

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA DURANTE A INFECÇÃO PELO *Toxoplasma gondii*

ISABELE HELENA GONÇALVES ARAUJO¹; LUCAS DE SOUZA QUEVEDO²;
NATÁLIA BERNE PINHEIRO³; MARIA ELISABETH AIRES BERNE⁴; JOSELI
LANNES-VIEIRA⁵; LEDA CASTAÑO BARRIOS⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – isabellehelenaga@gmail.com

²Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES – souzaquevedo@unifimes.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

⁵Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – joselilannes@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ledacastano@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, uma zoonose de ampla distribuição que afeta cerca de um terço da população mundial. A soroprevalência varia entre 0,8 e 94%, a depender de fatores ambientais e socioeconômicos, como hábitos alimentares, condições de higiene, suscetibilidade do hospedeiro e localização geográfica (CAÑÓN-FRANCO et al., 2014; JONES et al., 2014).

T. gondii tem sido associado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, foi demonstrado que pacientes esquizofrênicos soropositivos para o parasito apresentam redução significativa do volume da substância cinzenta em comparação com pacientes soronegativos (HORACEK et al., 2012). A substância cinzenta, formada principalmente por corpos celulares neuronais, é responsável pelo processamento e integração da informação, enquanto a substância branca, composta por axônios mielinizados, atua na rápida comunicação entre diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC) (SNYDER et al., 2018). Alterações estruturais, como a diminuição da substância cinzenta e hipomielinização da substância branca, têm sido associadas a déficits cognitivos, de memória, atenção e regulação emocional em pacientes com esquizofrenia (PANTAZOPOULOS et al., 2015; LEZA et al., 2015).

Assim, no nosso estudo objetivamos avaliar histologicamente o volume da substância cinzenta e da substância branca, de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *T. gondii* a fim de investigar potenciais repercussões da infecção sobre a morfologia cerebral.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais que originaram o material utilizado neste estudo foram conduzidos em conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (licença L014/2018). No presente estudo, utilizamos exclusivamente cérebros de camundongos provenientes desse projeto previamente aprovado, não havendo realização de novos procedimentos experimentais em animais.

Fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 de 4 a 6 semanas de idade, foram infectadas com 5 cistos da cepa ME-49 tipo II do *T. gondii*. Após 30 dias de infecção (fase crônica), os cérebros foram coletados, seccionados sagitalmente,

fixados em formaldeído tamponado a 10% em solução salina por 10 dias, desidratados e incluídos em parafina.

Duas seções sagitais de 4 a 6 μm de espessura foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram escaneadas com o *Motic infinity 100 Scanner* e visualizadas usando o software *VM-Motic Digital Slide Assistance*, versão 1.0.7.46, permitindo a mensuração da espessura da camada da substância cinzenta e substância branca em micrômetros (μm). A espessura da substância cinzenta foi determinada pela mensuração do córtex e suas camadas: camada I (camada molecular) fica abaixo das meninges. camada II/III (granular externa e piramidal externa), IV (camada interna de células granulares), V (camada interna de células piramidais, contendo grandes células piramidais) e VI (camada multiforme, com neurônios fusiformes alongados) (SNYDER et al., 2018).

Os dados de espessura das substâncias cinzenta, branca e das camadas corticais foram expressos como média \pm desvio padrão. As comparações entre o grupo infectado e o grupo controle não infectado foram realizadas utilizando o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Animais C57BL/6 cronicamente infectados, apresentaram características próprias da neurotoxoplasmose. Um processo inflamatório com infiltrado celular foi observado em várias regiões dos cérebros, como córtex e hipocampo, incluindo a formação de manguitos perivasculares e inflamação das meninges (meningite) (Figura 1).

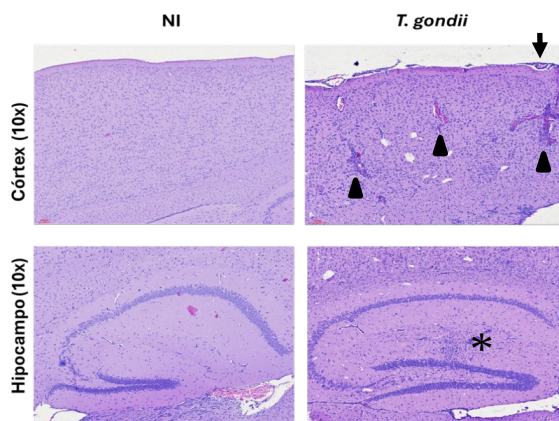


FIGURA 1. Alterações histopatológicas no cérebro de camundongos cronicamente infectados pelo *T. gondii*. Imagens superiores: córtex cerebral de animais NI (esquerda) e infectado (direita), mostrando meningite (+) infiltrado inflamatório e desorganização tecidual (▲). Imagens inferiores: hipocampo de animal controle (esquerda) e infectado (direita), com evidência de manguitos perivasculares (*) no animal infectado. Objetiva 10X, Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE)

A análise morfométrica revelou alterações significativas na morfologia cerebral dos animais infectados em comparação com o grupo controle não infectado (NI). O principal achado foi uma redução na espessura da substância cinzenta dos animais infectados (NI 177 ± 221.8 ; *T. gondii* 1048 ± 120.8 ; $P <$

0.001) (Figura 2A). Em contrapartida, a espessura da substância branca não sofreu alteração significativa entre os grupos (Figura 2B).

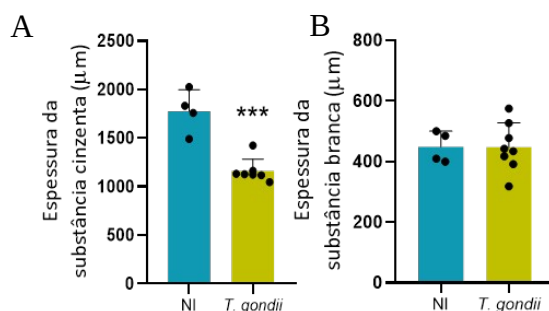


FIGURA 2. Análise morfométrica da espessura da substância cinzenta e branca. (A) Gráfico demonstrando a redução significativa da espessura da substância cinzenta em animais infectados pelo *T. gondii* em comparação com o grupo controle NI. (B) Gráfico mostrando a ausência de alteração na espessura da substância branca.

Este resultado em nosso modelo murino corrobora achados anteriores em humanos, que relataram uma diminuição do volume da substância cinzenta em indivíduos soropositivos para o *T. gondii* (HORACEK et al., 2012). A atrofia ou a redução da densidade e espessura da substância cinzenta está associada à fisiopatologia das alterações comportamentais e cognitivas (LEZA et al., 2015; PANTAZOPOULOS et al., 2015). Tais alterações já foram relatadas em paciente quanto em modelos animais infectados pelo parasito (HORACEK et al., 2012; CASTAÑO et al., 2021), reforçando a relevância dos nossos achados. A inflamação aqui observada, caracterizada pela presença de infiltrados celulares e meningite, pode ser um fator chave na indução do dano tecidual que leva à atrofia cortical.

Uma análise mais detalhada do córtex cerebral, que se encontra subdividido em camadas, indicou que a atrofia da substância cinzenta não foi uniforme. Nossos resultados revelaram que a diminuição da espessura foi mais proeminente nas camadas I (molecular), II/III (granular externa/piramidal externa), V (piramidal interna) e VI (multiforme), quando comparada com as dos animais NI (Figura 3). O comprometimento de camadas ricas em neurônios piramidais (II/III e V), essenciais para o processamento cognitivo e a comunicação inter-regional, sugere um substrato neuroanatômico para os déficits funcionais observados na infecção.

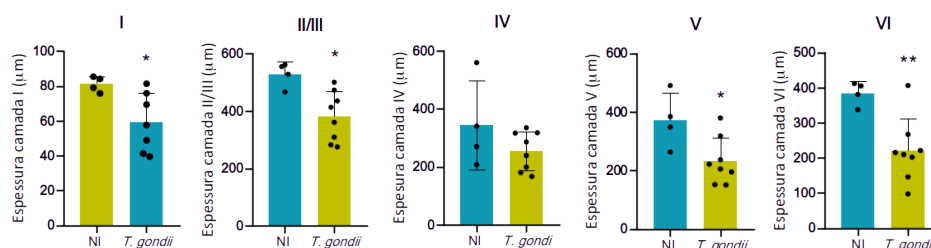


FIGURA 3. Análise da espessura das camadas corticais. Gráfico comparativo da espessura das camadas I, II/III, IV/V e VI do córtex cerebral entre o grupo NI e o grupo infectado, evidenciando a redução proeminente em camadas específicas.

Diante destes resultados, pretendemos em estudos futuros analisar a densidade neuronal e glial em cada camada cortical para determinar componentes celulares específicos afetados pela atrofia. Adicionalmente investigaremos a correlação da carga parasitária cerebral, a intensidade da resposta inflamatória e a extensão das alterações histológicas, buscando elucidar os mecanismos que ligam a infecção crônica à neurodegeneração.

4. CONCLUSÕES

A infecção crônica pelo *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6 induz uma atrofia significativa e seletiva da substância cinzenta, sem alterar a espessura da substância branca. A inovação deste trabalho reside na demonstração de que essa atrofia é proeminente em camadas corticais específicas (I, I/III, IV, IV), fornecendo um detalhamento histológico que aprofunda a compreensão sobre o dano tecidual. Estes achados fortalecem o uso deste modelo animal para investigar os mecanismos neuropatológicos que associam a toxoplasmose a transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAÑÓN-FRANCO WA, LÓPEZ-OROZCO N, GÓMEZ-MARÍN JE, DUBEY JP. An overview of seventy years of research (1944 – 2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. **Parasites & Vectors**. 2014;7(1):427.

CASTAÑO, L., DA SILVA, AP., GIBALDI, D., SILVA, A., MACHADO, P., ROFFÊ, E., DA COSTA, H., GAZZINELLI, R., MINEO, JR., SILVA, NM., LANNES-VIEIRA, J. Behavioral alterations in long-term *Toxoplasma gondii* infection of C57BL/6 mice are associated with neuroinflammation and disruption of the blood brain barrier. **Plos one**, 16(10), e0258199. 2021.

HORACEK, J., FLEGR, J., TINTERA, J., VEREBOVA, K., SPANIEL, F., NOVAK, T., BRUNOVSKY, M., BUBENIKOVA-VALESOVA, V., HOLUB, D., PALENICEK, T. AND HÖSCHL, C. Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. **The World Journal of Biological Psychiatry**, 13(7), pp.501-509. 2012.

JONES, JL. DUBEY, JP. Epidemiologia da Toxoplasmose. In: SOUZA W, BELFORT JR. **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. Rio de Janeiro Editora Fiocruz; 2014. p. 117-126.

LEZA, JC., GARCIA-BUENO, B., BIOQUE, M., ARANGO, C., PARELLADA, M., DO, K., O'Donnell, P., BERNARDO, M. Inflammation in schizophrenia: a question of balance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 55, 612-626. 2015.

PANTAZOPOULOS, H., MARKOTA, M., JAQUET, F., GHOSH, D., WALLIN, A., SANTOS, A., CATERSON, B., BERRETTA, S. AggreCAN and chondroitin-6-sulfate abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem study on the amygdala. **Translational psychiatry**. 5(1), e496-e496. 2015.

SNYDER, JM., HAGAN, CE., BOLON, B., KEENE, CD. Nervous System. In: TREUTING, PM.; DINTZIS, SM.; MONTINE, KS. **Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas**. Academic Press, 2017. Cap. 20, p 403-444.