

CAPÍTULO 11

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE *Echinodorus macrophyllus* NO TRATAMENTO DA NEUROTOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL

Data de submissão: 23/01/2025

Data de aceite: 01/04/2025

Yasmim Mesquita Breunig

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/4833275037684327>

Vanessa Bridi

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/2507549337510476>

Stéfanne Rodrigues Rezende Ferreira

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/8396448559063761>

Mônica Rodrigues Ferreira Machado

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Biociências, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/7962178263544668>

Débora Pereira Gomes do Prado

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/1564090371585374>

Ludimila Paula Vaz Cardoso

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/5434857923089593>

Nadya da Silva Castro Ragagnin

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/5581172635334890>

Hanstter Hallison Alves Rezende

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde, Jataí – Goiás
<http://lattes.cnpq.br/4982752673858886>

RESUMO: A toxoplasmose é uma parasitose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório. É transmitida aos seres humanos através das fezes de animais contaminados pelo agente transmissor, e caracteriza-se por afetar vários sistemas do corpo humano, incluindo o linfático, cardiorrespiratório e em especial, o nervoso. O tratamento comum da toxoplasmose envolve o uso de fármacos combinados ou não, como Pirimetamina e Sulfadiazina. No entanto, esse recurso terapêutico pode resultar em efeitos adversos, como alterações no sistema nervoso que podem causar sequelas neurológicas. Este estudo avaliou um tratamento alternativo, determinando a embriotoxicidade de compostos de *Echinodorus macrophyllus* em diferentes concentrações, analisando o desenvolvimento embrionário da espécie *Danio rerio* ou Zebrafish, um modelo experimental vivo promissor. Os resultados

evidenciaram que os compostos de Extrato Bruto, mesmo em altas concentrações, apresentaram maior taxa de sobrevivência, em comparação à fração Diclorometano, que apresentou taxa de toxicidade significativa. Além disso, foram observados comportamentos fisiológicos e alterações morfológicas em resposta à *E. macrophyllus*. Apesar da falta de estudos prévios e comparativos com a espécime vegetal e o Zebrafish, esta pesquisa apresentou-se relevante positivamente, com taxas de toxicidade inferiores, contraposto com os tratamentos convencionais. Portanto, os compostos de *E. macrophyllus* podem ser avaliados em estudos futuros para o possível desenvolvimento de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, embriotoxicidade, zebrafish, tratamento alternativo.

EVALUATION OF *Echinodorus macrophyllus* COMPOUNDS IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL NEUROTOXOPLASMOSIS

ABSTRACT: Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite. It is transmitted to humans through the feces of animals contaminated with the infectious agent and is characterized by affecting various systems of the human body, including the lymphatic, cardiorespiratory, and especially the nervous system. The common treatment for toxoplasmosis involves the use of drugs, either combined or alone, such as Pyrimethamine and Sulfadiazine. However, this therapeutic approach can lead to adverse effects, such as alterations in the nervous system that may cause neurological sequelae. This study evaluated an alternative treatment, determining the embryotoxicity of compounds from *Echinodorus macrophyllus* at different concentrations by analyzing the embryonic development of the species *Danio rerio* or Zebrafish, a promising live experimental model. The results showed that the compounds from the Crude Extract, even at high concentrations, demonstrated a higher survival rate compared to the Dichloromethane fraction, which exhibited significant toxicity levels. Additionally, physiological behaviors and morphological alterations were observed in response to *E. macrophyllus*. Despite the lack of previous studies and comparative data on the plant species and Zebrafish, this research proved to be positively relevant, showing lower toxicity rates compared to conventional treatments. Therefore, the compounds from *E. macrophyllus* may be further evaluated in future studies for the potential development of new drugs.

KEYWORDS: *Toxoplasma gondii*, embryotoxicity, zebrafish, alternative treatment.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmosse é uma doença de caráter zoonótico de distribuição geográfica mundial, que possui grande relevância para a saúde pública, é provocada por um protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*. A infecção é muito frequente em animais de sangue quente, incluindo mamíferos e aves, sendo que, os felídeos, principalmente os gatos, são os hospedeiros definitivos, e o homem e os outros animais são hospedeiros intermediários. (Neves *et al.*, 2005).

Toxoplasma gondii é um parasito pertencente ao Reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa e família Sarcocystidae (Levine, 1988). As formas infectantes que o parasito apresenta durante seu ciclo biológico são taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos são a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada a forma proliferativa, ficam alojados nas células do epitélio intestinal do hospedeiro. Os bradizoítos são comumente encontrados na fase crônica da doença, e são denominados de cistozoítos, pois estão organizados em cistos teciduais que se multiplicam vagarosamente e apresentam resistência à resposta imunológica do hospedeiro, o que lhes permite manter sua viabilidade por longos períodos. Os esporozoítos são encontrados dentro de oocistos. Os oocistos, por sua vez, são produzidos nas células intestinais de felídeos não-imunes e eliminados imaturos junto com as fezes (Souza *et al.*, 2023).

A patogenia em seres humanos depende de alguns fatores determinantes, como, a virulência da cepa do parasito, a forma de infecção e fatores imunossupressores do sistema imunológico. As infecções agudas ocorrem devido a multiplicação dos taquizoítos e, normalmente não causam sintomas em indivíduos imunocompetentes, resultando apenas em sintomas gerais e inespecíficos, como, febre, fadiga, cefaleia, mialgia, entre outros (Sanchez; Besteiro *et al.*, 2021).

Apesar dos sintomas leves, há uma intensa reprodução e disseminação dos taquizoítos, principalmente no cérebro e músculos esqueléticos, resultando na conversão em bradizoítos encapsulados em cistos teciduais, que podem permanecer latentes ao longo da vida do hospedeiro. Em casos de imunossupressão, ocorre a reativação desses cistos, desencadeando um novo ciclo de infecção aguda, estimulando uma resposta inflamatória exacerbada e o desenvolvimento de formas mais graves da doença, como neurotoxoplasmose, toxoplasmose ocular e toxoplasmose congênita. Os principais sintomas nessa fase incluem lesões cerebrais, oculares, pulmonares, além de dores de cabeça, febre, confusão mental, entre outros (Cerutti *et al.*, 2020).

A neurotoxoplasmose (NTX) é uma condição clínica grave de doença neurológica causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, em que ocorre reativação cística no cérebro, provocando uma resposta inflamatória intensa que leva à morte celular neuronal. Os neurônios infectados sofrem mudanças tanto morfológicas quanto funcionais, resultando na perda de circuitos neurais e sintomas clínicos como encefalopatia difusa, meningoencefalite, lesões cerebrais em massa, dores de cabeça, confusão mental, alterações na fala e visão, falta de coordenação motora e convulsões. (Wohlfert *et al.*, 2011).

O tratamento da toxoplasmose baseia-se na combinação de fármacos, incluindo a sulfadiazina, que atua inibindo a diidropteroato sintase (XaDHPS), e a pirimetamina, que inibe a diidrofolato redutase (DHFR). Essas enzimas são essenciais na síntese de folato para a produção de RNA e DNA do parasita (Lapinskas; Bem-harari, 2019). Apesar da eficácia desses medicamentos, eles frequentemente causam uma variedade de efeitos colaterais nos pacientes, o que muitas vezes leva à interrupção do tratamento. Os principais

efeitos colaterais incluem supressão da medula óssea devido à inibição do ácido fólico, alterações hematológicas (como neutropenia, eosinofilia, pancitopenia, trombocitopenia, leucopenia), erupções cutâneas, diarreia, insuficiência hepática, disfunção renal e efeitos mais graves, como síndrome de Steven-Johnson, necrose hepática, hipersensibilidade e efeitos teratogênicos durante o início da gravidez. (Da Silva *et al.*, 2017).

Além dos efeitos mencionados, a terapia medicamentosa da toxoplasmose tem enfrentado desafios de resistência medicamentosa, decorrentes do surgimento de novas cepas parasitárias. Esses medicamentos, aprovados há mais de 60 anos e amplamente utilizados, carecem de alternativas igualmente eficazes. Além disso, sua eficácia se concentra principalmente nos taquizoítos durante a fase aguda da infecção, sendo ineficazes na forma crônica da doença devido à complexidade de sua penetração através da barreira hematoencefálica (Montazeri, *et al.*, 2018; Daher, *et al.*, 2021).

As plantas medicinais são empregadas desde as épocas ancestrais, reconhecidas por desempenhar um papel relevante na cura e no tratamento de diversas doenças. A diversidade biológica das plantas proporciona uma ampla gama de compostos que podem ser isolados, permitindo a descoberta de novos agentes terapêuticos. Além dos compostos naturais, existe a possibilidade de desenvolver medicamentos sintéticos semelhantes com base no conhecimento prévio dos compostos encontrados nas plantas. (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005; Pedroso; Andrade; Pires *et al.*, 2021).

Echinodorus macrophyllus, uma planta da família *Alismataceae*, conhecida popularmente por diferentes nomes, como chapéu-de-couro, erva do bugre, erva do pântano, congonha do brejo, chá mineiro e chá de pobre, variando conforme a região. Em sua composição, estão presentes diversos compostos, tais como, saponinas, alcalóides, polifenóis, esteróides, entre outros. Na medicina popular, é frequentemente empregada para tratar condições como reumatismo, artrite, distúrbios estomacais e dermatológicos, problemas renais, vesicais e hepáticos, além de ser reconhecidas por suas propriedades anti-treponêmicas e diuréticas (Kobayashi *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2017). Além disso, apresenta atividades anti-inflamatórias e nefroprotetoras (Portella *et al.*, 2012).

O Zebrafish, também conhecido como *Danio rerio*, emerge como um modelo experimental promissor para investigações de embriotoxicidade. Sua viabilidade no contexto acadêmico é fortalecida por uma variedade de mecanismos fisiológicos que se assemelham aos encontrados em outros vertebrados, incluindo estrutura celular, respostas e sinalizações fisiológicas (Truong; Tanguay, 2017). Isso sugere que a replicabilidade dos testes realizados com esse peixe pode oferecer resultados comparáveis aos observados em seres humanos. Além disso, sua alta sensibilidade a agentes químicos é uma contribuição significativa para a avaliação de testes farmacológicos (Canedo *et al.*, 2022).

A pesquisa dedicada à embriologia proporciona uma compreensão mais profunda da biologia da espécie *Danio rerio*, abrangendo aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, enquanto também auxilia na identificação e resolução de problemas que afetam a mortalidade larval (Dos Anjos *et al.*, 2006). Isso se deve à maior vulnerabilidade do animal a distúrbios abióticos durante o ciclo embrionário. De acordo com Luz *et al.* (2018), entender os estágios iniciais da vida animal é crucial para compreender seu ritmo biológico, permitindo o controle da reprodução e a compreensão dos anexos embrionários e sua função durante o desenvolvimento do embrião.

Desta maneira, considerando os desafios enfrentados com os medicamentos atuais, é de extrema importância a descoberta de novos princípios ativos, que possam servir como base para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, *Echinodorus macrophyllus* emerge como uma candidata promissora, demonstrando efeitos significativos na proteção renal e redução da inflamação, podendo ser benéfica no tratamento da toxoplasmose, especialmente considerando a exacerbada resposta inflamatória na forma crônica da doença.

Além disso, esta planta contém compostos como saponinas e alcalóides, conhecidos por suas propriedades anti-parasitárias conforme descrito na literatura. Dado que ainda não existem estudos sobre sua eficácia contra *T. gondii* e nem quanto à eficácia e às características toxicológicas desta planta, esta pesquisa objetivou avaliar a toxicidade tanto do extrato bruto quanto da fração diclorometano de *E. macrophyllus* em zebrafish, visando identificar as frações seguras e promissoras para testes futuros de combate a neurotoxoplasmose.

METODOLOGIA

Comitê de Ética e depósito da espécime vegetal em herbário

O estudo foi submetido para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA-Jataí), sendo aprovado conforme o protocolo nº 16/2022. A espécime vegetal foi incluída e registrada no herbário Jataiense da Universidade Federal de Jataí, sob número HJ9359.

Preparação do extrato bruto e fração diclorometano de *E. macrophyllus*

Para preparar o extrato bruto (EB), a planta foi colhida e levada para uma estufa de circulação a 40°C para secagem, depois foi Triturada e reduzida a pó em um moinho e submetida a várias extrações sequenciais com etanol, sendo concentrada por rota-evaporação para obter o extrato bruto. Os solventes foram recuperados por filtração ou destilação e armazenados para possível reutilização.

A fração diclorometano (FDC) foi preparada através do fracionamento do extrato bruto utilizando o método de extração líquido-líquido. Uma porção do extrato bruto foi misturada com água destilada e então transferida para um funil de separação. Em seguida, adicionou-se o solvente diclorometano, permitindo a extração de componentes com polaridade alta a intermediária, formando assim a fração diclorometano de *E. macrophyllus*. Todas as etapas experimentais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da UFJ.

Animais experimentais

Para realização dos testes de embriotoxicidade, foram empregados embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) da linhagem AB, com uma idade de 2 células, originários do Biotério do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Peixes (LABFISH) da Universidade Federal de Jataí – UFJ. Os embriões foram contados após a reprodução, transferidos para placas de petri contendo meio E3 e classificados com base em critérios como coloração, disposição e proliferação celular, além de avaliação da fecundação e ocorrência de malformações, conforme padrões estabelecidos por Kimmel *et al.* (1995) e Lammer *et al.* (2009). Todos os procedimentos envolvendo os embriões foram realizados em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e ISO (Organização Internacional de Normalização).

Controles

Para realizar os controles dos testes, utilizou-se o meio de cultura embrionária E3, enriquecido com íons essenciais para o desenvolvimento embrionário, e o solvente DMSO (1%), empregado para dissolver a planta *Echinodorus macrophyllus*. Ambos foram empregados como controles negativos, permitindo a avaliação da viabilidade da reprodução dos peixes e do meio embrionário.

Concentrações utilizadas

Foi realizado um projeto piloto com o objetivo de avaliar uma gama de concentrações que variam desde 0% até 100% de mortalidade, sendo testadas 12 concentrações diferentes, das quais aquelas que demonstraram melhor resultado foram selecionadas para os testes de embriotoxicidade subsequentes de embriotoxicidade. Considerando que não há estudos da presente espécime vegetal testada em Zebrafish, foi conduzido este processo de triagem, baseando-se em concentrações utilizadas em estudos de outras espécimes vegetais. Portanto, após o teste piloto, as concentrações definidas para avaliar a embriotoxicidade foram as mesmas tanto para o extrato bruto, quanto para o dicloro, totalizando 6 concentrações: 0,310ug, 0,155ug, 0,077ug, 0,038ug, 0,019ug, 0,009ug.

Montagem da placa e análises realizadas

O processo experimental foi realizado em placas de polipropileno, de cor branca, fundo transparente e reto, contendo 24 poços, organizados em 4 linhas (A, B, C, D - representando repetições das concentrações) e 6 colunas (1, 2, 3, 4, 5, 6 - indicando diferentes concentrações). Os embriões classificados como bons foram distribuídos em todos os poços da placa, onde cada poço continha 5 embriões de zebrafish. Isso resulta em (2 extratos X 6 concentrações X 5 peixes em cada concentração = 60 embriões). Como os testes são realizados em triplicatas, no total, foram utilizados 180 embriões para avaliar a toxicidade e 2 placas. Além disso, foram incluídos controles com DMSO 1% e meio E3, com 6 poços para cada controle e 5 embriões por poço. Portanto, (2 controles X 6 poços para cada controle X 5 embriões em cada poço = 60 embriões). Por ser em triplicata, somando as concentrações dos extratos e controle, tem-se 360 embriões ao final do experimento. Posteriormente, foram colocadas as seis concentrações testadas em contato com os embriões (linha A e B - poços 1 ao 6) e controles negativos (linha C e D - poços 1 ao 6), com volume final de 2 mL por poço. A figura 1 expressa abaixo demonstra a montagem da placa experimental.

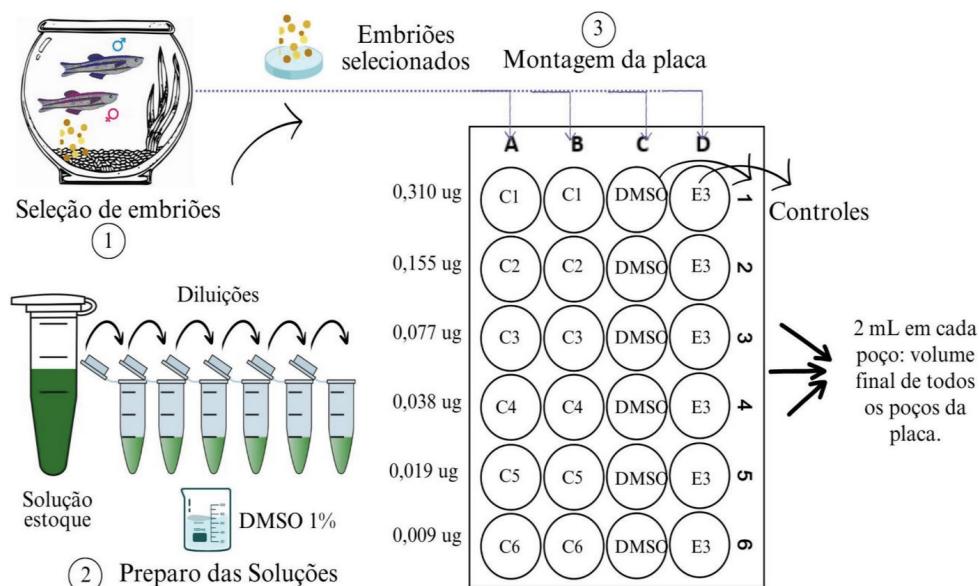


Figura 1: Fluxograma com as etapas seguidas para a montagem da placa experimental.

Na etapa 1 foram selecionados os embriões que apresentaram bons aspectos morfológicos. Na etapa 2, a solução estoque foi preparada a partir do extrato puro recebido, sendo este pesado em novo eppendorf e posteriormente diluído em solução preparada com DMSO 1% e E3. A partir da solução estoque foram feitas diluições seriadas, as quais contemplam as concentrações analisadas. Na etapa 3, foi realizada a montagem da placa, onde inicialmente os embriões (n.5), foram alocados na placa e posteriormente as soluções previamente preparadas. C1 - concentração 1; C2 - concentração 2, C3 - concentração 3, C4 - concentração 4, C5 - concentração 5, C6 - concentração 6, DMSO - diluente do extrato e controle negativo, E3 - meio embrionário dos animais e controle negativo.

Fonte: Autoria própria.

As análises de embriotoxicidade foram realizadas em intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, sendo realizadas observações detalhadas dos embriões ao longo de um período de cinco dias. Na Tabela 1 abaixo, estão descritas as análises conduzidas a cada intervalo de 24 horas.

Período	Observações
24 horas	Movimentos involuntários/embriões vivos e mortos
48 horas	Batimentos cardíacos/embriões vivos e mortos
72 horas	Alterações teratogênicas/embriões vivos e mortos
96 horas	Alterações teratogênicas/embriões vivos e mortos
120 horas	Alterações teratogênicas/embriões vivos e mortos

Tabela 1. Análises realizadas durante o experimento.

Fonte: Autoria própria.

Eutanásia do Zebrafish

Para eutanásia dos embriões de peixe-zebra que sobreviveram, as larvas foram submersas em uma solução de benzocaina a 3% até a cessação dos movimentos cardíacos por imersão direta.

Análises estatísticas

Os resultados adquiridos foram calculados através do teste Cochran Armitage, sendo que, os dados paramétricos em teste ANOVA seguido de Tukey para comparação média, para dados não paramétricos será empregado o Teste de Kruskall Wallis seguido de Dunn. Os gráficos foram gerados pelo software Graph Pad Prism 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise embriótica referente ao Extrato Bruto, demonstrou taxas de sobrevivência ao final de todas as concentrações avaliadas de aproximadamente 80%, dentre os 60 embriões testados. Dentre as seis concentrações examinadas, a concentração 0,310 ug expressou menor taxa de sobrevivência, correspondendo a 25% de embriões vivos analisados após 120 horas, indicando um potencial tóxico. Porém, as demais concentrações obtiveram um valor significativo em relação a embriotoxicidade, apresentaram aproximadamente 90% de sobrevivência.

Os controles negativos utilizados nestas análises demonstraram taxas de sobrevivência de aproximadamente 98%, tanto para E3 e DMSO. O gráfico 1 expresso abaixo demonstra as taxas de sobrevivência durante as horas de experimento, tanto para as diversas concentrações do extrato testadas, quanto para os controles utilizados. Em relação aos aspectos morfológicos dos embriões, foi possível observar que durante as 120 horas, apenas a maior concentração testada apresentou embriões com alguma alteração, sendo visualizados apenas 2 embriões com edema de saco vitelino já nas primeiras 24 horas de experimento.

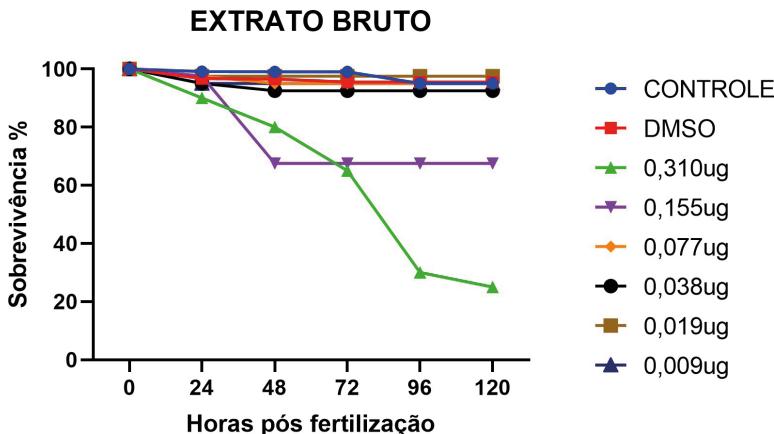


Gráfico 1. Taxa de sobrevivência em (%) de embriões tratados com Extrato Bruto.

Fonte: Autoria própria

Embriões submetidos à fração diclorometano isoladamente, demonstraram que, dos 60 embriões testados em todas as concentrações após 120 horas, a taxa de sobrevivência apresentou aproximadamente 60%, indicando resultados inferiores quando comparado ao extrato bruto. Entre as 6 diluições analisadas, a concentração de 0,310 ug após 120 horas apontou mortalidade total dos embriões, sugerindo ser altamente tóxico. As demais concentrações, também exprimiram resultados significativos de toxicidade, mesmo em menores concentrações, assim como demonstrado no gráfico 2.

Para os controles negativos, a taxa de sobrevivência de E3 foi de 96% e para o DMSO 1% foi de 97 %. Assim, demonstra-se que as altas taxas de mortalidade são decorrentes dos compostos provenientes da fração diclorometano de *E. macrophyllus*. Morfologicamente, foram observadas diversas malformações durante todo o ciclo de desenvolvimento das 120 horas analisadas (figura 2). Foram observadas alterações de edema de saco vitelino, edema de pericárdio, lordose e, nas primeiras horas, observou-se aumento de movimentos involuntários e diminuição da frequência cardíaca nas concentrações em geral. A concentração que apresentou maiores alterações foi a que também apresentou maior mortalidade, sendo a concentração de 0,310 ug. Desta forma, observamos que o animal que apresentava malformações, na análise do dia seguinte, estava morto.

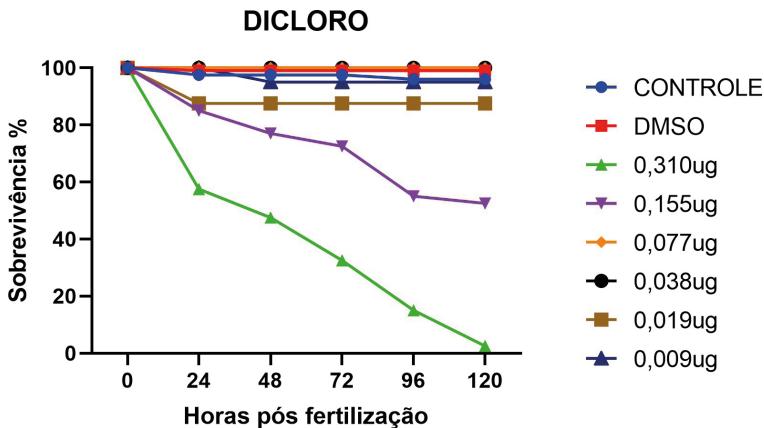


Gráfico 2. Taxa de sobrevivência em (%) de embriões tratados com a fração diclorometano.

Fonte: Autoria própria

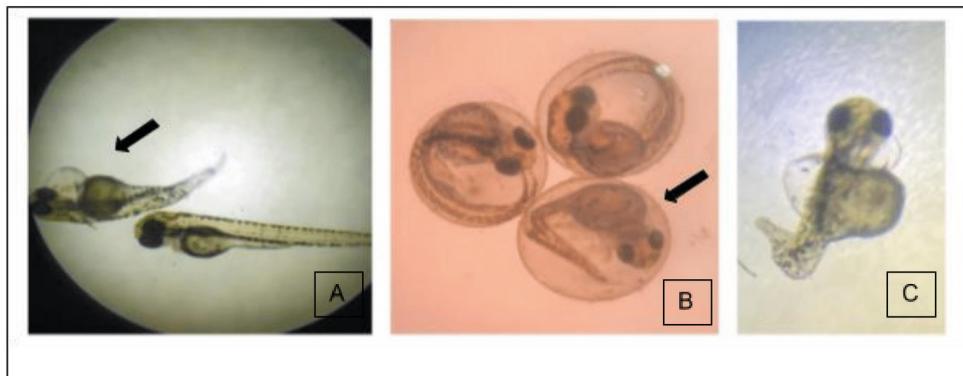


Figura 2. Alterações morfológicas observadas em concentrações Diclorometano

Em A, edema de pericárdio indicado pela seta. Em B, lordose indicada pela seta. Em C, o embrião apresenta lordose, edema de pericárdio e edema de saco vitelino. Fonte: Autoria própria

Comparando o extrato bruto e a fração diclorometano, foi possível observar que a taxa de sobrevivência após 120 horas de exposição, para a maior concentração testada (0,310 ug), foi de 25% e 5% para os respectivos extratos. Além disso, analisando o perfil expresso durante todos os dias de experimento, foi possível demonstrar que o número de mortalidade na fração diclorometano foi maior em todas as horas de experimento, quando comparado às taxas provenientes do extrato bruto, sendo possível inferir que os compostos extraídos por esta fração, foram consideravelmente mais tóxicos aos embriões. O gráfico 3 ilustra a taxa de sobrevivência, ao longo dos dias experimentais, comparando as duas partes da planta testadas na maior concentração estabelecida (0,310 ug), sendo esta a que apresentou maiores efeitos embriotóxicos.

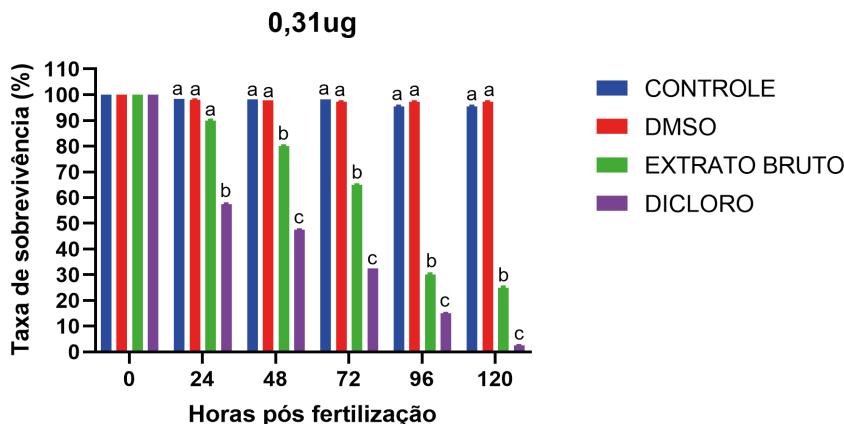


Gráfico 3. Comparação entre as taxas de sobrevivência (%) do extrato bruto e da fração diclorometano.

Fonte: Autoria própria.

Devido à falta de estudos com Zebrafish e *Echinodorus macrophyllus*, os resultados encontrados neste estudo trazem subsídios em relação aos potenciais toxicológicos do extrato bruto e da fração diclorometano de *E. macrophyllus*. Os efeitos observados neste estudo podem ser equiparados aos encontrados em outras pesquisas, como aquelas conduzidas com camundongos.

Um estudo realizado por discentes do curso de enfermagem da Universidade de São Paulo, com título, “Efeito renoprotetor da *Echinodorus macrophyllus* na lesão renal induzida”, avaliaram a ação diurética da espécime, além de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes em camundongos *Wistar*. Os resultados apresentados por esta pesquisa, evidenciaram que o pré-condicionamento com *E. macrophyllus* demonstrou efeito renoprotetor caracterizado pela redução do estresse oxidativo na lesão renal aguda induzida pela ciclofosfamida (Nascimento *et al.*, 2014).

Os resultados do estudo da espécime vegetal com os camundongos, encontram-se lineares ao estudo conduzido por Portella *et al.* (2012), onde evidenciou-se que os extratos das folhas de *E. macrophyllus* são utilizados no tratamento de distúrbios no sistema urinário, pois possuem ação diurética e anti-inflamatório. O emprego medicinal da planta é registrado entre os indígenas Kaingang, Guarani e Xokleng do sul do país (Marquesini, 1995).

Em relação a fitoquímica desta planta, são descritos em literatura que esta possui compostos de antinocicepção, isto é, redução na capacidade de perceber a dor, sendo importante componente para o organismo, quando este está envolvido em situações de emergência. Esses compostos identificados, apresentam perfis fitoquímicos compatíveis com os flavonoides os quais devem estar associados à ação antinociceptiva observada. (Martins, 2020). Apesar da falta de relação entre esta espécie e a neurotoxoplasmose, devido a falta de estudos, pode-se sugerir que esta detenha potenciais contra a patologia, visto a presença destes compostos.

Em vista disso, a partir dos dados levantados, nota-se que a espécime possui grande potencial para a indústria farmacêutica, sendo necessário mais estudos químicos e farmacológicos de qualificação em relação à embriotoxicidade da planta em organismos vivos.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a ausência de estudos prévios com *Zebrafish* e *Echinodorus macrophyllus* dificulta comparações diretas com trabalhos anteriores, mas pesquisas com camundongos e humanos podem trazer esclarecimentos relevantes. A fração diclorometano mostrou reduzir a sobrevivência dos embriões, possivelmente devido aos compostos extraídos. Houve variação nas respostas aos extratos e concentrações, com doses mais altas resultando em menor sobrevivência, sugerindo que ajustes nas concentrações do extrato bruto podem melhorar os resultados. O estudo destaca a necessidade de avaliar a embriotoxicidade e a complexidade das interações dos compostos da planta, contribuindo para futuras investigações sobre sua segurança e eficácia no tratamento alternativo da neurotoxoplasmose.

REFERÊNCIAS

- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M; SANTOS, L.F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.
- CANEDO, A.; SAIKI, P.; SANTOS, A. L.; CARNEIRO, K. S.; SOUZA, A. M.; QUALHATO, G.; BRITO, R. S.; MELLO-ANDRADE, F.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, e-70884, 2022.
- CERUTTI, A.; BLANCHARD, N.; BESTEIRO, S. The bradyzoite: A key developmental stage for the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 234, 2020.
- DAHER, D. et al. Comprehensive overview of *Toxoplasma gondii*-induced and associated diseases. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1351, 2021.
- DA SILVA, C. M. et al. Toxoplasma gondii—soroprevalência em pacientes HIV no sul do Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 43, n. 2, p. 73-80, 2017.
- DOS ANJOS, H. D. B.; DOS ANJOS, C. R. Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 32.2: 151-160, 2006.
- KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.
- KOBAYASHI, J. et al. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron letters**, v. 41, n. 16, p. 2939–2943, 2000.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.

LAPINSKAS, P. J.; BEN-HARARI, R. R. Perspective on current and emerging drugs in the treatment of acute and chronic toxoplasmosis. **Postgraduate medicine**, v. 131, n. 8, p. 589–596, 2019.

LEITE, J. P. V. et al. Contribuição ao estudo farmacobotânico de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Chapéu de couro – Alismataceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.1-6, 2007.

LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 2**. [s.l.] CRC Press, 2018.

LUZ, R. K., REYNALTE-TATAJE, D. A., FERREIRA, A. A., ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 27(1), 55-55, 2018.

MARQUESINI, N. R. **Plantas Usadas como Medicinais pelos Índios do Paraná e Santa Catarina – Sul do Brasil**. Tese de Doutorado, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995.

MARTINS, B. P. **Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e de seu potencial antinociceptivo**. 2020. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

MONTAZERI, M. et al. Drug resistance in *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2587, 2018.

NASCIMENTO, E. L. DO et al. Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, n. 1, p. 12–17, 2014.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11^a ed, São Paulo, Atheneu, 2005

PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 31, n. 2, 2021.

PORTELLA, V. G. et al. Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Nephron Extra**, v. 2, n. 1, p. 177-183, 2012.

SANCHEZ, S. G.; BESTEIRO, S. The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 3095–3114, 2021.

SANTOS, R. R. et al. Fenologia e quimiodiversidade do 'Chapéu-de-couro' (*Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*). **Cad. Ciênc. Agrá.**, p. v. 9, n. 3, páginas 115–118, 2017.

SOUZA, I. M. F. N. B. DE et al. Molecular and serological diagnosis of toxoplasmosis: a systematic review and meta-analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 65, p. e19, 2023.

TRUONG, L.; TANGUAY, R. L. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1641, p. 325–333, 2017.

WOHLFERT, E. A. et al. GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. **The journal of clinical investigation**, v. 121, n. 11, p. 4503–4515, 2011.