

## ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE CÉREBROS E OLHOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII*, CEPA ME-49, EM FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO.

Thaís Andreia Ferreira (PIC - UEM), e-mail: thaísa2911@gmail.com, Fernanda Ferreira Evangelista; Ana Lúcia Falavigna-Guilherme; Priscilla de Laet Sant'Ana (Orientador), e-mail: plsamariano2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: 40100006 - Medicina, Subárea: 40105008 - Anatomia Patológica e Patologia Clínica

**Palavras-chave:** Histopatologia, toxoplasmose crônica, coriorretinite.

### Resumo

A toxoplasmose é uma zoonose mundialmente distribuída, causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*. A infecção é geralmente assintomática, mas, pode causar quadros graves quando adquirida na gestação, em pacientes imunocomprometidos. Uma das manifestações comuns é coriorretinite, que pode causar perda parcial ou total da visão. Após uma fase aguda em que o parasito se distribui sistemicamente no organismo do hospedeiro, inicia um processo de encistamento, com tropismo para o tecido muscular, nervoso e da retina, que caracteriza a fase crônica da infecção. O objetivo deste projeto avaliar a presença de alterações histopatológicas no cérebro e olhos de camundongos infectados com a cepa cistogênica ME-49 de *T. gondii* em fase crônica. Os animais foram divididos em dois grupos com 7 animais cada, sendo um grupo controle não infectado e um grupo infectado com a cepa ME-49. Os animais foram acompanhados durante 60 dias, avaliando-se os parâmetros clínicos e, após este período, foram eutanasiados retirando-se os cérebros e olhos para processamento histológico, e coloração pela técnica de HE. Foi possível observar que a resposta inflamatória e as lesões teciduais permanecem ativas nos cérebros dos animais infectados, mostrando que a infecção crônica não é latente e tem efeitos lesivos ao hospedeiro. No entanto, neste mesmo modelo, não foi possível observar alterações histopatológicas nas membranas oculares.

### Introdução

A toxoplasmose, é uma zoonose mundialmente disseminada, causada pelo *Toxoplasma gondii*. A infecção em pessoas imunocompetentes é geralmente assintomática, no entanto na forma congênita ou em indivíduos imunocomprometidos a doença pode apresentar quadros graves (REMYINGTON, 2011). Após a disseminação sistêmica dos taquizoítos na fase aguda, o protozoário tende a formar cistos dentro dos quais se multiplica na forma de bradizoítos, em tecidos como cérebro, olhos e músculo esquelético, caracterizando a

forma crônica (REMINGTON, 2011). Apesar de ser considerada latente, a forma crônica da toxoplasmose tem sido associada a distúrbios de comportamento, como esquizofrenia, transtorno bipolar e déficit cognitivo (BROWN, 2005). Adicionalmente, reativações da forma ocular da toxoplasmose são comuns, especialmente na América do Sul, devido à grande diversidade genotípica do parasito nesta região, associada a maior frequência de casos de coriorretinite recidivantes (BUTLER et al., 2013). As drogas disponíveis para o tratamento não são eficazes contra os bradizoítos na fase crônica da infecção e possuem muitos efeitos colaterais. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar os padrões histopatológicos de cérebros e olhos de camundongos infectados pela cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*, em fase crônica da infecção.

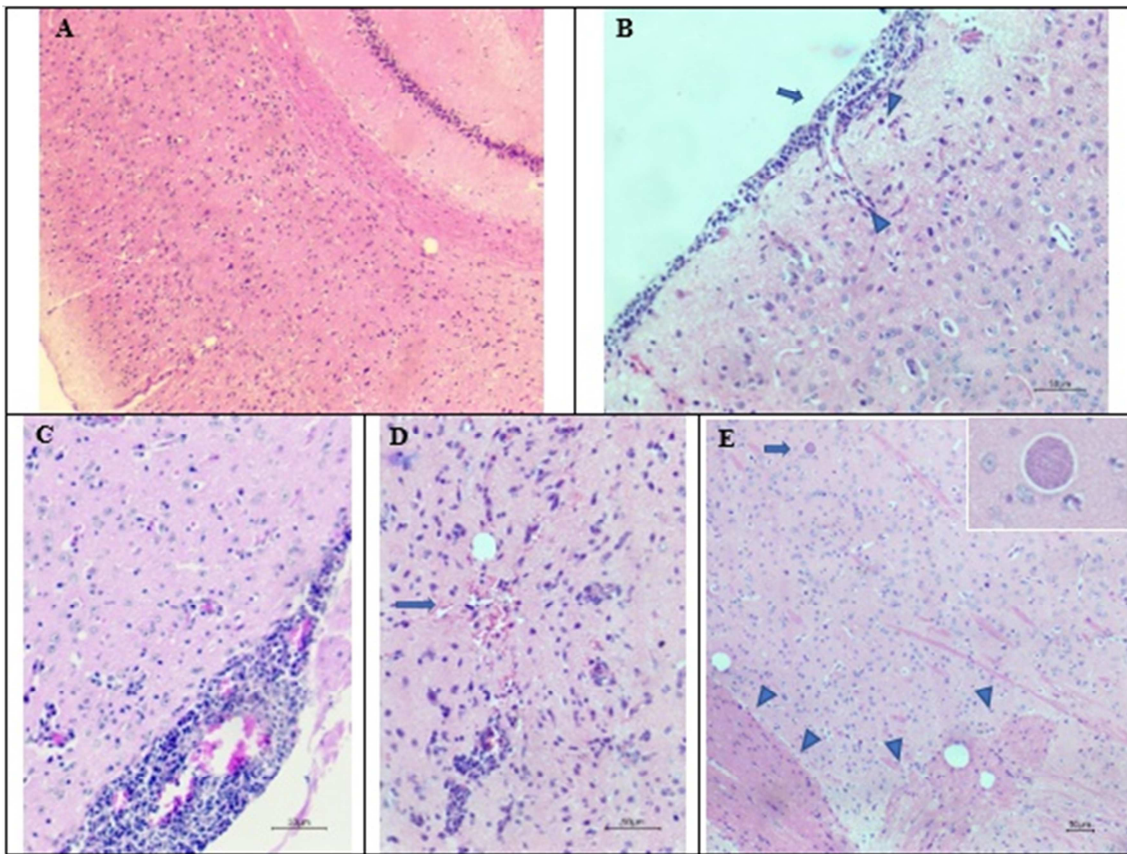
## Materiais e métodos

Camundongos Balb/c com idade entre 21 a 35 dias, foram divididos em dois grupos, de 7 animais cada, sendo um grupo controle negativo (não infectado) e o outro grupo infectado, via gavagem, com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* (Tipo II, cistogênica de baixa virulência). Os animais foram monitorados por 60 dias para cronificação da infecção. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da UEM (protocolo nº 5654290317). Após o período de 60 dias de infecção, os animais foram anestesiados com isofurano e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, conforme as normas da Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018. Foram coletados os cérebros e olhos dos animais para a realização dos exames histopatológicos os quais foram fixados em formaldeído 10% tamponada por 18 horas e transferidos para solução de álcool 70% para conservação. Os tecidos foram submetidos a processamento histológico, emblocados em parafina e cortados em micrótoomo (5µm), de forma semi-seriada. Quatro cortes de cada órgão/camundongo foram posicionados sobre lâminas de vidro e posteriormente corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Avaliação microscópica foi feita para se observar a presença de alterações histopatológicas como presença de focos inflamatórios, necrose tecidual, cistos, congestão, hemorragia.

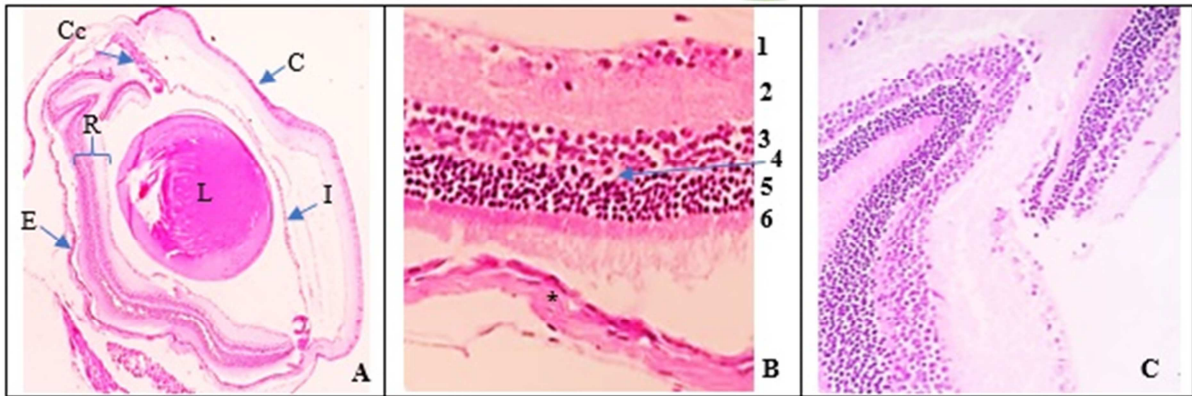
## Resultados e Discussão

Na análise dos cortes histológicos do cérebro dos animais infectados foram observados poucos cistos de *T. gondii*, isolados em alguns cortes. Nas seções do cérebro coradas com HE dos camundongos com infecção experimental crônica foram observadas alterações histopatológicas e sinais de inflamação, incluindo meningoencefalite (Figura 1B). Além disso, manguitos perivascularares, congestão vascular, hemorragia e cistos de *T. gondii* foram observados no cérebro (Figura 1C-E). Áreas de gliose consolidadas também foram observadas indicando reparo tecidual para lesões antigas, semelhante aos achados de Nishi et al. 2019 (Figura 1E). O grupo controle não mostrou evidências de lesão e inflamação tecidual (Figura 1A). Com este experimento foi possível observar que as lesões cerebrais permanecem intensas, mesmo na fase crônica da infecção, anteriormente considerada latente. Neste estudo os camundongos permaneceram infectados por mais de 60 dias de modo que a cronificação da infecção estava bem estabelecida.

Na análise dos olhos dos camundongos foi possível observar as membranas oculares íntegras na maioria das amostras, bem como as camadas da retina (Figura 2). No entanto, nenhum cisto ou alteração histopatológica visível foi observada nos olhos. Em modelos experimentais, linhagens de camundongos como Balb/c e NMRI tendem a ser mais resistentes à infecção ocular pelo *T. gondii* e podem não desenvolver sinais ou sintomas aparentes. Dukaczewska et al. (2015) demonstraram alterações patológicas oculares na infecção experimental utilizando a cepa ME-49, tanto em linhagens resistentes (NMRI) como susceptíveis de camundongos (C57BL/6), sendo mais intensas nessa última. Estes autores analisaram os tecidos após 21 dias de infecção. Em nosso estudo, além de utilizarmos a linhagem Balb/c, possíveis lesões oculares podem ter se resolvido devido ao período mais longo de infecção. Estudos com outras cepas que apresentam maior tropismo ocular e diferentes técnicas de coloração poderão ser realizados na tentativa de caracterizar tais alterações.



**Figura 1.** Imagens de cortes histológicos de cérebros de camundongos. **A** – Tecido cerebral normal (grupo controle). **B a E** – Infecção crônica pela cepa ME-49 de *T. gondii*. **B** – Meningite (seta) com células inflamatórias infiltrando o tecido cerebral (cabeça de seta). **C** – Infiltrado inflamatório difuso, vaso congestionado e manguito perivascular com predominância de células mononucleares. **D** – Presença de focos inflamatórios, células inflamatórias distribuídas diffusamente no tecido e hemorragia (seta). **E** – Cisto de *T. gondii* (seta e detalhe) e áreas de gliose evidenciando reparo tecidual de lesão antiga (cabeças de seta).



**Figura 2.** **A** – Olho de camundongo não infectado (controle), C – córnea, I – íris, L – lente cristalino, Cc – Corpo ciliar, R – Retina, E – esclera. **B** – Camadas da retina (grupo controle), 1 – Lâmina gâglionar; 2 – Lâmina plexiforme interna; 3 – lâmina nuclear interna; 4 – Lâmina plexiforme externa; 5 – Lâmina nuclear externa; 6 – camada bacilar; (\*) coróide. **C** – Corte mostrando partes da retina, sem alterações (grupo infectado).

## Conclusões

A resposta inflamatória e as lesões teciduais permanecem ativas nos cérebros dos animais infectados cronicamente pela cepa ME-49 de *T. gondii*, no modelo experimental estudado, mostrando que a infecção crônica, não é latente e tem efeitos lesivos ao hospedeiro. No entanto, neste mesmo modelo não foi possível observar alterações histopatológicas nas membranas oculares.

## Referências

- BROWN, A. S. et al. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 4, p. 767-773, 2005.
- BUTLER, N.J.; FURTADO, J.M.; WINTHROP, K.L.; SMITH, J.R. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. **Clin Exp Ophthalmol**. v. 41, n. 1, p. 95-108, 2013. doi: 10.1111/j.1442-9071.2012.02838.x.
- DUKACZEWSKA, A.; TEDESCO, R.; LIESENFELD, O.; Experimental models of ocular infection with *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5 (2015) n. 4, pp. 293–305.
- NISHI, L.; SANTANA, P. L.; EVANGELISTA, F. F.; et al. Rosuvastatin reduced brain parasite burden in a chronic toxoplasmosis in vivo model and influenced the neuropathological pattern of ME-49 strain. **Parasitology**, 2019. doi.org/10.1017/S0031182019001604.
- REMINGTON, J.S. et al. **Infectious disease of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: Elsevier Saunders 7th ed., p. 918-1041, 2011.