos I, II e III, os quais foram descritos a partir de amostras biológicas de animais oriundos da América do Norte e Europa (HOWE; SIBLEY, 1995). No entanto, análise do polimorfismo de fragmentos de DNA (PCR-RFLP) com isolados de humanos e animais da América Central e do Sul, principalmente o Brasil, demonstraram o alto polimorfismo encontrado em cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil (AJZENBERG et al., 2004; BERTRANPETIT et al., 2017; PENA et al., 2008). No Brasil, Pena e colaboradores descreveram a estrutura populacional do *T. gondii* e agruparam as diferentes linhagens em quatro grupos denominados tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008).

As populações clonais de *T. gondii* podem ser classificadas de acordo com a virulência em camundongos, onde o Tipo I é altamente virulento e os Tipos II e III são geralmente de baixa virulência (HOWE, SIBLEY, 1995). Segundo esta classificação, a linhagem do Tipo I, que inclui a cepa RH utilizada no presente estudo, é conhecida por sua alta virulência em camundongos, causando alta mortalidade (HOWE; SUMMERS; SIBLEY, 1996). Para as linhagens clonais típicas do Brasil, denominadas de Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV, e com base na virulência para camundongos, o tipo BrI foi classificado como virulento, o tipo BrII e BrIV como virulentos intermediários e o tipo BrIII não virulento (PENA et al., 2008).

A cepa RH é muito utilizada como padrão na comparação entre cepas (DUBEY 2010). Ela foi isolada por Albert Sabin em 1939, na forma de cisto, de uma criança com caso letal de encefalite toxoplásmica (SABIN, 1941). Em camundongos verificou-se a transformação em uma cepa altamente patogênica ocasionando a morte dos animais com a presença de inúmeros taquizoítos na cavidade abdominal. Desde então, passou a ser utilizada como cepa referência do tipo I (DARDÉ, 2008).

2.6 Histomorfologia do cólon

Anatomicamente, em roedores, o cólon apresenta a porção proximal relacionada ao ceco e íleo e a porção distal, mais próxima do reto e canal anal. Dentre as suas funções do cólon destaca-se a capacidade de absorção de água e produção de muco. Histologicamente, o cólon é composto pelas camadas muscular, tela submucosa e mucosa (Figura 3). Nas porções livres do cólon, a camada serosa é caracterizada por protuberâncias pequenas pedunculadas formadas por tecido adiposo e mesotélio. Cada uma destas camadas diferencia-se fisiológica e morfológicamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

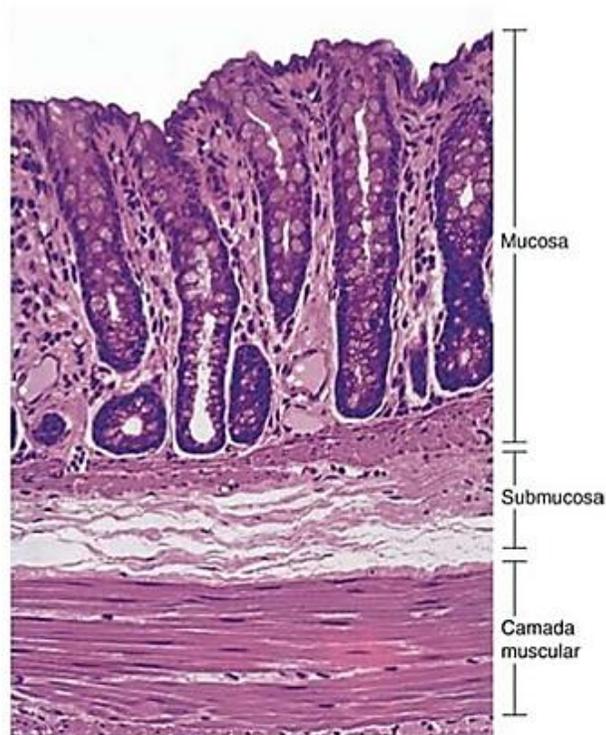


Imagem 3: Fotomicrografia da parede do cólon. Coloração HE, pequeno aumento. Fonte: Histologia básica I L.C. Junqueira e Carneiro (2013).

A túnica muscular apresenta as regiões mesocólica, antimesocólica e intermediárias, entre as duas primeiras. A região mesocólica possui uma única camada constituída por fibras musculares com disposição circular. Entre as fibras musculares observam-se feixes de fibras colágenas dispostas obliquamente e muitas fibras elásticas praticamente transversais em relação às fibras musculares. Opondo-se à região mesocólica, a face antimesocólica, a túnica muscular também se apresenta constituída apenas pela camada circular. Lateralmente às faces mesocólica e antimesocólica (regiões intermediárias), a túnica muscular apresenta duas camadas distintas, uma orientada no sentido longitudinal (externo) e outra no sentido circular (interna) (MELLO et al, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MILLS et al., 2001; VOLSKI; MELLO; NATALI, 1999).

A tela submucosa é composta por uma camada delgada de tecido conjuntivo propriamente dito denso não modulado, bastante vascularizado (vasos sanguíneos e linfáticos), constituído predominantemente por feixes de fibras colágenas conectados a pequenos feixes de fibras elásticas. Em áreas com a presença de pregas na túnica mucosa, a tela submucosa torna-se mais espessa, se direciona ao ápice das pregas e, possui uma base rica em vasos e gânglios nervosos. Próximo ao ápice das pregas, as fibras colágenas e elásticas estendem-se em direção à túnica mucosa, envolvendo a base das glândulas intestinais. Em determinados locais verifica-se a presença de folículos linfáticos isolados ou agregados, frequentes no cólon (MELLO et al, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A túnica mucosa no cólon, exceto pela ausência de vilosidade (que são projeções da mucosa), é muito semelhante à mucosa do intestino delgado. Histomorfologicamente, a túnica mucosa é altamente vascularizada e composta pela lâmina própria, epitélio e muscular da mucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MILLS et al., 2001; VOLSKI; MELLO; NATALI, 1999) Sua lâmina própria é composta por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibroblastos, macrófagos, mastócitos e numerosos linfócitos. Normalmente, os fibroblastos da lâmina própria permanecem ao redor das glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn e originam os fibroblastos subepiteliais. Estes fibroblastos possuem atividade contrátil, são comumente referenciados como miofibroblastos α -actina, e vem demonstrando envolvimento na produção de citocinas, que podem atuar na proliferação e migração de células do epitélio das glândulas intestinas (criptas

intestinais ou de Lieberkühn), em direção à superfície da mucosa (ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, 2011; KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., MITCHELL, 2008) (NASCIUTTI et al., 2016). O epitélio da mucosa é do tipo colunar simples e é composto por enterócitos com microvilos, células caliciformes secretoras de mucinas para proteção e lubrificação da mucosa e células enteroendócrinas secretoras de hormônios que auxiliam na digestão, absorção, motilidade e resposta imune local; dentre as células enteroendócrinas, as células enterocromafins responsáveis por sintetizar e liberar a serotonina (5-HT) no lúmen intestinal, especialmente em resposta a estímulos mecânicos ou químicos (LINAN-RICO et al., 2016).

2.7 Populações celulares e matriz extracelular no cólon

De maneira integrada e coordenada, diversos tipos celulares incluindo células nervosas (glia e neurônios entéricos) e células epiteliais interagem com o extenso sistema imune da mucosa para regular os processos inflamatórios na mucosa colônica (NEUNLIST et al., 2013; YOO; MAZMANIAN, 2017). O cólon abriga 70-80% das células imunes (YOO; MAZMANIAN, 2017), milhões terminações nervosas (GRUNDY; BROOKES, 2011) e um microbioma com centenas de espécies (LOZUPONE et al., 2012; SENDER et al., 2016) que interagem para manter os mecanismos tolerogênicos na mucosa (TUNIS; MARSHALL, 2014), absorção de nutrientes, manutenção da barreira epitelial e fazer frente aos desafios deflagrados no epitélio intestinal (MARGOLIS; GERSHON, 2016).

O revestimento da mucosa intestinal é composto por diferentes tipos de células epiteliais os quais medeiam à comunicação entre o hospedeiro e o ambiente luminal. As células epiteliais mais abundantes são os enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (VERGNOLLE; CIRILLO, 2018). Assim, as células epiteliais como as células caliciformes e células enterocromafins (que são células enteroendócrinas) são essenciais para a manutenção da homeostasia intestinal (FURNESS et al., 2013; KIM; HO, 2010; LATORRE et al., 2016; LIU et al., 2021).

Enterócitos são as células absorptivas mais numerosas e com funções primárias no epitélio. Correspondem a uma monocamada de células epiteliais cobertas por uma fina camada de muco o qual funciona como interface entre a superfície da barreira epitelial com a microbiota intestinal.

Por meio das microvilosidades, os enterócitos aumentam sua área superficial em centenas de vezes (HELANDER; FÄNDRIKS, 2014). São responsáveis pela absorção de água e nutrientes (GARTNER, L. P. & HIATT, 2003). Em infecções induzidas por protozoários os enterócitos produzem e liberam moléculas citotóxicas, incluindo NO (óxido nítrico), quimiocinas e citocinas as quais recrutam macrófagos e células dendríticas para o sítio da infecção (LEE; BENNOUNA; DENKERS, 2006).

As células caliciformes são responsáveis por produzir e secretar mucinas na superfície do epitélio intestinal as quais, em contato com a água proveniente do lúmen, tornam-se muco. O muco é, portanto, constituído por mucinas que essencialmente são proteínas fortemente glicosiladas que não servem apenas de barreira física (biofilme), mas também fornecem um meio que permite e facilita as trocas moleculares entre o epitélio a microbiota e o ambiente luminal (JOHANSSON; HANSSON, 2016). Desta forma, as células caliciformes exercem papel importante na manutenção da integridade do epitélio intestinal por meio da produção e liberação de mucinas, peptídeos antimicrobianos (antimicrobial peptides - AMPs), TFF3 (Trefoil Fator-3) e RETN-1 β (Resistin-like-beta) (JOHANSSON; HANSSON, 2016; KIM; HO, 2010). Células caliciformes possuem receptores para peptídeo intestinal vasoativo e a ligação leva ao aumento da produção de mucinas e TFF3. Além disso, McDole et al. (2012) demonstraram que as células caliciformes podem servir como porta para a passagem de antígenos (GAPs - goblet-cell-associated antigen passages) para serem expostos às células dendríticas na lâmina própria (MCDOLE et al., 2012).

As células enteroendócrinas são células epiteliais e se distribuem ao longo dos intestinos delgado e grosso. Ao todo existem aproximadamente 12 tipos celulares distintos os quais secretam cerca de 20 hormônios diferentes. Os hormônios liberados pelas células enteroendócrinas, incluindo grelina, somatostatina, leptina e serotonina, podem agir localmente, em outras células (incluindo células imunes), em terminações nervosas ou em órgãos distantes (FURNESS, 2016; WORTHINGTON; REIMANN; GRIBBLE, 2018). Os efeitos exercidos por meio de receptores para nutrientes em células enteroendócrinas incluem mudanças no padrão ingestão de alimentos (apetite e saciedade), alterações no ritmo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, liberação de enzimas digestivas, indução de transportadores de nutrientes e enzimas digestivas, aumento da permeabilidade da barreira intestinal, secreção de insulina

pancreática, modulação da resposta imune, proliferação celular e crescimento de tecidos (FURNESS, 2016; FURNESS et al., 2013; LATORRE et al., 2016; VERGNOLLE; CIRILLO, 2018).

Como mencionado acima, as células enterocromafins são um dos fenótipos de células enteroendócrinas. As células enterocromafins estão relacionadas com a manutenção da homeostasia intestinal, absorção de nutrientes, peristaltismo e atuando na manutenção da barreira epitelial (CANI; EVERARD; DUPARC, 2013). Possivelmente pela sua produção e liberação de serotonina (5-HT) (BERTRAND, 2009; CASAGRANDE et al., 2022; LIU et al., 2021; PASTRE et al., 2019a, 2021). Acredita-se que a 5-HT juntamente com outros mediadores são capazes de iniciar ou manter padrões motores e respondem estímulos mecânicos e químicos aplicados ao epitélio da mucosa liberando 5-HT no lúmen e na lâmina própria intestinal (BERTRAND; BERTRAND, 2010).

A 5-HT liberada na lâmina própria pode ser captado por plaquetas sanguíneas por meio do transportador de serotonina (SERT) ou ainda interagir com células imunes e interferir nos movimentos peristálticos (O'HARA; SHARKEY, 2007). Estudos anteriores comprovaram que a 5-HT é um neurotransmissor excitatório, responsável não somente pelo estímulo de contrações peristálticas e secretórias pós-prandial, mas também por ativar os nervos sensoriais extrínsecos (GERSHON; TACK, 2007) e iniciar mecanismos de defesa do hospedeiro, entre eles, a inflamação (MARGOLIS; POTHOUKAKIS, 2009).

De acordo com a literatura, a 5-HT interage com células epiteliais e imunes como uma molécula sinalizadora, capaz de modular a inflamação intestinal (VEDOVATO et al., 2015; WANG, 2021). A liberação de 5-HT estimula vias pró-inflamatórias, como a via do NF- κ B, que resultam na produção de mediadores inflamatórios como IL-17 e IFN- γ em células dendríticas, resultando na ativação de células T (KANNEN et al., 2018). Em ratos e camundongos, mastócitos sintetizam 5-HT por meio da enzima triptofano hidroxilase I (TPH1) (MARGOLIS; GERSHON, 2016).

Mastócitos são células provenientes da medula óssea que estão presentes na pele, pulmões, na lâmina própria e epitélio das mucosas e contêm grânulos citoplasmáticos abundantes preenchidos por citocinas, histamina (ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, 2011; ALBERT-

BAYO et al., 2019; BISCHOFF, 2009; REBER et al., 2015) e outros mediadores como a 5-HT (BISCHOFF, 2016; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014). Os mastócitos podem ser ativados por diversos estímulos, principalmente por interações com a imunoglobulina E (IgE) e participam das respostas alérgicas e inflamatórias (THEOHARIDES et al., 2010). Sabe-se que os mastócitos são capazes de contribuir na regulação da imunidade da mucosa, interagindo com o sistema endócrino e o sistema nervoso entérico (ALBERT-BAYO et al., 2019; CONTI et al., 1998).

Uma vez ativados, os mastócitos produzem IL-4 e IL-10 e TGF- β (CONTI et al., 2018; ROMAGNANI, 2002) que são capazes de modular a resposta inflamatória. Além disso, dependendo do estímulo, liberam histamina, heparina, sulfato de condroitina e a 5-HT (CONTI et al., 2018) Sendo a última um neurotransmissor fundamental que atua estimulando as vias pró-inflamatórias no intestino (KANNEN et al., 2018) o que demonstra que além do seu papel na inflamação, atua também em processos infecciosos (BISCHOFF, 2016).

Além disso, o aumento no número dos mastócitos intestinais (mastocitose) resulta em alterações na permeabilidade intestinal, recrutamento e ativação de células imunes, mudança no fluxo sanguíneo, na coagulação, na permeabilidade vascular, na cicatrização, fibrose e no peristaltismo (BISCHOFF; KRÄMER, 2007; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014; HAMMAD; LAMBRECHT, 2015).

A mastocitose consiste no acúmulo de mastócitos devido a sua proliferação exacerbada em órgãos, tecidos e no trato gastrointestinal. Esta condição compreende um grupo diverso de manifestações clínicas que possui um prognóstico bastante variável. Sua etiopatogenia ainda não está claramente evidenciada, mas há indícios de que provavelmente decorre por uma resposta a um estímulo considerado anormal (DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014; VALENT et al., 2021). Koepfel et al. (1998) relataram a presença da mastocitose gastrintestinal em um paciente com quadro de meningoencefalite toxoplásmica. Em outro estudo, Pastre et al. (2019) demonstram que a infecção aguda por *T. gondii* causou mastocitose no intestino delgado de camundongos, devido ao aumento na quantidade de mastócitos totais e serotoninérgicos (5-HT+).

Muitas substâncias produzidas pelos mastócitos tem o potencial de afetar o tecido conjuntivo. A histamina e a heparina liberadas têm demonstrado serem estímulos para o crescimento de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno (DA SILVA; JAMUR; OLIVER,

2014). Estas substâncias também podem influenciar a formação de cicatrizes (CLAMAN, 1993). Os mastócitos também podem contribuir diretamente para a formação de fibroses, através de sua habilidade para produzir glicoproteínas da matriz extracelular (THOMPSON-SNIPES et al., 1991).

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional que compõe o ambiente extracelular dos tecidos conjuntivos. No cólon, a matriz extracelular confere o suporte físico, que promove a integridade e elasticidade tecidual (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Na tela submucosa e na lâmina própria são encontrados fibroblastos, que fazem a manutenção da matriz extracelular por meio da secreção de fibras colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), que são as principais proteínas da matriz extracelular (KUSINDARTA; WIHADMADYATAMI, 2018). Já foram identificados pelo menos 30 tipos de fibras colágenas (LIN et al., 2020), sendo que, no intestino, as mais encontradas são as fibras dos tipos I, III e IV.

Os tipos I e III são os mais abundantes no organismo humano (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016; WANG et al., 2020) e ambos são do tipo fibrilar (XUE; JACKSON, 2015) e são os principais componentes da matriz intersticial (NIELSEN; KARSDAL, 2016). O colágeno do tipo III é secretado por fibroblastos, desempenha um papel importante em patologias associadas a inflamação (NIELSEN; KARSDAL, 2016) e é um importante componente estrutural em órgãos ocos, como grandes vasos sanguíneos, útero e intestino (KUIVANIEMI; TROMP, 2019). Ele é considerado essencial para a produção do colágeno de tipo I (LIU et al., 1997), uma vez que é o principal colágeno encontrado nos estágios iniciais da reparação tecidual, a seguir, o colágeno do tipo III é degradado e há o aumento da síntese do colágeno tipo I (GONZALEZ et al., 2016). Este, por sua vez, está presente na maioria dos tecidos como um importante componente estrutural em vários órgãos (HENRIKSEN; KARSDAL, 2016). Já o colágeno do tipo IV é normalmente mais flexível que os demais, uma vez que as suas fibras são ligadas cabeça a cabeça, o que possibilita a formação de lâminas (ABREU-VELEZ; HOWARD, 2012). Logo, este é o principal componente da membrana basal, estrutura que fornece suporte para as células epiteliais e endoteliais (SAND; GENOVESE; KARSDAL, 2016).

Os linfócitos intra-epiteliais (LIEs) são principalmente linfócitos T que têm o potencial de oferecer a primeira linha de defesa do na lâmina própria e no epitélio da mucosa colônica a diversas infecções (JABRI; ABADIE, 2015; VERGNOLLE; CIRILLO, 2018). As principais

subpopulações de LIEs são aqueles que apresentam receptores T constituídos por diferentes cadeias glicoproteicas: $\text{TCR}\gamma\delta^+$, $\text{TCD8}\alpha\alpha^+$ e $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (HOYTEMA VAN KONIJNENBURG; MUCIDA, 2017). Além destas, os linfócitos $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+$ e TCD8^+ periféricos maduros podem se tornar LIEs após a migração para a mucosa do intestino (BUZONI-GATEL et al., 1999; CHEN et al., 2002; CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011; HOYTEMA VAN KONIJNENBURG et al., 2017; ISMAIL et al., 2011).

Os LIEs são fundamentais na manutenção da homeostasia da mucosa intestinal e na inflamação intestinal. Infecções por parasitos induzem uma resposta das células $\text{TCD}\gamma\delta^+$, alterando sua motilidade e padrão de movimento entre as células do epitélio intestinal (HOYTEMA VAN KONIJNENBURG et al., 2017). Entre as funções atribuídas aos LIEs pode-se destacar a imediata produção de citocinas que atuam no combate a patógenos, na inflamação e na manutenção da homeostasia intestinal (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010). Entre as citocinas sintetizadas destacam-se a IL-17 e $\text{INF-}\gamma$ capazes de acentuar a resposta inflamatória intestinal (MARTIN et al., 2009), ou ainda citocinas capazes de modulá-la como a IL-4, IL-10 e o $\text{TGF-}\beta$ (CHEN et al., 2002), pois a ativação exacerbada destas células pode resultar em distúrbios inflamatórios e significativa imunopatologia (ISMAIL et al., 2011; LIESENFELD, 2002; TANG et al., 2009).

T. gondii se expande sistemicamente, induzindo uma significativa imunopatologia associada à resposta imune Th1 (EGAN et al., 2009; HAND et al., 2012) e diminuição das células T regulatórias (Tregs) (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; OLDENHOVE et al., 2009) (Figura 4). Após a exposição ao *T. gondii*, células do epitélio intestinal e imunes reconhecem o parasito por meio de receptores de reconhecimento de padrão na superfície celular, como os receptores Toll-likes (TLRs) (KIVIT et al., 2014), que ativam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12 e $\text{INF-}\gamma$ que, por sua vez, induzem uma resposta Th1 subsequente, essencial para a resistência do hospedeiro (SUZUKI et al., 1988; RAETZ et al., 2013). Porém, apesar de controlar a disseminação de taquizoítos, este mecanismo de resistência pode ser prejudicial ao hospedeiro uma vez que induz significativa imunopatologia (GAZZINELLI et al., 1996; HEIMESAAT et al., 2006) devido à redução de células T regulatórias (OLDENHOVE et al., 2009), perda da tolerância aos comensais (HAND et al., 2012) e disbiose, causada pela

depleção das células de Paneth induzida por IFN- γ (RAETZ et al., 2013) e células caliciformes (GÓIS et al., 2016; SANT'ANA et al., 2012).

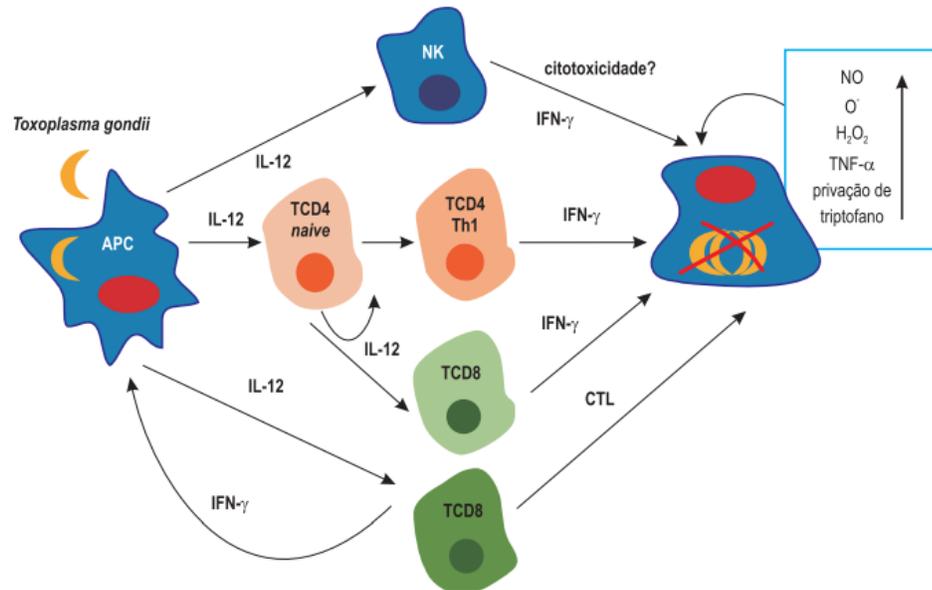


Figura 4 Ativação da imunidade celular efetora na infecção por *T. gondii*. Fonte: SOUZA, W.; BELFORT JR., 2014.

2.8 Perspectivas terapêuticas e *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Atualmente, o tratamento convencional para toxoplasmose consiste no uso da pirimetamina e sulfadiazina. Onde a pirimetamina age inibindo a redução de dihidrofolato redutase e a sulfadiazina na inibição de dihidropteroato sintase. Esse tratamento foi adotado durante anos e seu uso desenfreado levou ao surgimento de cepas de *T. gondii* resistentes (FAYE et al., 2011). Além disso, o uso deste fármaco pode causar distúrbios colaterais como leucopenia, efeitos dermatológicos e gastrointestinais (RIBEIRO; CARVALHO, 2022). Diante desse cenário, fica evidente a necessidade de mais estudos voltados para descoberta de novas substâncias com potencial de combate a essa infecção, seja como componentes de um novo medicamento, ou de extratos vegetais que poderiam atuar como imunostimulantes com efeito sobre *T. gondii* (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2016). Podemos encontrar na literatura o estudo de inúmeras plantas e compostos bioativos utilizadas para estudos voltados para redução dos efeitos colaterais causados pela infecção por *T. gondii*, como o estudo da infusão de *Artemisia annua* que se mostrou eficaz no combate a infecção por ser de baixa toxicidade e possuir ação inibitória do

parasito (DE OLIVEIRA et al., 2009; ROSTKOWSKA et al., 2016). Além disso, o extrato aquoso de *Vernonia colorata* demonstrou possuir potencial terapêutico na infecção por *T. gondii* (BENOIT-VICAL et al., 2000). Dentro desse contexto, surge o interesse pela planta citada a seguir.

Echinacea (Figura 5) é mundialmente conhecida por ser um gênero de plantas típicas das montanhas rochosas norte-americanas. Quando identificada pela primeira vez em meados do século XVIII, foi “batizada” inicialmente como *Rudbeckia purpurea* (MILLER; YU, 2004) (MILLER; YU, 2004) (MILLER; YU, 2004). O seu potencial medicinal foi comprovado em muitos estudos e dentre estes estão o uso para tratamento de câncer, processos inflamatórios e dores em geral (BURLOU-NAGY et al., 2022; VIMALANATHAN et al., 2022).

A forma de preparo e indicação de uso pode variar de acordo com a espécie de *Echinacea* a ser utilizada. As três principais espécies, *Echinacea purpurea* (L). Moench, *Echinacea angustifolia* e *Echinacea pallida*, já foram muito consumidas por ameríndios nativos e são atualmente também utilizadas no combate de infecções respiratórias e quadros inflamatórios como resfriados, bronquites, inflamações de faringe e boca, sendo a *E. purpurea* objeto do presente estudo. (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2016 ; BURLOU-NAGY et al., 2022; VIMALANATHAN et al., 2022).



Figura 5. Fotografia ilustrativa da *E. purpurea*. Fonte: milenio.com - Cinco benefícios de la equinácea [Internet]. [cited 2022 November 3]. Disponível em: <https://www.milenio.com/ciencia-y-salud/cinco-beneficios-de-la-equinacea>.

Comercialmente, é possível encontrar a *E. purpurea* em sua forma fresca, seca ou em raízes e extratos alcoólicos com ginseng ou alho, que potencializa seu efeito (CATANZARO et al., 2018). As plantas dessa espécie possuem um ciclo de vida longo e têm sido cultivadas ao redor de todo mundo para fins medicinais, alimentares e ornamentais (MISHIMA et al., 2004). Podem-se citar como componentes importantes dessa planta, derivados do ácido cafeico, que possui propriedades antioxidantes, neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antiproliferativas, antibacterianas, antivirais, anti-ateroscleróticas e anticancerígenas, além de alquilamidas, flavonóides, polissacarídeos, lipoproteínas e poliacetilenos. Vale ressaltar que os derivados do ácido cafeico e das alquilamidas já mostraram possuir efeitos imunoregulatórios importantes em estudos anteriores (BALČIŪNAITĖ-MURZIENĖ et al., 2021; BURLOU-NAGY et al., 2022; VIMALANATHAN et al., 2022).

Os primeiros relatos sobre o potencial medicinal de *E. purpurea* estão descritos no livro de Johannes Clayton na segunda edição do livro Flora Virgínica em 1762. Seu potencial imunomodulador foi primeiramente evidenciado pelo pesquisador Victor Von Unruh (1913), através de um relatório que indica o aumento da fagocitose da bactéria da tuberculose durante o

uso da planta (SHARIFI-RAD et al., 2018). Diversos estudos denotam também os efeitos imunomoduladores da *E. purpurea* refletindo um aumento da imunidade inata e específica, porém também foi evidenciado que a espécie e o local da planta utilizado para uso medicinal podem influenciar no seu potencial anti-inflamatório e antimicrobiano (CATANZARO et al., 2018; BURLOU-NAGY et al., 2022; VIMALANATHAN et al., 2022). Na *E. purpurea*, os compostos bioativos isolados com propriedades farmacológicas mais importantes foram as alquilamidas, glicoproteínas, flavonóides e compostos fenólicos, como ácido cafeico e chicórico. Vale ressaltar que nas raízes, os componentes responsáveis pela imunomodulação são as glicoproteínas, alquilamidas e polissacarídeos (BURLOU-NAGY et al., 2022; VIMALANATHAN et al., 2022).

Acredita-se que a imunomodulação decorrente do uso da *E. purpurea* pode ocorrer através da estimulação da atividade de células *natural killer* (NK) no sangue periférico. *E. purpurea* também se mostra efetiva na produção de citocinas e em mediadores de resposta imune como IL-1, TNF- α e IL-10. (PARK et al., 2017). O recente estudo *in vivo* em Camundongos C57Bl/6 de Park et al, 2021 avaliou os efeitos imunomoduladores do extrato de *E. purpurea* em camundongos, demonstrando que há aumento da proliferação de células B, aumento dos níveis de MHC II, células TCD4 +, LIEs e células NK, melhorando significativamente a resposta imune dos camundongos (PARK et al., 2021). Além disso, Vimalanathan et al. (2022) relataram que o extrato de Echinaforce[®] (*E. purpurea* (Echinaforce[®] extract, EF) demonstrou atividade antiviral em sete variantes de preocupação para SARS-Cov2 que foram testados, sugerindo uma afinidade dos marcadores do extrato com as variantes do estudo, sendo assim, uma possibilidade de suporte ao fortalecimento imunológico associado a vacinação (VIMALANATHAN et al., 2022). Sabendo do potencial supracitado da planta, nós hipotetizamos que a utilização da *E. purpurea* seria eficaz no tratamento da toxoplasmose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com *E. purpurea* (L.) Moench.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar as alterações histomorfométricas e histopatológicas na parede do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com *E. purpurea* (L.) Moench.

Avaliar as alterações em células que expressam serotonina (5-HT) na mucosa do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com *E. purpurea* (L.) Moench.

4 **CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO**

Imunoestimulação com extrato aquoso de *Echinacea purpurea* (L.) Moench melhora as alterações histopatológicas causadas por *Toxoplasma gondii* em cólon de *Rattus norvegicus*

Artigo científico submetido à revista *Life Sciences*

<https://www.elsevier.com/journals/life-sciences/0024-3205/guide-for-authors#>

Imunoestimulação com extrato aquoso de *Echinacea purpurea* (L.) Moench melhora as alterações histopatológicas causadas por *Toxoplasma gondii* em cólon de *Rattus norvegicus*

Luana Araújo das Mercês ^a, Maria José Pastre ^b, Henrique Cazanti Sona ^b, Karine Delgado de Souza ^c, Emerson Luiz Botelho Lourenço ^c, João Luís Garcia ^d, Catchia Hermes-Uliana ^e, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana ^b, Sibeles de Oliveira Tozetto Klein ^f, Marcelo Biondaro Gois ^{a g}

^a Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

^b Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil;

^c Departamento de Farmácia, Universidade Paranaense, PR, Brasil;

^d Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil;

^e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS, Brasil;

^f Universidade Federal Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil;

^g Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde, Universidade Federal de Rondonópolis, MT, Brasil.

Resumo

O tratamento da Toxoplasmose consiste no uso combinado de sulfadiazina e pirimetamina, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas eficazes frente a esta zoonose. O objetivo do estudo foi avaliar as alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* e imunoestimulados com 100 mg/kg de *Echinacea purpurea*. Vinte e quatro *Rattus norvegicus* machos foram separados em quatro grupos (n=6): controle (GC); infectado com 500 oocistos de *T. gondii* e não imunoestimulados (GI); controle imunoestimulado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GC+EP); e infectado e imunoestimulado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GI+EP). A imunoestimulação via oral com *E. purpurea* iniciou quando os ratos do GC+EP e GI+EP completaram 36 dias de idade. A inoculação de 500 oocistos de *T. gondii* nos ratos do GI e GI+EP ocorreu aos 64 dias de idade. A imunoestimulação com *E. purpurea* terminou aos 92 dias de idade. Após, os ratos foram submetidos à eutanásia e o cólon foi avaliado. Demonstramos que houve aumento das células caliciformes, de mastócitos totais, mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT e na proporção de linfócitos intra-epiteliais no cólon de ratos infectado e imunoestimulados. Em adição, demonstramos que a infecção causou alterações histopatológicas na parede do cólon, as quais diminuíram devido a imunoestimulação com *E. purpurea*. Em conjunto, nossos resultados sugerem que parte das alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon foram reduzidas pela imunoestimulação com o extrato aquoso de *E. purpurea*.

Palavras-chave: toxoplasmose, compostos bioativos, serotonina, mastócitos, imuno-histoquímica.

*Autor para correspondência:

Marcelo Biondaro Gois marcelobiondaro@gmail.com

Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde, Universidade Federal de Rondonópolis, MT, Brasil.

4.1 Introdução

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose uma zoonose de distribuição mundial (ALMERIA; DUBEY, 2021; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000), o qual têm felídeos como hospedeiros definitivos e todos os demais homeotérmicos, incluindo humanos como hospedeiros intermediários (DUBEY, 2021).

Uma vez ingerido, o parasito invade a mucosa intestinal, multiplica-se e invade novas células e disseminam-se via sangue e linfa (BARRAGAN; DAVID SIBLEY, 2003; BARRAGAN; HITZIGER, 2008; COURRET et al., 2006). Após a exposição ao *T. gondii*, células do epitélio intestinal e imunes reconhecem o parasito (KIVIT et al., 2014) e secretam citocinas pró-inflamatórias (SUZUKI et al., 1988; RAETZ et al., 2013). Contudo, apesar de controlar o parasito, este mecanismo de resistência pode ser prejudicial ao hospedeiro e causar imunopatologia (GAZZINELLI et al., 1996; HEIMESAAT et al., 2006; OLDENHOVE et al., 2009). Vários estudos demonstraram que a toxoplasmose prejudica o trato gastrointestinal (CASAGRANDE et al., 2022; GÓIS et al., 2016; PASTRE et al., 2019b; SANT'ANA et al., 2012; TREVIZAN et al., 2016; VICENTINO-VIEIRA et al., 2015), outros demonstraram que o tratamento convencional já não causa o efeito esperado (FAYE et al., 2011; RADKE et al., 2018), tornando fundamental o desenvolvimento de terapêuticas alternativas.

Diante desse cenário, fica evidente a necessidade de estudos voltados para descoberta de compostos bioativos capazes de mitigar os efeitos da infecção toxoplásmica ou de estimular o sistema imune do hospedeiro (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2016). Assim, extratos vegetais têm grande importância na pesquisa por substâncias tendo em vista o desenvolvimento de novos medicamentos (JUNIOR et al., 2016). Dentre as possibilidades está *Echinacea purpurea* (L.) Moench, planta já reconhecida por seus resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo* (BURLOU-NAGY et al., 2022; CHOI; JIANG; CHU, 2013; VIMALANATHAN et al., 2022).

E. purpurea (L.) Moench é também conhecida como “coneflower” púrpura (KUMAR; RAMAIAH, 2011), pertence à família das Asteraceae, um grupo de plantas silvestres e perenes cujas principais características são as raízes aprumadas, cilíndricas, estriadas longitudinalmente, que desprendem odor aromático e sabor adocicado provocando um discreto adormecimento na língua (MCKEOWN, 1999; PELLATI et al., 2005). Estudos fitoquímicos com *E. purpurea*

mostraram a presença de derivados de ácido cafeico, polifenóis, polissacarídeos, proteoglicanos, alquilamidas lipofílicas, glicosídeos de ácido chicórico e substâncias com atividade imunoestimulante, anti-inflamatórias e antioxidante (LUPING et al., 2005; ONISZCZUK et al., 2019) (DAPAS et al., 2014; PARNHAM, 1996; BORCHERS et al., 2000; BURLOU-NAGY et al., 2022; HUDSON; VIMALANATHAN, 2011; KUMAR; RAMAIAH, 2011; VIMALANATHAN et al., 2022).

Sabe-se que o cólon é um local de grande interação antigênica devido à sua intensa relação com microrganismos comensais que interagem no lúmen para manter os mecanismos tolerogênicos na mucosa, absorção de nutrientes, manutenção da barreira epitelial e fazer frente aos desafios deflagrados no epitélio intestinal (LOZUPONE et al., 2012; TUNIS; MARSHALL, 2014; SENDER et al., 2016; MARGOLIS; GERSHON, 2016; YOO; MAZMANIAN, 2017). Devido a esta exposição, o cólon possui importantes mecanismos de defesa os quais dependem da integridade das células e tecidos que compõem a sua parede. Considerando as propriedades naturais da *E. purpurea*, bem como os danos que podem ser causados pela infecção toxoplásmica, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações em células e tecidos que compõem a parede do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) e imunoestimulados com 100 mg/kg de *E. purpurea* (L.) Moench.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Aspectos Éticos e Legais

O protocolo experimental (nº 7633021018; Anexo 1) foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Todos os procedimentos descritos neste estudo estão em conformidade com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal Laboratorial (SBCAL). A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos (Cadastro nº AA5776C; Anexo 2).

4.2.2 Preparação do extrato aquoso

Os extratos foram obtidos por infusão, conforme recomendação da Farmacopéia Brasileira (PIANETTI; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2011). A partir do extrato vegetal seco e em pó, foi preparado o extrato aquoso de *E. purpurea* na concentração de 4%. Para tanto, 4 g do pó seco foram adicionadas a 100 mL de água fervente e mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos. A infusão foi preparada e filtrada e 2,5 mL/kg foi administrada, via gavagem, aos ratos do GC+EP e GI+EP. As infusões foram preparadas a fresco imediatamente antes da administração (JUNIOR et al., 2016).

As partes aéreas floridas de *E. purpurea* foram recolhidas no jardim botânico da Universidade Paranaense (Umuarama, Brasil) a 430 m de altitude acima do nível do mar (S23°47'55-W53°18'48). O espécime de *E. purpurea* está catalogado no Herbário da Universidade Paranaense (HEUP, número 3451). O material vegetal foi seco ao ar a 37 °C durante cinco dias, depois cortado e pulverizado, passando por uma malha de 40 mm (Junior et al., 2016).

4.2.3 Delineamento experimental

Em experimento cego, a partir dos 21 dias de idade, 24 *Rattus norvegicus* receberam tratamento antiparasitário oral com metronidazol (500mg/kg) durante cinco dias consecutivos e fembendazol (50mg/kg dose única). Com 28 dias de idade e sete dias após o tratamento

antiparasitário, todos os ratos foram submetidos a exame parasitológico para certificar a ausência de parasitos intestinais.

Com 33 dias de idade, os ratos foram distribuídos, aleatoriamente (<http://www.randomizer.org>), em quatro grupos experimentais (n=6), a saber: grupo controle (GC); grupo infectado com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI); grupo controle imunoestimulado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GC+EP); e grupo infectado e imunoestimulado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GI+EP).

Com 36 dias de idade, os ratos dos grupos GC+EP e GI+EP receberam, oralmente (gavagem), 100 mg/kg de *E. purpurea* durante 28 dias. A imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* continuou por mais 28 dias após a inoculação. Os ratos do GC e GI receberam água fervida em temperatura ambiente neste período. Com 64 dias de idade, os ratos do GI e GI+EP foram inoculados, oralmente, com 500 oocistos esporulados de *T. gondii*.

Todos os ratos foram mantidos (em gaiolas) no biotério do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM, com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), e foto-período de 12 horas (6-18h). Os ratos foram alimentados com ração para roedores (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os oocistos foram obtidos do laboratório de parasitologia veterinária da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, fornecidos pelo Professor Dr. João Luis Garcia, e foram esporulados em solução de ácido sulfúrico antes da inoculação para torná-los viáveis (Pastre, 2019). A imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* continuou por mais 28 dias após a inoculação, quando os ratos estavam com 92 dias de idade. No dia seguinte foram submetidos à eutanásia. A Figura 6 fornece um resumo do delineamento do experimento.

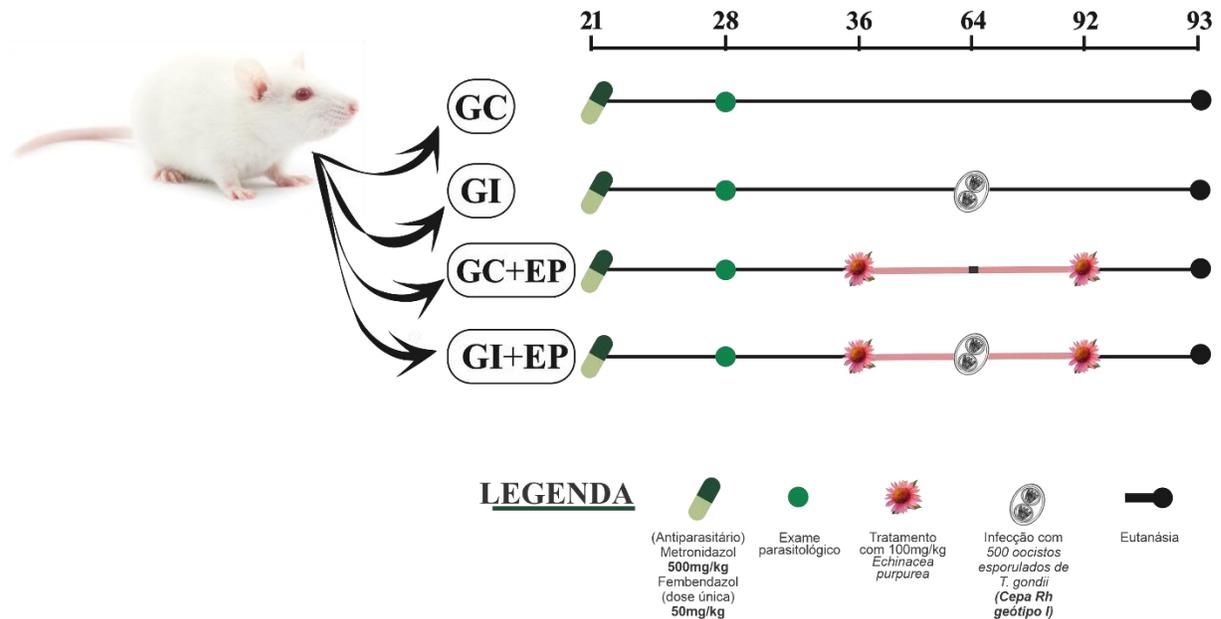


Figura 6. Esquema da metodologia utilizada no estudo. Fonte: Própria (adaptada pelo autor)

4.2.4 Eutanásia, coleta e processamento de amostras

Vinte e oito dias após a inoculação, com 93 dias de idade, os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano. Amostras de sangue foram coletadas de cada rato para confirmação da infecção por meio do teste de imunofluorescência indireta. Foi realizada a laparotomia vertical e dois centímetros do cólon foram coletados, lavados e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas.

Após a fixação, os segmentos foram embebidos em parafina para realização de quatro cortes transversais semi-seriados de 4 μm dispostos em lâminas de vidro. Após, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em séries descendentes de álcool (100° - I, II, III, 90°, 80°, 70°) e corados em: hematoxilina e eosina (HE) - para a análise quantitativa, morfométrica e histopatológica dos estratos que compõem a parede do cólon e para a quantificação de linfócitos intra-epiteliais; Periodic Acid-Schiff (PAS) - para a quantificação de células caliciformes que secretam mucinas neutras e sialomucinas lábeis; Alcian-Blue (AB) pH 1,0 - para a quantificação de células caliciformes que secretam sulfomucinas; AB pH 2,5 - para a quantificação de células caliciformes que secretam sialomucinas e sulfomucinas; Picrosirius Red - para a quantificação de fibras de colágeno tipo I e tipo III e Azul de Toluidina - para análise de mastócitos totais.

4.2.5 Análise histomorfométrica da parede do cólon

Os cortes corados em HE foram utilizados para a realização da análise histomorfométrica da parede do cólon dos ratos. Imagens capturadas com a objetiva de 10, 20, 40 e 100x foram utilizadas para a realização da análise histomorfométrica da parede do cólon, (64) medidas de cada parâmetro foram feitas em quatro cortes de cada rato. A análise histomorfométrica foi realizada usando o Image-Pro Plus[®] (Media Cybernetics, MD, EUA) (CORDEIRO et al., 2022).

4.2.6 Análise de mastócitos totais

Os cortes corados em azul de Toluidina foram utilizados para contar os mastócitos presentes em 100 campos microscópicos, na objetiva de 40x, na lâmina própria e na tela submucosa do cólon de cada rato (PASTRE et al., 2019b).

4.2.7 Imuno-histoquímica para detecção de mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT

Cortes do cólon foram submetidos a recuperação antigênica utilizando tampão citrato à 92°C em banho Maria. Após, as lâminas foram expostas ao anticorpo primários anti-5-HT (1:200) produzido em coelho (Sigma[®]) overnight. Em seguida foi adicionado polímero conjugado com peroxidase por 30 minutos e posteriormente revelado com cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (DAB). A reação de fundo foi determinada em seções incubadas na ausência de anticorpo primário (controle negativo). A hematoxilina de Mayer foi usada para contra-coloração. A imunorreatividade positiva no cólon foi definida nas células marrom-escuras. Os anticorpos e reagentes usados estão descritos na Tabela 1. Foram contadas as células enterocromafins e mastócitos 5-HT imunorreativos presentes em 50 campos microscópicos na lente objetiva de 40x (PASTRE et al., 2019b; VICENTINO-VIEIRA et al., 2017a).

Tabela 1 Lista de anticorpos usados.

Anticorpo	Primário			Secundário		
	Fonte	Diluição	Fabricante e código	Kit de detecção	Fabricante e código	Cromógeno
5-HT	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich S5545	Super Picture™ Polymer Broad Spectrum HRP	Life technologies™ 87-8963	DAB

5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina; HRP, Peroxidase de rábano; DAB, 3,3 diaminobenzidina.

4.2.8 Análise quantitativa dos linfócitos intra-epiteliais e células caliciformes

Foram contadas 2560 células consecutivas do epitélio do cólon, de cada rato, em lâminas coradas em HE. Os linfócitos presentes entre as células epiteliais foram considerados linfócitos intra-epiteliais (LIEs). Desta forma, foi calculada a proporção de LIEs/100 células epiteliais (SANT'ANA et al., 2012a). Os resultados foram expressos pela mediana e desvio-interquartílico.

Para quantificar as células caliciformes, foram contadas 2560 células consecutivas do epitélio do cólon, de cada rato, em lâminas coradas em PAS, AB pH 2,5 e AB pH 1,0. A quantidade de células caliciformes presentes no intervalo permitiu determinar a proporção por 100 células epiteliais (SANT'ANA et al., 2012a). Os resultados foram expressos pela mediana e desvio-interquartílico.

4.2.9 Análise quantitativa de colágeno I e III

Cortes corados em picrossirius realizou-se a quantificação de fibras de colágeno do tipo I e III. As imagens foram capturadas com a objetiva de 40x em microscópio óptico com filtro polarizador. Foram feitas 32 imagens por rato. A quantificação foi realizada por meio do software *Image Pro Plus* 3.0.1 e os resultados foram expressos pelo percentual de colágeno tipo I e III por μm^2 (SCHNEIDER et al., 2018).

4.2.10 Análise histopatológica da parede do cólon

A análise histopatológica foi realizada com auxílio de microscópio fotônico por meio de lentes objetivas de 10, 20, 40 ou 100x em 10 campos microscópicos, de cada rato, em cortes corados em HE. Os cortes foram pontuados (às cegas) avaliando-se alterações na histoarquitetura da mucosa colônica, presença de erosões epiteliais e de infiltrado inflamatório. Os resultados foram expressos como medianas e desvio-interquartílico dos escores. A análise semiquantitativa (escores) dos achados histopatológicos foi realizada de acordo com os critérios descritos (CASAGRANDE et al., 2022; ERBEN et al., 2014).

4.2.11 Análise Estatística

Os testes foram definidos de acordo com a distribuição de dados por meio do teste de D'Agostino-Pearson. A comparação dos resultados foi realizada por meio de ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguida pelo pós-teste Dunn's. Os resultados foram apresentados pela mediana e desvio-interquartílico. Todos os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.). O nível de significância adotado foi de 5%.

4.3 Resultados

A infecção toxoplásmica, bem como a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações histomorfométricas nos estratos que compõem a parede do cólon de ratos. Houve aumento na espessura da túnica muscular dos ratos do GC+EP comparado ao GC ($p<0,05$). Em contraste, a espessura da túnica muscular diminuiu no cólon dos ratos GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,001$). Não houve alteração na espessura da túnica muscular dos ratos do GI comparado ao GC e do GI+EP comparado ao GI ($p>0,05$; Tabela 2).

Houve aumento na espessura da tela submucosa do cólon dos ratos do GI e do GC+EP comparados ao GC ($p<0,001$). Por outro lado, houve diminuição no GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,001$). Não houve alteração na espessura da tela submucosa dos ratos do GI+EP comparado ao GI ($p>0,05$; Tabela 2).

Em relação à largura das criptas intestinais, observamos o aumento no GI comparado ao GC e no GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,001$). Não houve alteração na largura das criptas nos ratos do GC+EP comparado ao GC e GI+EP comparado ao GI ($p>0,05$). Em adição, a profundidade das criptas intestinais aumentou nos ratos do GI e do GC+EP comparados ao GC, bem como no GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,05$). Além disso, houve aumento na profundidade das criptas nos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,001$). Em contraste, houve diminuição na profundidade das criptas nos ratos do GI+EP comparado ao GI ($p<0,001$; Tabela 2).

Em relação à mucosa colônica, houve aumento em sua espessura nos ratos do GI e do GC+EP comparados ao GC ($p<0,001$). Não houve alteração na mucosa dos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ou GI+EP comparado ao GI ($p>0,05$; Tabela 2).

Houve aumento na altura dos enterócitos no GC+EP comparado ao GC e no GI+EP comparado ao GI ($p<0,05$). Em contraste, houve diminuição na altura dos enterócitos no GI+EP comparado ao GC+EP ($p<0,001$). Não houve alteração na altura dos enterócitos dos ratos do GI comparado ao GC ($p>0,05$). A largura dos enterócitos não foi alterada pela infecção ou pela imunoestimulação (Tabela 2).

Tabela 2. Histomorfometria dos estratos que compõem a parede do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP).

Parâmetros (μm)	Grupos			
	GC	GI	GC+EP	GI+EP
Túnica muscular (espessura)	154,8 (142,9; 168,9)	147,1 (125,8; 186,2)	165,9 (141,8; 186,8) <i>a</i>	147,4 (123,6; 163,5) <i>c</i>
Submucosa (espessura)	23,4 (17,2; 28,68)	35,3 (26,1; 46,9) <i>a</i>	44,4 (33,4; 54,4) <i>a</i>	35,3 (26,3; 46,6) <i>c</i>
Largura das criptas	25,9 (8,7; 31,4)	30,1 (25,4; 34,5) <i>a</i>	26,7 (22,7; 30,9)	30,4 (25,9; 35,8) <i>c</i>
Profundidade das criptas	77,5 (23,4; 117,4)	130,2 (91,3; 203,8) <i>a</i>	85,6 (61,3; 123,7) <i>a</i>	104,5 (77,1; 149,7) <i>b, c</i>
Mucosa (espessura)	236,3 (186,1; 306,4)	297,2 (241,1; 340,8) <i>a</i>	267,1 (226,5; 309,8) <i>a</i>	274,3 (238,6; 325,1)
Enterócitos (altura)	21,5 (16,9; 26,1)	19,1 (14,6; 25,3)	26,8 (17,4; 31,5) <i>a</i>	22,3 (19,7; 26,9) <i>b, c</i>
Enterócitos (largura)	8,2 (6,5; 9,1)	7,9 (5,8; 9,4)	7,8 (6,6; 9,7)	8,1 (7,1; 9,3)

Medianas e percentis (P25; P75) seguidas pelas letras *a*, *b* ou *c* indicam diferença significativa comparada ao GC, GI ou GC+EP, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test.

A infecção crônica e a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações na distribuição de mastócitos totais e mastócitos que expressam 5-HT (serotonina) na lâmina própria e em células enterocromafins que expressam 5-HT e linfócitos intra-epiteliais (LIEs) no epitélio da mucosa do cólon dos ratos (Figura 7).

Houve aumento no número de mastócitos totais nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC ($p < 0,001$) e no GI+EP comparado ao GC+EP ($p < 0,05$). Não houve alteração na distribuição dos mastócitos totais no GI+EP comparado ao GI ($p > 0,05$; Fig. 7 A).

Considerando os mastócitos que expressam 5-HT, houve aumento nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GI ($p < 0,001$). Não houve alteração na distribuição dos mastócitos 5-HT no GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 7 B).

Em relação às células enterocromafins que expressam 5-HT, houve aumento nos ratos do GI ($p < 0,05$) e GC+EP ($p < 0,001$) comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GI ($p < 0,01$). Não houve alteração na distribuição destas células no epitélio da mucosa colônica nos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 7 C).

Além disso, a proporção de LIEs por 100 células epiteliais da mucosa colônica aumentou nos ratos do GI comparado ao GC ($p < 0,001$) e diminuiu no GI+EP comparado ao GI ($p < 0,001$). Não houve alteração na distribuição LIEs no epitélio da mucosa colônica nos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 7 D).

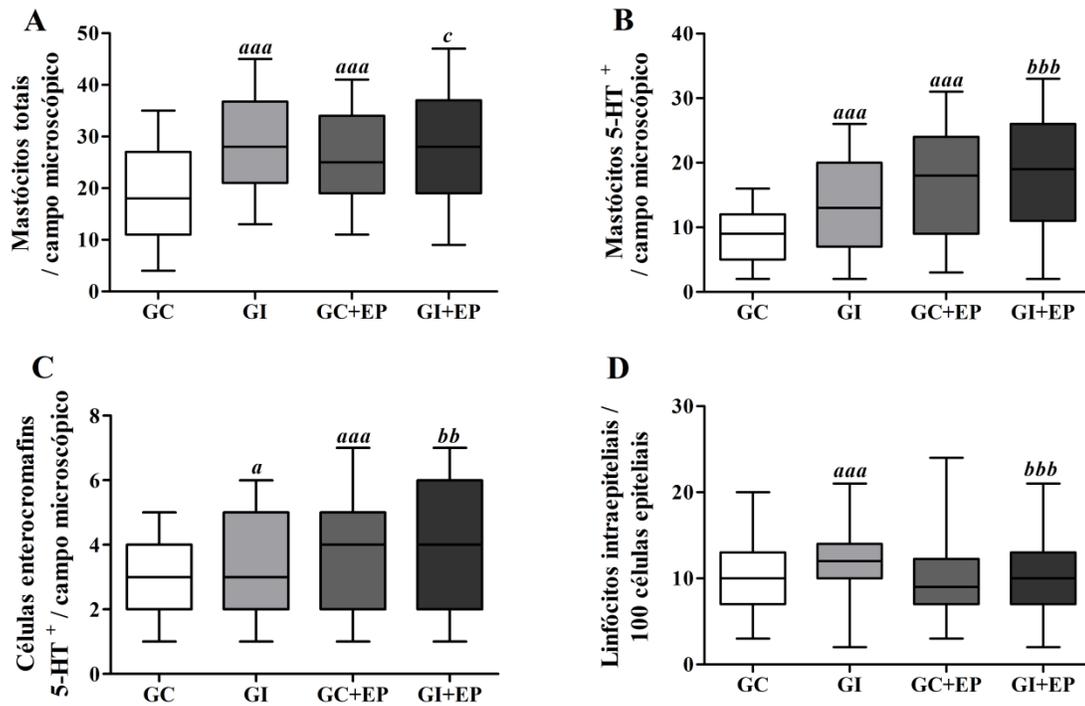


Figura 7. Mediana e desvio-interquartílico da distribuição dos mastócitos totais (A) e mastócitos que expressam 5-HT (B) presentes na lâmina própria, células enterocromafins que expressam 5-HT (C) e linfócitos intra-epiteliais (D) presentes no epitélio da mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Valores seguidos pelas letras *a*, *b* ou *c* indicam diferença significativa comparada ao GC, GI ou GC+EP, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test. Uma letra ($p < 0.05$), duas letras ($p < 0.01$) e três letras ($p < 0.001$).

Tanto a infecção crônica quanto a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações na produção e liberação de mucinas pelas células caliciformes presentes no epitélio da mucosa do cólon dos ratos (Figura 8).

Em relação às células caliciformes que produzem e liberam mucinas neutras e sialomucinas lábeis (PAS+) ou sialomucinas e sulfomucinas (Alcian-Blue - AB pH 2,5+) houve aumento nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GI ($p < 0,001$). Não houve alteração na distribuição destas células no epitélio da mucosa colônica nos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 8 A e B).

Já as células caliciformes que produzem e liberam sulfomucinas (AB pH 1,0+) houve aumento nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC ($p < 0,001$). Não houve alteração na distribuição destas células no epitélio da mucosa colônica nos ratos do GI+EP comparado ao GI e no GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 8 C).

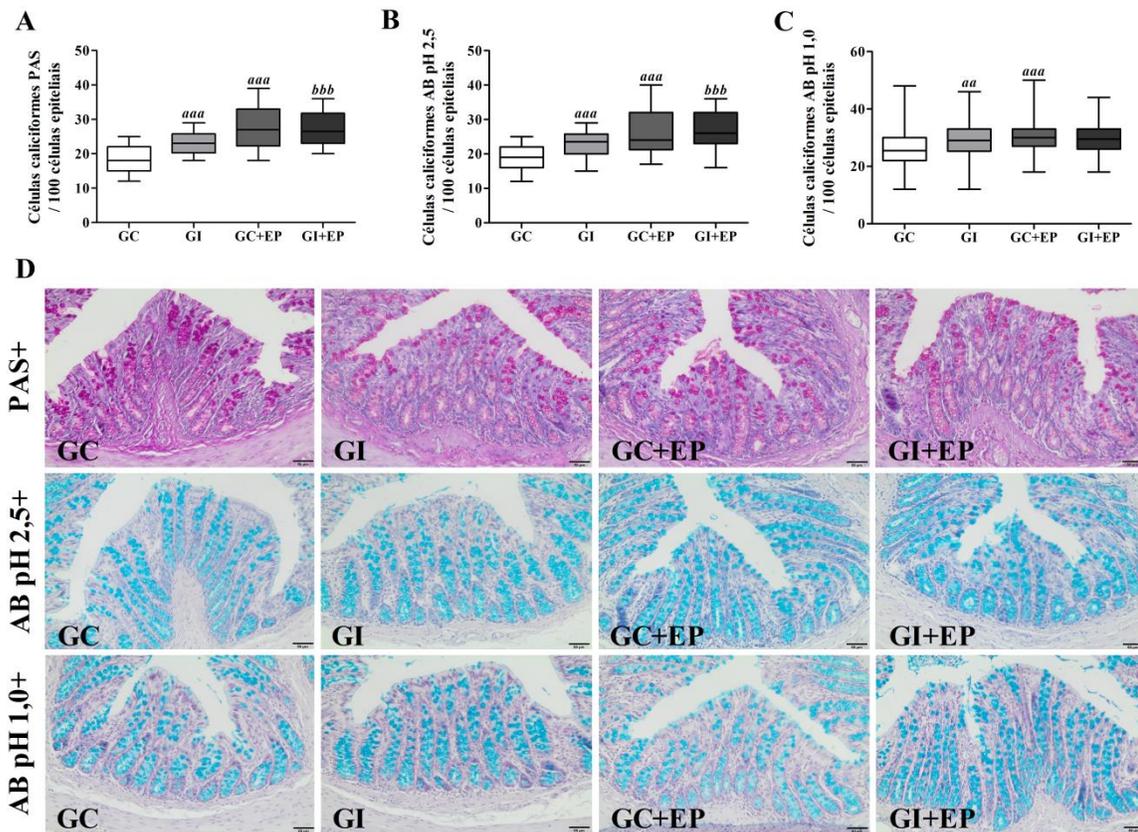


Figura 8. Mediana e desvio-interquartil do número de células caliciformes PAS+ (A), AB pH 2,5+ (B) e AB pH 1,0+ (C) presentes na mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Valores seguidos pelas letras *a*, *b* ou *c* indicam diferença significativa comparada ao GC, GI ou GC+EP, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test. Uma letra ($p < 0.05$), duas letras ($p < 0.01$) e três letras ($p < 0.001$). (D) Fotomicrografias representativas mostram células caliciformes (púrpura) coradas pela técnica histoquímica para PAS (Periodic Acid-Schiff) ou Alcian-Blue (AB pH 2,5 e 1,0) marcadas em azul. Objetiva de 20x; barra de escala 50 μ m.

A infecção crônica e a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações na matriz extracelular na parede do colón de ratos (Figura 9).

Houve diminuição no percentual ($\%/ \mu\text{m}^2$) de fibras de colágeno do tipo I na mucosa dos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC ($p < 0,001$). Em contraste, houve aumento no percentual de fibras de colágeno do tipo I na mucosa dos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP ($p < 0,01$). Não houve alteração na deposição de fibras de colágeno do tipo I no GI+EP comparado ao GI ($p > 0,05$; Fig. 9 A).

Além disso, não houve alterações na deposição de fibras de colágeno do tipo III ($p > 0,05$; Fig. 9 B).

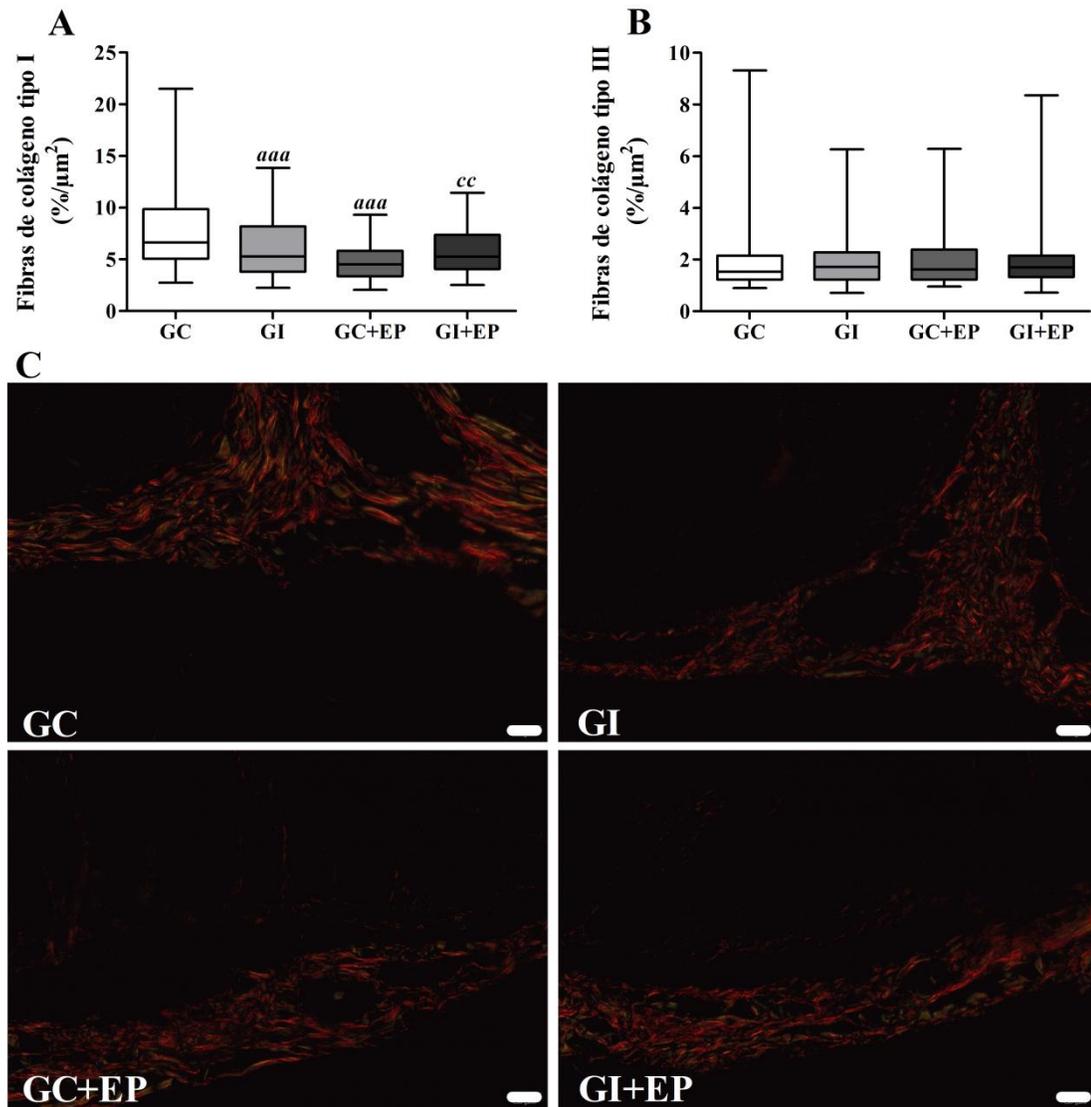


Figura 9. Mediana e desvio-interquartílico do percentual de fibras de colágeno dos tipos I (A) e III (B), por área analisada (%/μm²), na parede do colón de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Valores seguidos pelas letras *a*, *b* ou *c* indicam diferença significativa comparada ao GC, GI ou GC+EP, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test. Uma letra ($p < 0.05$), duas letras ($p < 0.01$) e três letras ($p < 0.001$). (C) Fotomicrografias representativas mostram a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde) marcadas pela técnica histoquímica de Picro-Sirius Red. Lente objetiva de 40x; barra de 20 μm.

Tanto a infecção crônica quanto a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* influenciaram histoarquitetura da mucosa do cólon dos ratos (Figura 10).

A análise histopatológica demonstrou aumento dos danos à parede do cólon dos ratos do GI comparado ao GC ($p < 0,001$). Em contraste, houve diminuição nos achados histopatológicos causados pela infecção crônica nos ratos do GI+EP comparado ao GI ($p < 0,001$). Não houve alteração histopatológica na parede colônica nos ratos do GC+EP comparado ao GC e do GI+EP comparado ao GC+EP ($p > 0,05$; Fig. 10 A).

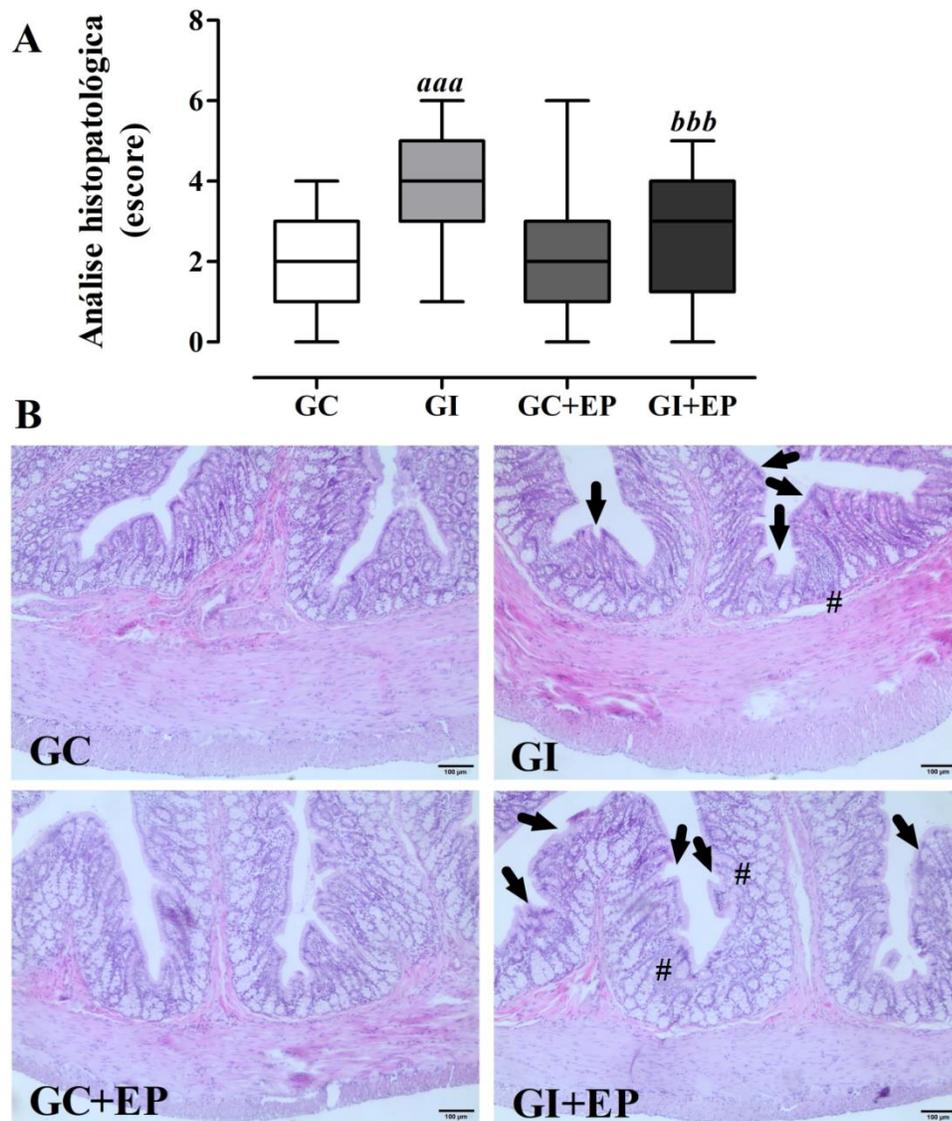


Figura 10. Mediana e desvio-interquartilico da quantificação (escore) dos achados histopatológicos (A) na mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP) e infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP). Valores seguidos pelas letras *a*, *b* ou *c* indicam diferença significativa comparada ao GC, GI ou GC+EP, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test. Uma letra ($p < 0.05$), duas letras ($p < 0.01$) e três letras ($p < 0.001$). (B) Fotomicrografias representativas mostram achados histopatológicos como a perda da histoarquitetura da mucosa colônica e erosões epiteliais (setas pretas) e a presença de infiltrado inflamatório difuso (#). Coloração em HE; lente objetiva de 10x; barra de 100 μ m.

4.4 Discussão

Toxoplasmose é uma das infecções mais prevalentes no mundo e acometem cerca de 80% da população mundial. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção cursa de forma assintomática. Porém, em imunocomprometidos, a toxoplasmose pode gerar graves consequências, incluindo a morte. Atualmente o tratamento consiste apenas no uso da sulfadiazina e pirimetamina, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas efetivas frente à infecção. Nesta perspectiva, o presente trabalho, em linhas gerais teve como principal objetivo avaliar os efeitos do tratamento *E. purpurea* sobre a parede do cólon de ratos inoculados com oocistos esporulados de *T. gondii*. Abaixo, discorreremos sobre os principais achados.

A infecção foi confirmada por meio de exames de imunofluorescência indireta, o qual determinou a presença de IgG no soro dos ratos do GI e GI+EP. Os ratos GC e GC+EP permaneceram susceptíveis ao longo do experimento. No presente estudo, observamos que, exceto para a largura dos enterócitos, tanto a infecção toxoplásmica quanto a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações histomorfométricas nos estratos que compõem a parede do cólon de ratos.

A imunoestimulação com o extrato aquoso a base de *E. purpurea* (100 mg/kg) resultou em hipertrofia da camada muscular dos ratos do GC+EP; mas não protegeu da atrofia observada no GI+EP em comparação com o GI+EP, mesmo tendo sido este grupo recebido a imunoestimulação antes e depois da inoculação. Considerando que a túnica muscular do GI não foi alterada e a que houve hipertrofia no GC+EP, o efeito observado no GI+EP sugere uma interação entre a resposta imune deflagrada pelo parasito e a imunoestimulação pela *E. purpurea*. Essa dinâmica foi observada nos demais estratos que compõem a parede do cólon.

A hipertrofia observada na tela submucosa dos ratos do GI e do GC+EP resultou, possivelmente, da inflamação induzida pelo parasito e pela imunoestimulação com *E. purpurea*, respectivamente. Embora a imunoestimulação com *E. purpurea* tenha causado hipertrofia na submucosa dos ratos do GC+EP, a infecção impediu que o mesmo acontecesse com os ratos do GI+EP. A administração de *E. purpurea* objetiva estimular o sistema imune e prepará-lo para uma resposta eficiente após a infecção (PARK et al., 2017; PARK et al., 2021). No entanto, *T.*

gondii utiliza de mecanismos próprios para subverter a resposta imune do hospedeiro (BUZONI-GATEL et al., 2006b; LAMBERT; BARRAGAN, 2010). Assim, questionamos quais mecanismos de modulação da resposta imune estão envolvidos na inflamação causada por *T. gondii* em rato imunoestimulado com *E. purpurea*.

Em relação às criptas intestinais, observamos que ambas a infecção e a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram aumento tanto no maior (profundidade) quanto no menor eixo (largura) da cripta. Fato que sugere que a área da cripta aumentou. As criptas tornaram-se mais largas no GI e GI+EP comparados ao GC e GC+EP, respectivamente, e mais profundas no GI, GC+EP comparadas ao GC e no GI+EP comparado ao GC+EP. No entanto, a profundidade reduziu no GI+EP comparado ao GI. Alterações histomorfométricas envolvendo as criptas intestinais foram observadas em outros modelos experimentais de toxoplasmose (CASAGRANDE et al., 2022; GOIS et al., 2016; TREVIZAN et al., 2016; VICENTINO-VIEIRA et al., 2017a). As criptas intestinais (criptas de Lieberkühn) são glândulas tubulares simples encontradas na mucosa colônica (MILLS et al., 2001; VOLSKI; MELLO; NATALI, 1999). Elas secretam diversas enzimas e possuem células especializadas na produção de hormônios citocinas e peptídeos antimicrobianos (CLEVERS; BEVINS, 2013; SALZMAN; BEVINS, 2013).

As criptas respondem pela proliferação celular do epitélio intestinal graças à atividade mitótica. A maior profundidade da cripta reflete a maior atividade proliferativa, visando garantir adequada taxa de renovação epitelial (MILLS et al., 2001; PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Contudo, a imunoestimulação com *E. purpurea* no GI+EP comparado ao GC+EP impediu que a infecção causasse hiperplasia semelhante àquela observada no GI. Assim, não é possível afirmar se nossos resultados sugerem que houve menor proliferação ou inflamação no local. A marcação com PCNA (proliferating cell nuclear antigen) poderia indicar se houve aumento de proliferação celular.

A túnica mucosa dos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC estava hipertrofiada no momento da eutanásia. Embora menos intensa, a hipertrofia observada no GC+EP sugere que a imunoestimulação com *E. purpurea* mediou o recrutamento de células para a lâmina própria. Estudos sugerem que a *E. purpurea* ativa a produção de mediadores da resposta imune incluindo IL-1, TNF- α e IL-10 (PARK et al., 2017) (BARRETT, 2003; SENCHINA et al., 2010). Estudos

recentes avaliaram os efeitos imunomoduladores do extrato de *E. purpurea* em camundongos relataram o aumento da proliferação de células B, aumento dos níveis de MHC II, células TCD4+, Células T e células NK (PARK et al., 2021). Todavia, em infecções causadas pelo *T. gondii* a túnica mucosa sofre severas alterações (GOIS et al., 2016).

Uma vez ingerido, o parasito invade a mucosa intestinal e dissemina-se via sangue e linfa (BARRAGAN; DAVID SIBLEY, 2003; BARRAGAN; HITZIGER, 2008; COURRET et al., 2006). O reconhecimento do parasito (KIVIT et al., 2014) deflagra uma intensa resposta pró-inflamatória (BUZONI-GATEL et al., 2006b; RAETZ et al., 2013; SUZUKI et al., 1988) que pode levar a significativa imunopatologia na mucosa (GAZZINELLI et al., 1996; HEIMESAAT et al., 2006; LIESENFELD, 2002). Desta forma, os danos à mucosa precisam ser reparados. O aumento na proliferação celular em criptas intestinais pode garantir o *turnover* celular necessário para compensar as perdas celulares no epitélio da mucosa (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997; SANT'ANA et al., 2012b). Assim, nossos resultados sugerem que a imunoestimulação com *E. purpurea* tornou os enterócitos do GC+EP e GI+EP mais altos e mais estreitos, aumentando, portanto, a distância entre lúmen e lâmina própria. O aumento na altura dos enterócitos no GI+EP ressalta o efeito da imunoestimulação (antes e depois da inoculação) sobre a infecção toxoplásmica. Estudos mostraram que enterócitos sofrem redução na altura na fase aguda (TREVIZAN et al., 2016) e aumento na fase crônica da infecção (VICENTINO-VIEIRA et al., 2017b), uma vez que os enterócitos são ativados e respondem à infecção toxoplásmica (BUZONI-GATEL et al., 2006a).

As alterações histomorfométricas discutidas aqui são, por vezes, difíceis de compreender. Parte disso pela escassez de trabalhos que avaliaram a imunoestimulação em ratos inoculados com *T. gondii*, outra parte pela dúvida interpretação de até onde a hipertrofia na tela submucosa, por exemplo, é benéfica ou não. Sabe-se que o tipo de células recrutadas pela imunoestimulação com *E. purpurea* têm perfil anti-inflamatório (BARRETT, 2003; BURLOU-NAGY et al., 2022a; SENCHINA et al., 2010; VIMALANATHAN et al., 2022) diferente da resposta ao *T. gondii* que é pró-inflamatória (BUZONI-GATEL et al., 2006b; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; YAROVINSKY, 2014). Assim, como ambos têm grande capacidade de recrutar células para o sítio da infecção, marcadores específicos para linfócitos T ajudariam compreender os resultados obtidos. Não dispomos de marcadores para linfócitos, mas os quantificamos em HE,

quantificamos três fenótipos de células caliciformes, marcamos os mastócitos e as células enterocromafins que expressam 5-HT e realizamos a análise histopatológica e da matriz extracelular para melhor entender os efeitos da imunoestimulação com *E. purpurea*.

A análise histopatológica corroborou as alterações observadas na parede colônica. Achados histopatológicos incluindo perda da histoarquitetura da mucosa, erosões na superfície do epitélio e infiltrado inflamatório difuso foram observados no GI. No entanto, a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* administrada 28 dias antes da inoculação e por mais 28 após a inoculação protegeu a parede colônica dos ratos do GI+EP comparado ao GI. Alterações histopatológicas observadas na parede do cólon são consistentes com uma forte resposta imune caracterizada por imunopatologia do tipo Th1 (HEIMESAAT et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2017). Neste contexto, demonstramos que proporção de LIEs/100 células epiteliais também sofreu aumento nos ratos do GI comparado ao GC e diminuíram no GI+EP comparado ao GI. Portanto, além de ser um resultado inédito, a proteção exercida pela imunoestimulação com *E. purpurea* carece ter o mecanismo esclarecido. Casagrande et al. (2022) relataram a perda de células caliciformes, erosões na superfície epitelial, distorção e hiperplasia nas criptas intestinais e perda da histoarquitetura da mucosa em modelo de infecção aguda causada por *T. gondii* (CASAGRANDE et al., 2022).

Apesar de intensas, as alterações histopatológicas não afetaram a distribuição de células caliciformes. Embora a infecção toxoplásmica tenha causado aumento no percentual de células caliciformes PAS+, AB pH 2,5+ e AB pH 1,0+, a imunoestimulação com *E. purpurea* também favoreceu sua proporção por 100 células epiteliais na comparação com o GC. O efeito da imunoestimulação em ratos do GI+EP comparado ao GI também foi observado. As células caliciformes são as responsáveis pela produção e liberação de mucinas, que em contato com a água no lúmen formam o muco que lubrifica e protege o epitélio intestinal contra patógenos. Estas células e a composição das mucinas secretadas sofrem alterações em resposta a infecção por microrganismos e parasitos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; JOHANSSON; HANSSON, 2016a; KIM; HO, 2010b; KNOOP; NEWBERRY, 2018), como a hiperplasia em resposta a infecção por helmintos (ONAH; NAWA, 2000) e a hipersecreção induzida por infecção toxoplásmica (CASAGRANDE et al., 2022; SANT'ANA et al., 2012b; SCHNEIDER et al., 2018; TREVIZAN et al., 2016).

A infecção crônica e a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram aumento na distribuição de mastócitos totais e mastócitos que expressam 5-HT na lâmina própria e em células enterocromafins que expressam 5-HT e linfócitos intra-epiteliais (LIEs) no epitélio da mucosa do cólon dos ratos. Os mastócitos totais aumentaram nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GC+EP. Já os mastócitos que expressam 5-HT aumentaram nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GI. Mastócitos são capazes de contribuir na regulação da imunidade da mucosa (ALBERT-BAYO et al., 2019; CONTI et al., 1998). Uma vez ativados, produzem IL-4 e IL-10 e TGF- β (CONTI et al., 2018) e 5-HT (CASAGRANDE et al., 2022; CONTI et al., 2018; PASTRE et al., 2021). Nós também demonstramos que houve aumento em células enterocromafins que expressam 5-HT nos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC e no GI+EP comparado ao GI. Outros autores corroboram nossos achados (CASAGRANDE et al., 2022; PASTRE et al., 2019b, 2021). Pastre et al. (2019) e (2021) e Casagrande et al. (2022) demonstraram o aumento de mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT e seu papel na regulação da resposta imune em ratos machos (PASTRE et al., 2019; 2021) e camundongos fêmeas infectados o *T. gondii* (CASAGRANDE et al., 2022). Em adição, nossos resultados concernentes ao aumento de mastócitos totais e serotoninérgicos (5-HT+) sugerem que houve mastocitose. A mastocitose resulta do intenso recrutamento e ativação de mastócitos para o sítio da infecção (BISCHOFF; KRÄMER, 2007; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014). A mastocitose foi demonstrada, em ratos infectados por *T. gondii*, em associação com o aumento da expressão de 5-HT (PASTRE et al., 2019).

Mediadores químicos produzidos por mastócitos podem afetar o tecido conjuntivo. A histamina estimula o crescimento de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno (DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014) e pode influenciar a cicatrização (CLAMAN, 1993; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014). Os mastócitos também podem contribuir diretamente para a formação de fibroses, por meio de sua habilidade para produzir glicoproteínas da matriz extracelular (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; BISCHOFF; KRÄMER, 2007; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014). No presente estudo, demonstramos que o percentual de fibras de colágeno do tipo I diminuiu na mucosa dos ratos do GI e GC+EP comparados ao GC. Em contraste, houve aumento no percentual de fibras de colágeno do tipo I na mucosa dos ratos do GI+EP comparado ao GC+EP, sugerindo que tanto a infecção crônica quanto a imunoestimulação *E. purpurea*

causaram alterações na matriz extracelular. Acreditamos que o processo inflamatório durante a infecção crônica por *T. gondii* pode ter levado a degradação de fibras colágenas.

4.5 Referências

- ALBERT-BAYO, M. et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 135, fev. 2019.
- ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, v. 135, n. October 2020, p. 371–385, mar. 2021.
- BARRAGAN, A.; DAVID SIBLEY, L. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003
- BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 198–207, 2008.
- BARRETT, B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 66–86, jan. 2003.
- BISCHOFF, S. C.; KRÄMER, S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. **Immunological Reviews**, v. 217, n. 1, p. 329–337, jun. 2007.
- BORCHERS, A. T. et al. Inflammation and Native American medicine : the role of. **Review Article**, v. 2, n. March, p. 339–47, 2000.
- BURLOU-NAGY, C. et al. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, maio 2022.
- BUZONI-GATEL, D. et al. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448–52, out. 2006.
- CASAGRANDE, L. et al. Moderate intestinal immunopathology after acute oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts is associated with expressive levels of serotonin. **Life Sciences**, v. 309, p. 120985, 15 nov. 2022.
- CHOI, W.; JIANG, M.; CHU, J. Antiparasitic effects of *Zingiber officinale* (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. p. 15–26, 2013.
- CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 289–311, fev. 2013.
- CONTI, P. et al. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: Inhibitory effect of IL-37. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 294–299, jan. 2018.
- CONTI, P. et al. Intramuscular injection of hrRANTES causes mast cell recruitment and increased transcription of histidine decarboxylase in mice: lack of effects in genetically mast cell-deficient W/WV mice. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 15, p. 1693–700, dez. 1998.
- CORDEIRO, G. S. et al. Perinatal and post-weaning exposure to a high-fat diet causes histomorphometric, neuroplastic, and histopathological changes in the rat ileum. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, p. 1–11, 2022.

- COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309–16, 1 jan. 2006.
- DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. **Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell**. [s.l: s.n.]. v. 62
- DAPAS, B. et al. Immunomodulation mediated by a herbal syrup containing a subjects on cytokine gene expression. **European Journal of Integrative Medicine**, 2014.
- DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1131S–1141S, jun. 2001.
- DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. **Immune response and immunopathology during toxoplasmosis**. **Seminars in Immunopathology**, 2012.
- ERBEN, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 4557–4576, 15 jul. 2014.
- GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3999–4005, 2016.
- GAZZINELLI, R. T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 2, p. 798–805, 15 jul. 1996.
- GOIS, 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.
- HEIMESAAT, M. M. et al. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 12, p. 8785–8795, 15 dez. 2006.
- HUDSON, J.; VIMALANATHAN, S. *Echinacea*—A Source of Potent Antivirals for Respiratory Virus Infections. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 7, p. 1019–1031, 13 jul. 2011.
- JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. **Immunological aspects of intestinal mucus and mucins** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , out. 2016.
- JUNIOR, A. G. et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, n. L, 2016.
- KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.
- KIVIT, S. DE et al. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 60, 2014.
- KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells : multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology**, n. April, p. 1–7, 2018.
- KUMAR, K. M.; RAMAIAH, S. PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ECHINACEA

- PURPUREA. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. 304–314, 2011.
- LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 292–300, 1 mar. 2010.
- LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of infectious diseases**, n. Supplement 1, p. S96-101, 15 fev. 2002.
- LUPING, Q. et al. Patterns of Variation in Alkamides and Cichoric Acid in Roots and Aboveground Parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **NIH Public Access**, v. 40, n. 5, p. 1239–1242, 2005.
- MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D. Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 9, p. 614–624, 2016.
- MCKEOWN, K. A. A Review of the Taxonomy of the Genus *Echinacea*. **ASHS Press**, n. McGregor 1968, p. 482–498, 1999
- MILLS, S. J. et al. Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis. **Gut**, v. 48, n. 1, p. 41–46, 2001.
- NASCIMENTO, B. B. et al. Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice. **International journal of experimental pathology**, v. 98, n. 4, p. 191–202, ago. 2017.
- ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean journal of parasitology**, v. 38, n. 4, p. 209–236, dez. 2000.
- ONISZCZUK, T. et al. Active polyphenolic compounds , nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L .) Moench). **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, p. 24–30, 2019.
- PARK, S. et al. *Echinacea purpurea* Protects Against Restraint Stress-Induced Immunosuppression in BALB/c Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 3, p. 261–268, 7 dez. 2017.
- PARK, S.-J. et al. *Echinacea purpurea* Extract Enhances Natural Killer Cell Activity In Vivo by Upregulating MHC II and Th1-type CD4+ T Cell Responses. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, n. 10, p. 1039–1049, 1 out. 2021.
- PARNHAM, M. J. Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 95–102, 1996.
- PASTRE, M. J. et al. Acute infection with *Toxoplasma gondii* oocysts preferentially activates non-neuronal cells expressing serotonin in the jejunum of rats. **Life Sciences**, v. 283, n. 15, p. 119872, 2021.
- PASTRE, M. J. et al. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 114, 2019a.
- PELLATI, F. et al. Variability in the Composition of Anti-oxidant Compounds in *Echinacea* Species by HPLC. **Wiley InterScience**, v. 85, n. March 2004, p. 77–85, 2005.

- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1, p. 215–236, 1997.
- 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.
- RAETZ, M. et al. Parasite-induced Th1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature immunology**, v. 14, n. 2, p. 136–142, fev. 2013.
- SALZMAN, N. H.; BEVINS, C. L. Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction. **Seminars in immunology**, v. 25, n. 5, p. 334–341, nov. 2013.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 279–286, ago. 2012.
- SCHNEIDER, L. C. L. et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. **Neurogastroenterology and motility**, v. 30, n. 5, p. e13264–e13264, 2018.
- SENCINA, D. S. et al. Effects of Echinacea extracts on macrophage antiviral activities. **Phytotherapy research : PTR**, v. 24, n. 6, p. 810–816, jun. 2010.
- SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4851, p. 516–518, 22 abr. 1988.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 1 nov. 2000.
- THOMPSON-SNIPES, L. et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 2, p. 507–510, 1 fev. 1991.
- TREVIZAN, A. R. et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 22–29, 1 jun. 2016.
- VICENTINO-VIEIRA, S. L. et al. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 12–18, 2015.
- VIMALANATHAN, S. et al. **Broad Antiviral Effects of Echinacea purpurea against SARS-CoV-2 Variants of Concern and Potential Mechanism of Action** *Microorganisms*, 2022.
- VOLSKI, T.; MELLO, E. V. DE S. L. E; NATALI, M. R. M. Morfologia do Epitélio Intestinal de Ratos Adultos Utilizando-se Como Meio de Inclusão o Paraplast e o Glicometacrilato. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 3, n. 2, 1999.
- YOO, B. B.; MAZMANIAN, S. K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 910–926, 2017.

5 CONCLUSÃO GERAL

A infecção toxoplásmica, bem como a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* causaram alterações histomorfométricas, aumento na distribuição de mastócitos totais e mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT e na proporção de linfócitos intra-epiteliais no cólon de ratos. Demonstramos que houve aumento em todos os fenótipos de células caliciformes avaliados no epitélio da mucosa do cólon. Em adição, demonstramos que a infecção causou alterações histopatológicas à parede do cólon as quais foram diminuídas pela imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea*.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a imunoestimulação com 100 mg/kg de *E. purpurea* melhorou a dinâmica de reestruturação tanto da constituição histomorfométrica quanto da histoarquitetura da mucosa colônica refletindo o momento imunológico vivido pelo hospedeiro. Concernente aos mastócitos totais e mastócitos e células enterocromafins que expressam 5-HT a imunoestimulação com o extrato da planta mostrou-se eficiente frente aos danos causados pela infecção do *T. gondii*, sugerindo que pode ser utilizado futuramente como coadjuvante ao tratamento convencional; porém serão necessárias mais pesquisas para isto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABNER, W.; DAVID, C.; BERYL, P. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. **Science**, v. 89, n. 2306, p. 226–227, 10 mar. 1939.

ABREU-VELEZ, A. M.; HOWARD, M. S. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 1, p. 1–8, jan. 2012.

AJIOKA, J. W.; MORRISSETTE, N. S. **A century of Toxoplasma research**. **International journal for parasitology** England, jul. 2009.

AJZENBERG, D. 1995–2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 689–691, 1 maio 2015.

AJZENBERG, D. et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185–1196, set. 2004.

AJZENBERG, D. et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684–689, 1 set. 2002.

ALBERT-BAYO, M. et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 135, fev. 2019.

ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, v. 135, n. October 2020, p. 371–385, mar. 2021.

AMATO NETO, V. Comentários sobre o comportamento da reação de Sabin-Feldman em relação ao diagnóstico e controle de cura da toxoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 1, p. 231–242, 1967.

ANDRADE, J. V. et al. Newborns at risk for congenital toxoplasmosis, review of 16 years. **Scientia Medica**, v. 28, n. 4, p. ID32169, 21 dez. 2018.

APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1187–1191, 2000.

ÅSTRAND, H. et al. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: Effect of age and sex. **Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 1, p. 176–187, 2011.

B, B. K. S. et al. Modulation of Intestinal Goblet Cell Function during Infection by an Attaching and Effacing Bacterial Pathogen. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 796–811, 1 fev. 2008.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; LIBORIO-NETO, A. O.; DUDUS, M. M. **Microcephaly due to congenital toxoplasmosis in times of Zika virus epidemic in Brazil**. **Scientia Medica** Editora Universitaria da PUCRS, , 2018.

- BALAŃ, B. J. et al. Immunotropic activity of Echinacea. Part I. History and chemical structure. **Central-European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 45–50, 2012a.
- BALČIŪNAITĖ-MURZIENĖ, G. et al. Echinacea purpurea L. (Moench) Hemagglutinin Effect on Immune Response In Vivo. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 5, p. 936, 7 maio 2021.
- BARRAGAN, A.; DAVID SIBLEY, L. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003.
- BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 198–207, 2008.
- BARRETT, B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 66–86, jan. 2003.
- BELLONO, N. W. et al. Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 185–198.e16, 2017.
- BENOIT-VICAL et al. Anti-*Toxoplasma* activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. **Parasite**, v. 7, n. 1, p. 3–7, 2000.
- BERNSTEIN, M. et al. Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 65, p. 72–79, 2018.
- BERTRAND, P. P.; BERTRAND, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Autonomic Neuroscience**, v. 153, n. 1–2, p. 47–57, fev. 2010.
- BERTRAND, P. The cornucopia of intestinal chemosensory transduction. **Frontiers in Neuroscience**, v. 3, p. 3, dez. 2009.
- BERTRANPETIT, E. et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150–155, mar. 2017.
- BISCHOFF, S. C. Mast cells in gastrointestinal disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 778, p. 139–145, 2016.
- BISCHOFF, S. C. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Seminars in immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 185–205, jul. 2009.
- BISCHOFF, S. C.; KRÄMER, S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. **Immunological Reviews**, v. 217, n. 1, p. 329–337, jun. 2007.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438–442, 2002.
- BORCHERS, A. T. et al. Inflammation and Native American medicine : the role of. **Review Article**, v. 2, n. March, p. 339–47, 2000.
- BRAGA, C. F. et al. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 340–347, abr. 2011.
- BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em

Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021. 1.126 p.

BURG, J. L. et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787–1792, ago. 1989.

BURLOU-NAGY, C. et al. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, maio 2022.

BUZONI-GATEL, D. et al. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 10, p. 5846–52, maio 1999.

BUZONI-GATEL, D. et al. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 535–544, 2006a.

BUZONI-GATEL, D. et al. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 10, p. 448–52, out. 2006.

CÂMARA, J. T.; SILVA, M. G. DA; CASTRO, A. M. DE. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 2, p. 64–70, 2015.

CAMPOS, F. A. et al. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 609–617, 2014.

CANI, P. D.; EVERARD, A.; DUPARC, T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 935–940, dez. 2013.

CASAGRANDE, L. et al. Moderate intestinal immunopathology after acute oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts is associated with expressive levels of serotonin. **Life Sciences**, v. 309, p. 120985, 15 nov. 2022.

CATANZARO, M. et al. Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 11, p. 2778, 26 out. 2018.

CHEN, Y. et al. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14338–43, out. 2002.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 7, p. 445–456, 2011.

CHOI, W.; JIANG, M.; CHU, J. Antiparasitic effects of *Zingiber officinale* (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. p. 15–26, 2013.

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 289–311, fev. 2013.

CONTI, P. et al. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: Inhibitory effect of IL-37. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 294–299, jan. 2018.

- CONTI, P. et al. Intramuscular injection of hrRANTES causes mast cell recruitment and increased transcription of histidine decarboxylase in mice: lack of effects in genetically mast cell-deficient W/WV mice. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 15, p. 1693–700, dez. 1998.
- CORDEIRO, G. S. et al. Perinatal and post-weaning exposure to a high-fat diet causes histomorphometric, neuroplastic, and histopathological changes in the rat ileum. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, p. 1–11, 2022.
- COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309–16, 1 jan. 2006.
- DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. **Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell**. [s.l: s.n.]. v. 62
- DAPAS, B. et al. Immunomodulation mediated by a herbal syrup containing a subjects on cytokine gene expression. **European Journal of Integrative Medicine**, 2014.
- DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii* , “new” genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366–371, 15 set. 2008.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma gondii* Isolates and the Biological and Epidemiological Implications. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786–794, 6 fev. 1992.
- DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. **Clinical Microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 569–588, 1998.
- DE OLIVEIRA, T. et al. *Toxoplasma gondii*: Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 233-241, 2009.
- DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1131S-1141S, jun. 2001.
- DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of clinical microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562–568, jun. 1980.
- DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375–1424, 10 set. 2012.
- DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1- 2 SPEC.ISS., p. 57–72, 2004.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 3rd. ed. Boca Raton: CCR Press, 2021.
- DUBEY, J. P. Transmission of *Toxoplasma gondii*—From land to sea, a personal perspective. In: JANOBY, J. AND ESCH, G. . (Ed.). . **A Century of Parasitology**. [s.l: s.n.]. p. 148–164.

- DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337–339, 1 jul. 1987.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats*. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–177, fev. 1972.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537–546, nov. 1976.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1 abr. 1998.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **The Journal of experimental medicine**, v. 132, n. 4, p. 636–662, out. 1970.
- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; POWELL, E. C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. **The Journal of parasitology**, v. 81, n. 1, p. 48–53, fev. 1995.
- DUMÈTRE, A. et al. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11535–11540, 9 jul. 2013.
- DUNAY, I. R. et al. **Treatment of toxoplasmosis: Historical perspective, animal models, and current clinical practice** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , out. 2018.
- DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. **Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Seminars in Immunopathology**, 2012.
- EDITORA ATHENEU FOCACCIA ROBERTO (ED.). **Tratado de Infectologia**. 5. ed. rev. e atual ed. [s.l: s.n.]. v. 2 vol
- EGAN, C. E. et al. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. **Clinical and experimental immunology**, v. 156, n. 1, p. 17–24, abr. 2009.
- ERBEN, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 4557–4576, 15 jul. 2014.
- EYLES, D. E.; COLEMAN, N. Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. **Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill.)**, v. 3, n. 5, p. 483–490, maio 1953.
- FALCIPARUM, I. N. P.; REYNOLDS, M. G.; ROOS, D. S. A Biochemical and Genetic Model for Parasite Resistance to Antifolates. **Journal of APPLIED BIOMEDICINE**, v. 273, n. 6, p. 3461–3469, 1998.
- FERGUSON, D. J. P. **Toxoplasma gondii: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* scielo , , 2009.

- FIGUEIRO-FILHO, E. et al. Toxoplasmose aguda: Estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, 1 ago. 2005.
- FLEGR, J. et al. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- FRENKEL, J. K. PATHOGENESIS, DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HUMAN TOXOPLASMOSIS. **Journal of the American Medical Association**, v. 140, n. 4, p. 369–377, 28 maio 1949.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasma in and around Us. **BioScience**, v. 23, n. 6, p. 343–352, jun. 1973.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 167, n. 3919, p. 893–896, fev. 1970.
- FRENKEL, J. K.; FRIEDLANDER, S. **Toxoplasmosis: Pathology of Neonatal Disease, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment**. [s.l.] U.S. Government Printing Office, 1951.
- FRENKEL, J. K.; HITCHINGS, G. H. Relative reversal by vitamins (rho-aminobenzoic, folic, and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on Toxoplasma, mouse and man. **Antibiotics & chemotherapy (Northfield, Ill.)**, v. 7, n. 12, p. 630–638, dez. 1957.
- FREPPPEL, W. et al. Structure, composition, and roles of the Toxoplasma gondii oocyst and sporocyst walls. **Cell surface (Amsterdam, Netherlands)**, v. 5, p. 100016, 19 dez. 2018.
- FULTON, J. D.; TURK, J. L. DIRECT AGGLUTINATION TEST FOR TOXOPLASMA GONDII. **The Lancet**, v. 274, n. 7111, p. 1068–1069, 1959.
- FURNESS, J. B. et al. The gut as a sensory organ. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 12, p. 729–740, 2013.
- FURNESS, J. B. Integrated Neural and Endocrine Control of Gastrointestinal Function BT - The Enteric Nervous System: 30 Years Later. In: BRIERLEY, S.; COSTA, M. (Eds.). . Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 159–173.
- FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 2012.
- GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 6, n. 3, p. 157–163, set. 1999.
- GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Effects of extracts from Echinacea purpurea (L) MOENCH on mice infected with different strains of Toxoplasma gondii. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3999–4005, 2016.
- GAZZINELLI, R. T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 2, p. 798–805, 15 jul. 1996.

- GAZZINELLI, R. T. et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 1, p. 286–292, jan. 1991.
- GERSHON, M. D.; TACK, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 397–414, 2007.
- GOIS, 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.
- GOLDMAN, M.; CARVER, R. K.; SULZER, A. J. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. **The Journal of parasitology**, v. 44, n. 2, p. 161–171, abr. 1958.
- GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.
- GRIGG, M. E. et al. Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633–639, 1 set. 2001.
- GUIMARÃES, F. N. Toxoplasmose humana: meningoencefalomielite toxoplasmica: ocorrência em adulto e recém nascido. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, n. 3, p. 257–320, jun. 1943.
- HALONEN, S. K. , & W. L. M. **Toxoplasmosis. Handbook of Clinical Neurology**. [s.l: s.n.].
- HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 29–40, jul. 2015.
- HAND, T. W. et al. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6101, p. 1553–1556, 21 set. 2012.
- HARITO, J. B. et al. Use of lectin-magnetic separation (LMS) for detecting *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental water samples. **Water Research**, v. 127, p. 68–76, 2017.
- HAYDAY, A. et al. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 11, p. 997–1003, 2001.
- HEIMESAAT, M. M. et al. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 12, p. 8785–8795, 15 dez. 2006.
- HELANDER, H. F.; FÄNDRIKS, L. Surface area of the digestive tract - revisited. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 49, n. 6, p. 681–689, jun. 2014.
- HELL, D. C. et al. Moench): a review of their chemistry , pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2005, n. Wichtl 2004, p. 929–954, 2005.
- HENRIKSEN, K.; KARSDAL, M. A. Chapter 1-Type I Collagen. In: KARSDAL LAMININS AND ELASTIN, M. A. B. T.-B. OF C. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2016. p. 1–11.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002.

- HOU, Z. et al. Prevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in sick pigs and stray cats in Jiangsu Province, eastern China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, p. 17–25, 2018.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–1566, dez. 1995.
- HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v. 64, n. 12, p. 5193–5198, dez. 1996.
- HOYTEMA VAN KONIJNENBURG, D. P. et al. Intestinal Epithelial and Intraepithelial T Cell Crosstalk Mediates a Dynamic Response to Infection. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 783–794.e13, nov. 2017.
- HOYTEMA VAN KONIJNENBURG, D. P.; MUCIDA, D. Intraepithelial lymphocytes. **Current Biology**, v. 27, n. 15, p. R737–R739, ago. 2017.
- HUDSON, J.; VIMALANATHAN, S. Echinacea—A Source of Potent Antivirals for Respiratory Virus Infections. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 7, p. 1019–1031, 13 jul. 2011.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766–78, nov. 2012.
- HUTCHISON, W. M. et al. Life cycle of *toxoplasma gondii*. **British medical journal**, v. 4, n. 5686, p. 806, dez. 1969.
- INNES, E. A. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 1–7, 1 fev. 2010.
- ISMAIL, A. S. et al. Intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8743–8748, maio 2011.
- JABRI, B.; ABADIE, V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 771–783, dez. 2015.
- JACOB, M. P. et al. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 4, p. 995–999, 1987.
- JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **The Journal of parasitology**, v. 46, p. 23–8, fev. 1960b.
- JOBIM, E. M.; DA SILVA, J. E. P. TOXOPLASMOSE, UMA DOENÇA CONGÊNITA. **Saúde (Santa Maria)**, v. 30, n. 1–2, p. 50–56, 1 out. 2004.
- JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. **Immunological aspects of intestinal mucus and mucins** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , out. 2016.
- JUNIOR, A. G. et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, n. L, 2016.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Basica, Texto E Atlas**. [s.l: s.n.].

- KANNEN, V. et al. Mast Cells and Serotonin Synthesis Modulate Chagas Disease in the Colon: Clinical and Experimental Evidence. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 1–12, mar. 2018.
- KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980–2992, 1 maio 2005.
- KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.
- KIVIT, S. DE et al. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 60, 2014.
- KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells : multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology**, n. April, p. 1–7, 2018.
- KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. R770–R771, 23 jul. 2018.
- KUIVANIEMI, H.; TROMP, G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. **Gene**, v. 707, p. 151–171, 2019.
- KUMAR, K. M.; RAMAIAH, S. PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ECHINACEA PURPUREA. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. 304–314, 2011.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., MITCHELL, R. N. **Robbins - patologia básica**. 8th ed. Rio de Janeiro.: Elsevier, 2008.
- KUSINDARTA, D. L.; WIHADMADYATAMI, H. The Role of Extracellular Matrix in Tissue Regeneration. In: KAOUD, H. A. HAY E.-S. (Ed.). . Rijeka: IntechOpen, 2018. p. Ch. 5.
- LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 292–300, 1 mar. 2010.
- LATORRE, R. et al. **Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication****Neurogastroenterology and Motility**Blackwell Publishing Ltd, , maio 2016.
- LEE, C. W.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y. Screening for *Toxoplasma gondii*-regulated transcriptional responses in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1916–1923, mar. 2006.
- LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. Boca RatonCRC Press, , 1988. Disponível em: <<http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5228277>>
- LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of infectious diseases**, n. Supplement 1, p. S96-101, 15 fev. 2002.
- LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of infectious diseases**, n. Supplement 1, p. S96-101, 15 fev. 2002.
- LIN, J. et al. Mechanical Roles in Formation of Oriented Collagen Fibers. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 26, n. 2, p. 116–128, abr. 2020.

- LINAN-RICO, A. et al. Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. December, p. 1–19, 2016.
- LIU, N. et al. The Mechanism of Secretion and Metabolism of Gut-Derived 5-Hydroxytryptamine. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 7931, 25 jul. 2021.
- LIU, X. et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1852–1856, 4 mar. 1997.
- LUPING, Q. et al. Patterns of Variation in Alkamides and Cichoric Acid in Roots and Aboveground Parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **NIH Public Access**, v. 40, n. 5, p. 1239–1242, 2005.
- MAI, K. et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 281–289, 2009.
- MALUF, L. C.; BARROS, J. A. DE; MACHADO FILHO, C. D. DOS S. Mastocitose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 213–225, jul. 2009.
- MARGOLIS, K. G. et al. Pharmacological reduction of mucosal but not neuronal serotonin opposes inflammation in mouse intestine. **Gut**, v. 63, n. 6, p. 928, 1 jun. 2014.
- MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D. Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 9, p. 614–624, 2016.
- MARGOLIS, K. G.; POTHOUKAKIS, C. Serotonin Has a Critical Role in the Pathogenesis of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1562–1566, 2009.
- MARTIN, B. et al. Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 321–330, ago. 2009.
- MAYASSI, T.; JABRI, B. Human intraepithelial lymphocytes. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 5, p. 1281–1289, 2018.
- MCDOLE, J. R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 345–349, 2012.
- MCDONALD, V. Gut Intraepithelial Lymphocytes and Immunity to Coccidia. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 15, p. 483–487, 1 jan. 2000.
- MCKEOWN, K. A. A Review of the Taxonomy of the Genus *Echinacea*. **ASHS Press**, n. McGregor 1968, p. 482–498, 1999.
- MELLO, E. V. S. L.; MIRANDA, N.; M. H.; NATALI, M. R. M. **Morfologia Do Colo Proximal De Ratos**. **Unimar**, 1996.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033–1079, 1 out. 1997.
- MILLER, S. C.; YU, H. **Echinacea: the genus Echinacea**. [s.l.] Crc press, 2004.
- MILLS, S. J. et al. Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis. **Gut**, v. 48, n. 1, p. 41–46, 2001.

- MISHIMA, S. et al. Antioxidant and Immuno-Enhancing Effects of *Echinacea purpurea*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 7, p. 1004–1009, 2004.
- MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F.; NAVARRO, I. . **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: [s.n.].
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 4, p. 554–566, ago. 2008.
- MUNIZ, G. L. .; B. C. L. B. D. .; S. C. K. S. TOXOPLASMOSE: FATORES QUE INFLUENCIAM NO AUMENTO DA TRANSMISSÃO EM GESTANTES. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, p. 15, 2021.
- NAHIRNEY, PATRICK.; OVALLE, WILLIAM. **Netter Bases da Histologia**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- NASCIMENTO, B. B. et al. Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice. **International journal of experimental pathology**, v. 98, n. 4, p. 191–202, ago. 2017.
- NASCIUTTI, L. et al. HISTOLOGIA DO TUBO DIGESTÓRIO. Em: **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Editora Blucher, 2016. p. 273–314.
- NEUNLIST, M. et al. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: A new actor in gut health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 90–100, 2013.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana** . 12^a Ed. ed. [s.l.: s.n.].
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un Protozoaire nouveau du Gondi (*Toxoplasma n. gen.*). 1 jan. 1909.
- NIELSEN, M. J.; KARSDAL, M. A. Chapter 3 - Type III Collagen. In: KARSDAL LAMININS AND ELASTIN, M. A. B. T.-B. OF C. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2016. p. 21–30.
- O'HARA, J. R.; SHARKEY, K. A. Proliferative capacity of enterochromaffin cells in guinea-pigs with experimental ileitis. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 433–441, ago. 2007.
- OLDENHOVE, G. et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 772–786, 20 nov. 2009.
- OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D.; VAN KAER, L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 4, p. 264–275, 2018.
- ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean journal of parasitology**, v. 38, n. 4, p. 209–236, dez. 2000.
- ONISZCZUK, T. et al. Active polyphenolic compounds , nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L .) Moench .). **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, p. 24–30, 2019.
- PARK, S. et al. *Echinacea purpurea* Protects Against Restraint Stress-Induced Immunosuppression in BALB/c Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 3, p. 261–268, 7 dez. 2017.

- PARK, S.-J. et al. Echinacea purpurea Extract Enhances Natural Killer Cell Activity In Vivo by Upregulating MHC II and Th1-type CD4+ T Cell Responses. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, n. 10, p. 1039–1049, 1 out. 2021.
- PARNHAM, M. J. Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (Echinacea purpurea) for long-term oral immunostimulation. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 95–102, 1996.
- PASTRE, M. J. et al. Acute infection with Toxoplasma gondii oocysts preferentially activates non-neuronal cells expressing serotonin in the jejunum of rats. **Life Sciences**, v. 283, n. 15, p. 119872, 2021.
- PASTRE, M. J. et al. Toxoplasma gondii causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 114, 2019a.
- PELLATI, F. et al. Variability in the Composition of Anti-oxidant Compounds in Echinacea Species by HPLC. **Wiley InterScience**, v. 85, n. March 2004, p. 77–85, 2005.
- PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, abr. 2008.
- PEREIRA, A. V. et al. Histopathological lesions in encephalon and heart of mice infected with Toxoplasma gondii increase after Lycopodium clavatum 200dH treatment. **Pathology - Research and Practice**, v. 213, n. 1, p. 50–57, jan. 2017.
- PETREY, A. C.; DE LA MOTTE, C. A. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. **Current opinion in gastroenterology**, v. 33, n. 4, p. 234–238, jul. 2017b.
- PFEFFERKORN, L. C.; PFEFFERKORN, E. R. Toxoplasma gondii: genetic recombination between drug resistant mutants. **Experimental parasitology**, v. 50, n. 3, p. 305–316, dez. 1980.
- PIANETTI, G. A.; ALBUQUERQUE, M. M.; ARAÚJO, A. A. Métodos de preparação das formas farmacêuticas derivadas. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 61–74., 2011.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1, p. 215–236, 1997.
- PRADO, A. et al. TOXOPLASMOSE: O QUE O PROFISSIONAL DA SAÚDE DEVE SABER. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 7, n. 12, 31 maio 2011.
- PRAUSE, A. et al. Expression and function of 5-HT₇ receptors in smooth muscle preparations from equine duodenum, ileum, and pelvic flexure. **Research in veterinary science**, v. 87, p. 292–299, 1 maio 2009.
- 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.
- RAETZ, M. et al. Parasite-induced Th1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature immunology**, v. 14, n. 2, p. 136–142, fev. 2013.
- RAMAKRISHNAN, C. et al. An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of Toxoplasma gondii by cats. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1474, 6 fev. 2019.

RAVANBAKHS N, K. A. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. **Ann Gastroenterol**, n. 32, p. 338–45, 2019.

REBER, L. L. et al. Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 3, p. 444–463, maio 2015.

REMYINGTON, J. S. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn: Expert Consult, Seventh Edition**. [s.l.: s.n.].

REMYINGTON, J. S. The present status of the IgM fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Journal of pediatrics**, v. 75, n. 6, p. 1116–1124, dez. 1969.

REMYINGTON, J. S.; MILLER, M. J.; BROWNLEE, I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 71, n. 5, p. 855–866, 1 maio 1968.

REY, L. **Parasitologia**. 4^o ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 12–13, p. 881–885, maio 2002.

ROSS, M.; WOJCIECH, P. **Histologia Texto e Atlas-Correlações com Biologia Celular e Molecular**. 7^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2016.

ROSTKOWSKA, C. et al. Si-Accumulation In Artemisia annua Glandular Trichomes Increases Artemisinin Concentration, but Does Not Interfere In the Impairment of Toxoplasma gondii Growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1430, 2016.

SABIN, A. B. et al. PRESENT STATUS OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF TOXOPLASMOSIS IN MAN: INDICATIONS AND PROVISIONS FOR ROUTINE SEROLOGIC DIAGNOSIS. **Journal of the American Medical Association**, v. 150, n. 11, p. 1063–1069, 15 nov. 1952.

SABIN, A. B. TOXOPLASMIC ENCEPHALITIS IN CHILDREN. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, n. 9, p. 801–807, 1 mar. 1941.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660–663, 10 dez. 1948.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. Toxoplasma and Obligate Intracellular Parasitism. **Science**, v. 85, n. 2205, p. 336–338, 2 abr. 1937.

SABIN, A. B.; WARREN, J. Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (Toxoplasma). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 19–23, 1 out. 1942.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 476–481, 1 out. 2005.

- SALZMAN, N. H.; BEVINS, C. L. Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction. **Seminars in immunology**, v. 25, n. 5, p. 334–341, nov. 2013.
- SAND, J. M. B.; GENOVESE, F.; KARSDAL, M. A. Chapter 4 - Type IV Collagen. In: KARSDAL LAMININS AND ELASTIN, M. A. B. T.-B. OF C. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2016. p. 31–41.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 279–286, ago. 2012.
- SCHNEIDER, L. C. L. et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. **Neurogastroenterology and motility**, v. 30, n. 5, p. e13264–e13264, 2018.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Doenças tropicais negligenciadas**. 2021.
- SENCINA, D. S. et al. Effects of Echinacea extracts on macrophage antiviral activities. **Phytotherapy research : PTR**, v. 24, n. 6, p. 810–816, jun. 2010.
- SHARIFI-RAD, M. et al. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1653–1663, 1 set. 2018.
- SHARKEY, K. A.; BECK, P. L.; MCKAY, D. M. Neuroimmunophysiology of the gut: advances and emerging concepts focusing on the epithelium. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 12, p. 765–784, 2018.
- SHERIDAN, B. S.; LEFRANÇOIS, L. Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 6, p. 513–521, dez. 2010.
- SIBLEY, L. D. et al. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 1003–1015, 1 dez. 1992.
- SIBLEY, L. D. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749–2761, 27 set. 2009b.
- SIBLEY, L. D.; ANDREWS, N. W. Cell Invasion by Un-Palatable Parasites. **Traffic**, v. 1, n. 2, p. 100–106, fev. 2000.
- SOUZA, J. Y. DE et al. IgG Avidity in Samples Collected on Filter Paper: Importance of The Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 43, n. 12, p. 887–893, 21 dez. 2021.
- SOUZA, W. DE; BELFORT JR., R. **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2014.
- SOUZA, W. J. S. et al. Epidemiological aspects of toxoplasmosis in schoolchildren residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 475–482, dez. 1987.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoo parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kalaazar dell' uomo. **Rev Soc Scient Sao Paulo**, 1908.

SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4851, p. 516–518, 22 abr. 1988.

TABILE, P. M. et al. Toxoplasmose gestacional: uma revisão da literatura. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 3, p. 158–162, 4 jul. 2015.

TANG, F. et al. Cytosolic PLA₂ is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 3, p. 707–719, mar. 2009.

TAYLOR, M.; COOP, B.; WALL, R. **Veterinary Parasitology 3rd Edition**. [s.l: s.n.].

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 1 nov. 2000.

TERAJIMA, M. et al. Glycosylation and Cross-linking in Bone Type I Collagen*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 33, p. 22636–22647, 2014.

THEOHARIDES, T. C. et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4448–53, mar. 2010.

THOMPSON-SNIPES, L. et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 2, p. 507–510, 1 fev. 1991.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 7, p. 501–508, 1 jul. 2013.

TORRES, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'Homme, caracterisee par la presence d'un parasite intracellulaire, tres proche du *Toxoplasma* et de *Encephalitozoon*, dans la tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu cellulaire sous-cutane et le tissu nerveux. p. 1778–1781, 1 jan. 1927.

TOUMI, F. et al. Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, n. 1, p. 187–191, 2004.

TREVIZAN, A. R. et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 22–29, 1 jun. 2016.

VALENT, P. et al. Updated Diagnostic Criteria and Classification of Mast Cell Disorders: A Consensus Proposal. **HemaSphere**, v. 5, p. e646, 1 out. 2021.

VARMA, S.; ORGEL, J. P. R. O.; SCHIEBER, J. D. Nanomechanics of Type I Collagen. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 1, p. 50–56, 2016.

VEDOVATO, K. et al. O EIXO INTESTINO-CÉREBRO E O PAPEL DA SEROTONINA. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 18, 9 jul. 2015.

- VERGNOLLE, N.; CIRILLO, C. Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 33, p. 269–280, 1 jul. 2018.
- VICENTINO-VIEIRA, S. L. et al. Oral dependent-dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 12–18, 2015.
- VICENTINO-VIEIRA, S. L. et al. Toxoplasma gondii infection causes structural changes in the jejunum of rats infected with different inoculum doses. **Life Sciences**, v. 191, n. June, p. 141–149, 2017a.
- VIMALANATHAN, S. et al. **Broad Antiviral Effects of Echinacea purpurea against SARS-CoV-2 Variants of Concern and Potential Mechanism of Action** *Microorganisms*, 2022.
- VOLSKI, T.; MELLO, E. V. DE S. L. E; NATALI, M. R. M. Morfologia do Epitélio Intestinal de Ratos Adultos Utilizando-se Como Meio de Inclusão o Paraplast e o Glicometacrilato. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 3, n. 2, 1999.
- WAGER, M. G. T. AND J. F. S. Echinacea purpurea (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.
- WANG, C. et al. Type III collagen is a key regulator of the collagen fibrillar structure and biomechanics of articular cartilage and meniscus. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 85–86, p. 47–67, jan. 2020.
- WANG, X. The Mechanism of Secretion and Metabolism of Gut-Derived 5-Hydroxytryptamine. 25 jul. 2021.
- WEISS, L. M.; KIM, K. **Toxoplasma gondii: the model apicomplexan : perspectives and methods**. [s.l.] Elsevier/Academic Press, 2007.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. **Science**, v. 89, n. 2306, p. 226–227, 10 mar. 1939.
- WORTHINGTON, J. J.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 1, p. 3–20, 2018.
- WU, H. et al. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, v. 140, n. February 2018, p. 100–114, 2019b.
- XUE, M.; JACKSON, C. J. **Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring**. *Advances in wound care* United States, mar. 2015.
- YAROVINSKY, F. **Innate immunity to Toxoplasma gondii infection**. *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , fev. 2014.
- YOO, B. B.; MAZMANIAN, S. K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 910–926, 2017.
- YU, P. L. et al. Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase in the human and rat gastrointestinal tracts. **The Journal of comparative neurology**, v. 411, n. 4, p. 654–665, set. 1999.

ZHAI, Z. et al. Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple Echinacea species. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 3, p. 423–434, 2007a.

7 ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "RESPOSTA TECIDUAL AO USO DE Echinacea purpurea SOBRE O INTESTINO, CÉREBRO, CORAÇÃO, FÍGADO E RIM DE *Rattus norvegicus* COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii*", protocolada sob o CEUA nº 7633021018 (ID 001945), sob a responsabilidade de **Profa Dra. Débora de Mello Gonçalves Sant'ana e equipe; Maria José Pastre; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo; Karine Delgado de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "Tissue response after the use of *Echinacea purpurea* on the intestine, brain, heart, livers and kidney of *Rattus norvegicus* with chronic infection by *Toxoplasma gondii*", utilizing 100 Heterogenics rats (100 males), protocol number CEUA 7633021018 (ID 001945), under the responsibility of **Profa Dra. Débora de Mello Gonçalves Sant'ana and team; Maria José Pastre; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo; Karine Delgado de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2018](#) a [04/2022](#)

Área: [Dcm-Ciências Morfológicas](#)

Origem: [Biotério Central da UEM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [19 a 21 dias](#)

N: [100](#)

Linagem: [Wistar](#)

Peso: [80 a 100 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Neurogastroenterologia, sala 2, bloco H79, Departamento de Ciências Morfológicas.

Maringá, 29 de novembro de 2018

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AA5776C

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AA5776C**
 Usuário: **MARCELO BIONDARO GOIS**
 CPF/CNPJ: **029.731.779-28**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Toxoplasma gondii
Echinacea purpurea

Título da Atividade: **RESPOSTA TECIDUAL AO USO DE Echinacea purpurea SOBRE O
 INTestino, Cérebro, Coração, Fígado e Rim DE Rattus norvegicus
 COM INFECÇÃO CRÔNICA POR Toxoplasma gondii**

Equipe

Marcelo Biondaro Gois	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Maria José Pastre	Universidade Estadual de Maringá
Jaqueline de Carvalho Rinaldi	Universidade Estadual de Maringá
Karine Delgado de Souza	Universidade Paranaense
Emerson Luiz Botelho Lourenço	Universidade Paranaense
Daniela Dib Gonçalves	Universidade Paranaense
Thais Agostinho Martins	Universidade Paranaense

João Luiz Garcia	Universidade Estadual de Londrina
Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana	Universidade Estadual de Maringá

Parceiras Nacionais

79.151.312/0001-56 / Universidade Estadual de Maringá
78.640.489/0001-53 / Universidade Estadual de Londrina
75.517.151/0001-10 / Associação Paranaense de Ensino e Cultura

Data do Cadastro: **13/06/2019 10:42:30**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:43** de **13/06/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

EXPERIMENTOS ADICIONAIS

Em paralelo ao projeto de mestrado, também foram investigados os impactos do tratamento com pirimetamina no cólon de ratos submetidos a infecção crônica causada por 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH genótipo I). O desenho experimental foi similar ao já exposto no capítulo I. Assim, aqui serão adicionadas somente as informações referentes aos dois grupos tratados com pirimetamina: GI+P (grupo infectado e tratado com pirimetamina) e GC+P (grupo controle não infectado e tratado com pirimetamina).

Os ratos do grupo GI+P receberam, via oral, 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I), os quais foram obtidos junto ao Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Os ratos não infectados (GC+P) receberam somente solução salina estéril.

O tratamento com a pirimetamina (GI+P e GC+P) foi realizado por via oral na dose de 12,5 mg/kg diários por 28 dias após a inoculação de 500 oocistos esporulados do *T. gondii* dos ratos do GI+P.

EUTANÁSIA, COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Vinte e oito dias após a inoculação, com 93 dias de idade, os ratos foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano. Foi realizada a laparotomia vertical e dois centímetros do cólon foram coletados, lavados e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas.

Após a fixação, os segmentos foram embebidos em parafina para realização de quatro cortes transversais semi-seriados de 4 µm dispostos em lâminas de vidro. Após, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em séries descendentes de álcool (100° - I, II, III, 90°, 80°, 70°) e corados em: hematoxilina e eosina (HE) - para a análise quantitativa de linfócitos intra-epiteliais.

ANÁLISE QUANTITATIVA DOS LINFÓCITOS INTRA-EPITELIAIS

Foram contadas 2560 células consecutivas do epitélio do cólon, de cada rato, em lâminas coradas em HE. Os linfócitos presentes entre as células epiteliais foram considerados linfócitos intra-epiteliais (LIEs). Desta forma, foi calculada a proporção de LIEs/100 células epiteliais (SANT'ANA et al., 2012). Os resultados foram expressos pela mediana e desvio-interquartílico.

RESULTADOS PARCIAIS

Quando realizada a comparação entre GC vs GC+P, teste realizado com o intuito de analisar os efeitos do tratamento com pirimetamina em ratos não infectados, foi possível observar a diminuição da quantidade de linfócitos intra-epiteliais no grupo tratado com pirimetamina ($p < 0,001$). Além disso, o tratamento com pirimetamina nos ratos do GI+P causou a diminuição de linfócitos intra-epiteliais comparado ao GI ($p < 0,001$). Novas comparações estão sendo realizados, incluindo a análise dos efeitos da imunoestimulação com o extrato aquoso a base de *E. purpurea* (100 mg/kg) versus o tratamento com pirimetamina.

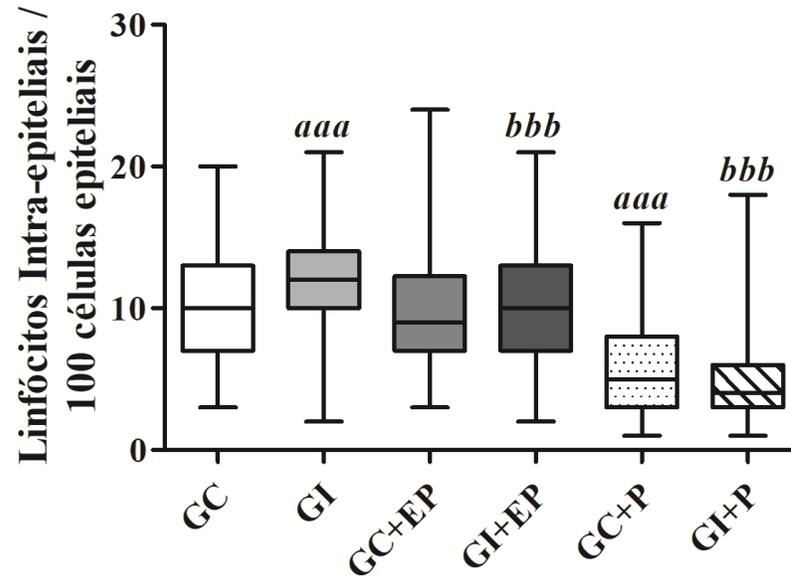


Figura Adicional. Mediana e desvio-interquartílico da distribuição dos linfócitos intra-epiteliais presentes no epitélio da mucosa do cólon de ratos dos grupos controle (GC), infectados com 500 oocistos de *T. gondii* (cepa RH genótipo I) e não imunoestimulados (GI), imunoestimulados com *E. purpurea* (GC+EP), infectados e imunoestimulados com *E. purpurea* (GI+EP), não infectados e tratados com pirimetamina (GC+P) e infectados e tratados com pirimetamina (GI+P). Valores seguidos pelas letras *a* ou *b* indicam diferença significativa comparada ao GC ou GI, respectivamente, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e post-test de Dunn's multiple comparison test. Uma letra ($p < 0.05$), duas letras ($p < 0.01$) e três letras ($p < 0.001$).