

3

Toxoplasma gondii e Toxoplasmose

Marcelo Urbano Ferreira

- ▶ *Toxoplasma*, 24
- ▶ Aspectos biológicos, 25
- ▶ Aspectos clínicos, 28
- ▶ Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, 29
- ▶ Tratamento da toxoplasmose, 29
- ▶ Prevenção e controle da toxoplasmose, 30
- ▶ Bibliografia, 31
- ▶ Leitura sugerida, 32



A toxoplasmose é uma infecção cosmopolita. Em algumas áreas da Europa, da África e da América Latina, observam-se frequentemente taxas de soroprevalência acima de 80% na população adulta. Em termos globais, estima-se que entre um terço e um quarto da população mundial esteja infectada. Como problema clínico e de saúde pública, a grande importância da toxoplasmose decorre de infecções em gestantes e pacientes imunocomprometidos, que podem produzir complicações graves e potencialmente fatais.

► *Toxoplasma*

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez em 1908. Charles Nicolle e Louis Manceaux encontraram-no em um *gundi*, pequeno roedor silvestre africano semelhante a um hamster (*Ctenodactylus gundi*), comum no sul da Tunísia. No mesmo ano, Alfonso Spendore relatou a presença do parasito no Brasil, em coelhos de laboratório (Innes, 2009). Entretanto, em ambos os casos o parasito foi erroneamente identificado como uma leishmânia.

Toxoplasma é um parasito eurixeno, tradicionalmente classificado no subgrupo Apicomplexa (como os plasmódios e diversos coccídeos intestinais), que infecta mamíferos e aves. Na classificação mais recente, os protozoários do subgrupo Apicomplexa estão classificados no supergrupo Chromoalveolata, grupo Alveolata (Adl *et al.*, 2005). Nos 30 anos seguintes à descoberta de *T. gondii*, organismos semelhantes a ele foram descritos em diversos hospedeiros, especialmente em aves, muitas vezes recebendo nomes distintos. O primeiro caso de infecção humana foi descrito em 1937. No entanto, por mais de meio século permaneceram desconhecidos aspectos fundamentais de seu ciclo vital e seu modo de transmissão. Até meados dos anos 1960, sabia-se que a infecção podia ser adquirida pela ingestão de carne crua ou malpassada, mas não se podia explicar a alta prevalência de toxoplasmose em herbívoros. William Hutchison descobriu, em 1965, oocistos de *Toxoplasma* nas fezes de gatos e demonstrou que esses estágios eram capazes de infectar camundongos.

Somente em 1970 demonstrou-se a ocorrência de uma fase de reprodução sexuada, no epitélio intestinal de gatos e outros felinos que resulta na produção dos oocistos eliminados por felinos em suas fezes (Innes, 2009).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que invade e se multiplica em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. Há três estágios infectantes: *taquizoítos*, *bradizoítos* e *esporozoítos*. Os *taquizoítos* são alongados e encurvados, em forma de arco (*toxon* = arco, em grego) ou de crescente (Figura 3.1A). Seu núcleo tem localização central. Multiplicam-se rapidamente no interior das células. Estas, repletas de taquizoítos, são algumas vezes chamadas de *pseudocistos* (Figura 3.1B). Depois de alguns dias ou semanas de multiplicação intensa, os taquizoítos convertem-se em formas quiescentes conhecidas como *bradizoítos*, que se multiplicam lentamente no interior de cistos teciduais (Figura 3.1C). Finalmente, os *esporozoítos* desenvolvem-se no interior dos oocistos, ao final da divisão meiótica, sendo responsáveis pela disseminação do parasito no ambiente externo.

À microscopia eletrônica, observam-se, nos estágios infectantes de *T. gondii* e dos demais protozoários do subgrupo Apicomplexa, as estruturas que compõem o *complexo apical*. São cinco estruturas distintas (Figura 3.2): (a) os *anáis polares*, estruturas anelares elétron-densas localizadas no polo apical da célula; (b) o *conoide*, uma rede de microtúbulos enovelados envolta pelos anéis polares; (c) os *micronemas*, organelas tubulares alongadas situadas na porção anterior da célula; (d) as *roptrias*, organelas vesiculares ou saculares que se estendem do conoide até a porção medial da célula; e (e) uma rede de *microtúbulos subpeliculares* (não representada na Figura 3.2), que percorre longitudinalmente a célula desde o anel polar até seu polo posterior. Essas estruturas desempenham papel fundamental durante a adesão e invasão, pelo parasito, da célula hospedeira. Roptrias e micronemas secretam substâncias, algumas das quais antigênicas, que facilitam a penetração na célula hospedeira; as demais estruturas parecem fundamentais para assegurar a motilidade do parasito. Outra estrutura típica de *T. gondii* e de outros parasitos do grupo Apicomplexa, visível sob microscopia eletrônica, é a organela denominada *apicoplasto*, que alberga um genoma circular de 35.000 pares de bases. Acredita-se que essa organela com múltiplas membra-

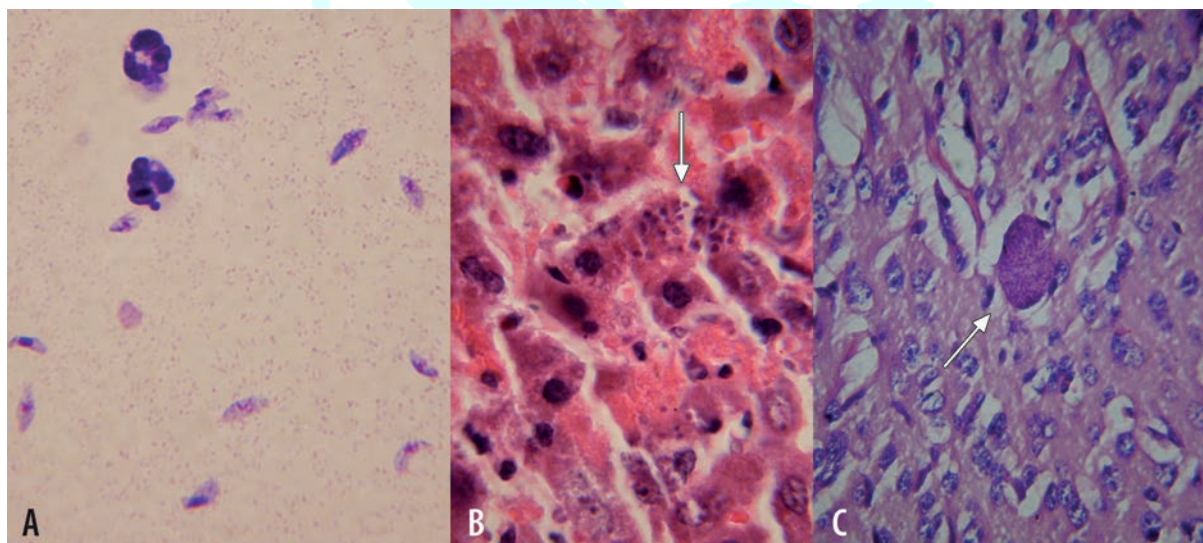


Figura 3.1 Estágios evolutivos de *Toxoplasma gondii*. **A.** Taquizoítos no exsudato peritoneal de camundongo infectado (coloração: Giemsa). **B.** Corte histológico de fígado mostrando células infectadas por dezenas de taquizoítos, formando *pseudocistos* (seta) (coloração: hematoxilina-eosina). A seta aponta uma dessas células infectadas. **C.** Corte histológico de cérebro mostrando cisto tecidual que contém numerosos bradizoítos (coloração: hematoxilina-eosina). (Fotografias cedidas por Marcelo Urbano Ferreira.)

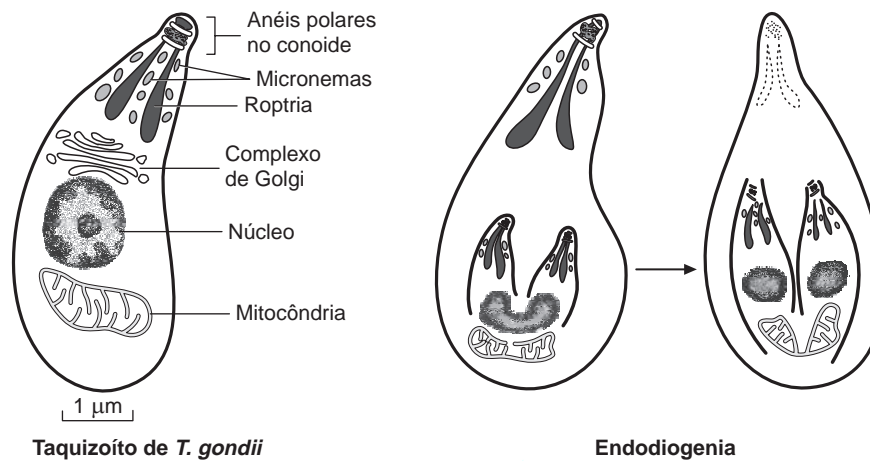


Figura 3.2 Representação esquemática dos taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e do processo de reprodução assexuada por endodiogenia.

nas, localizada na porção apical do parasito, seja um vestígio de cloroplasto, adquirido mediante simbiose com algas verdes. Sua função permanece desconhecida, mas credita-se ao apicoplasto o fato de os parasitos do grupo Apicomplexa, diferentemente dos demais eucariotos, serem sensíveis a antibióticos (Soldati, 1999). A clindamicina, por exemplo, é um antibiótico macrolídeo que inibe a maquinaria de tradução de células procarionóticas; seu efeito contra *Toxoplasma* e os plasmódios tem como alvo os ribossomos do apicoplasto. O genoma nuclear de *Toxoplasma* compreende 14 cromossomos, com um total de 65 a 70 milhões de pares de bases (Boothroyd, 2009).

► Aspectos biológicos

Os taquizoítos multiplicam-se por *endodiogenia*, processo de reprodução assexuada que resulta na formação de duas células-filhas no interior de uma célula-mãe, que finalmente se degenera (Figura 3.2). Novos taquizoítos são liberados a cada 6 a 9 h, quando se rompe a célula hospedeira repleta de parasitos, algumas vezes chamada de *pseudocisto*. Os taquizoítos liberados podem invadir células vizinhas ou se disseminar por via hematogênica ou linfática. A célula parasitada pode eventualmente ser envolvida por uma membrana espessa, formando um *cisto tecidual* (Figura 3.1C e D) com diâmetro variando entre 5 e 70 µm. Em seu interior, encontram-se desde algumas dezenas até milhares de parasitos que continuam se reproduzindo por endodiogenia, porém de modo muito lento. São conhecidos como *bradizoítos*. Alojados no interior de cistos em células epiteliais, musculares e nervosas, entre outras, os bradizoítos permanecem viáveis longos períodos. O parasito desenvolveu mecanismos eficientes para inibir a eliminação da célula hospedeira por apoptose, entre os quais a inibição de caspases e da expressão do fator de transcrição NFκB. Em geral, a reativação das infecções latentes ocorre na vigência de comprometimento imunitário do hospedeiro. Por outro lado, os cistos intactos não despertam resposta inflamatória no hospedeiro. Os carnívoros e onívoros podem adquirir toxoplasmose mediante a ingestão de carne com cistos contendo bradizoítos, que invadem células do intestino do novo hospedeiro e se transformam em taquizoítos.

Os mecanismos de conversão de taquizoítos em bradizoítos e vice-versa são pouco conhecidos (Skarish *et al.*, 2010). Os

taquizoítos podem converter-se em bradizoítos em decorrência da ativação da imunidade celular do hospedeiro. A produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, por exemplo, é um dos estímulos para esta conversão. Outros estímulos são variações de pH, choque térmico e inibição de enzimas mitocondriais (Lyons *et al.*, 2002). Os bradizoítos reconvertem-se em taquizoítos na ausência de estímulos como interferona-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF) α e interleucina 12 (Lyons *et al.*, 2002). Entretanto, também é possível que a resposta imune do hospedeiro tenha papel limitado na conversão de taquizoítos em bradizoítos. Segundo essa hipótese, os bradizoítos continuamente liberados dos cistos transformar-se-iam em taquizoítos no ambiente extracelular, independentemente de qualquer estímulo externo, ativando o sistema imune (Figura 3.4B). Os hospedeiros imunocompetentes seriam capazes de eliminar os taquizoítos extracelulares. Assim, a infecção seria mantida sob forma latente por vários anos não porque não haveria taquizoítos sendo produzidos, mas porque eles seriam rapidamente destruídos pelo hospedeiro imunocompetente (Denkers & Gazzinelli, 1998).

Embora ambos os estágios sejam morfologicamente semelhantes e capazes de invadir diversos tipos de células hospedeiras, taquizoítos e bradizoítos diferem quanto ao metabolismo e à composição antigênica. Taquizoítos e bradizoítos têm, por exemplo, isoformas distintas de diversas enzimas, como a enolase e a lactato desidrogenase (Boothroyd, 2009). As diferenças antigênicas não chegam a ser surpreendentes, pois permitem a sobrevivência dos bradizoítos diante da imunidade adquirida contra taquizoítos na fase inicial da infecção. Das principais proteínas de superfície envolvidas no processo de invasão de células por taquizoítos, *SAG1* (também conhecida como *p30*) e *SAG3* (*p43*), somente a segunda é expressa na superfície de bradizoítos (Boothroyd *et al.*, 1998). Estes, por outro lado, expressam proteínas de superfície estágio-específicas, como *SAG2C*, *SAG2D* e *SAG4* (Lyons *et al.*, 2002). Portanto, os bradizoítos desenvolveram um processo de reconhecimento, adesão e invasão da célula hospedeira que prescindem de *SAG1*, a principal molécula a desempenhar este papel em taquizoítos (Mineo & Kasper, 1994). Os antígenos de superfície de taquizoítos e bradizoítos são, predominantemente, membros de uma grande família de proteínas relacionadas com a *SAG1*, conhecidas como *SAG1-related sequence (SRS) proteins*. Entretanto, a abundância relativa de proteínas SRS em diferentes estágios do parasito é amplamente variável, sugerindo que cada proteína desempenhe um papel biológico distinto em cada estágio.

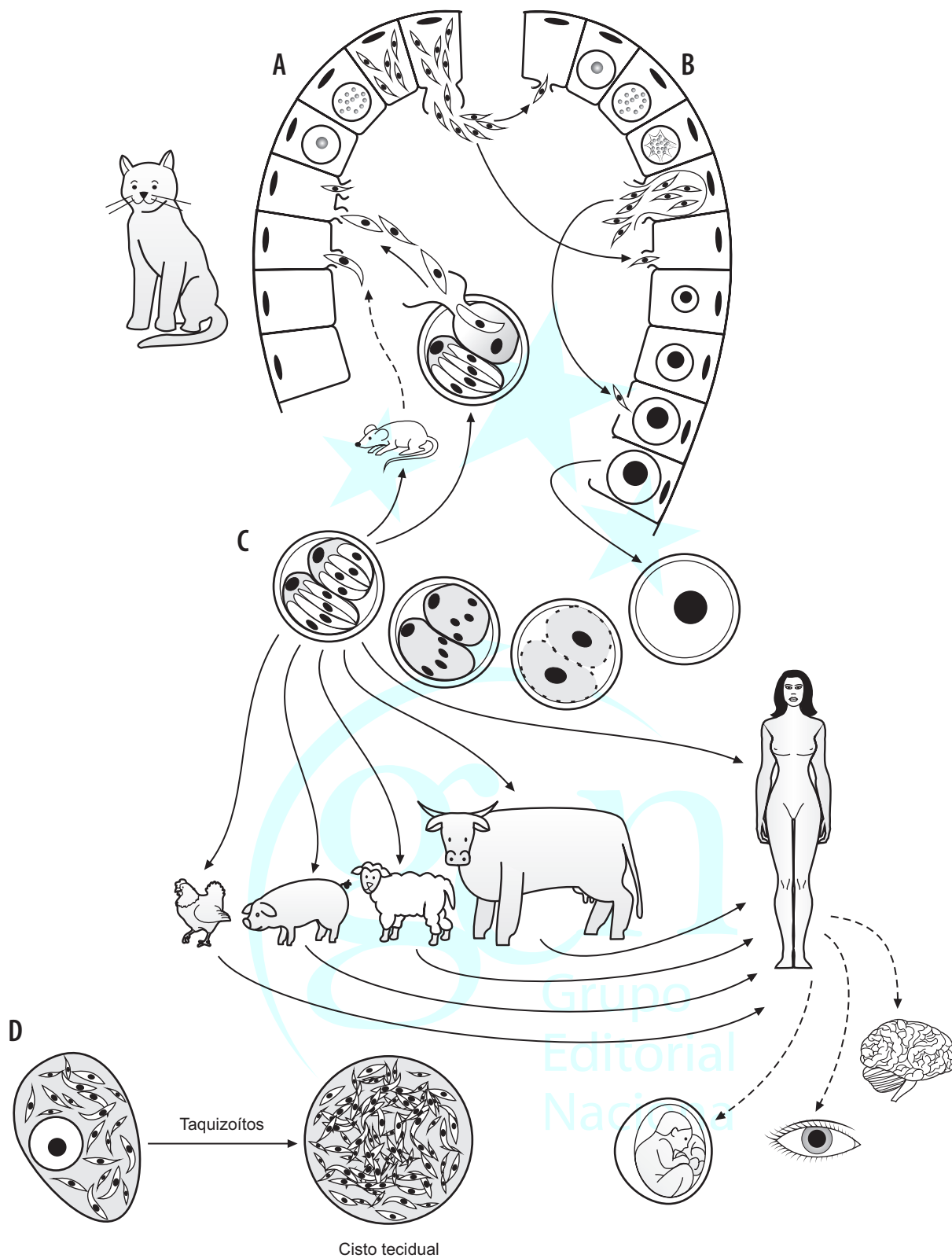


Figura 3.3 Ciclo vital de *Toxoplasma gondii*. São representadas as etapas de esquizogonia (A) e gametogonia (B), que ocorrem no epitélio intestinal do gato, de esporogonia (C), que ocorre no solo, bem como o ciclo assexuado envolvendo taquizoitos e bradizoitos (D) que ocorre em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo o homem. Representam-se também os principais sítios de reativação de toxoplasmose no homem (cérebro e olho), bem como a passagem transplacentária de taquizoitos, resultando em infecção congênita.

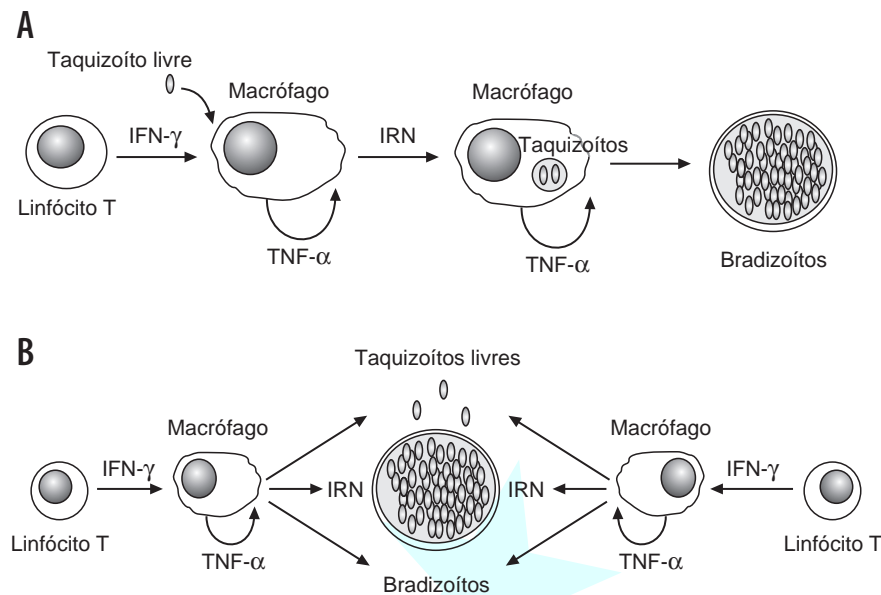


Figura 3.4 Hipóteses sobre o controle da replicação de taquizoítos e de sua conversão em bradizoítos em hospedeiros imunocompetentes. **A.** Segundo a hipótese representada nesta figura, os taquizoítos convertem-se em bradizoítos em decorrência da ativação da imunidade celular do hospedeiro. **B.** Esta hipótese alternativa postula que a resposta imune do hospedeiro regula a multiplicação dos taquizoítos, mas é incapaz de induzir a transformação de taquizoítos em bradizoítos ou eliminar os bradizoítos no interior dos cistos. (Adaptada de: Denkers, E. Y. & Gazzinelli, R. T. 1998. Regulation of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 569-588.)

As etapas de invasão celular são essencialmente as mesmas para taquizoítos e bradizoítos (Dubremetz *et al.*, 1998). Ocorre inicialmente o contato entre o ápice do parasito, onde se encontra o complexo apical, e a superfície da célula a ser invadida. A internalização do parasito ocorre neste ponto de contato entre as duas células, sendo acompanhada de exocitose do conteúdo das roptrias e dos micronemas. Entre as principais adesinas do parasito liberadas pelos micronemas está a molécula conhecida como MIC2, que conecta as fibras de actina e miosina do parasito à sua superfície e, provavelmente, à membrana da célula do hospedeiro. Algumas proteínas secretadas pelas roptrias, como a serina-treonina quinase ROP18, são altamente polimórficas. Parasitos que expressam variantes alélicas distintas dessa proteína diferem quanto à virulência em roedores. A análise da progênie de cruzamentos genéticos experimentais mostrou que ROP18 e outras proteínas de roptrias, como ROP16, são importantes determinantes de virulência em *T. gondii* em roedores (Saeij *et al.*, 2005).

O processo ativo de invasão de *T. gondii* resulta na invaginação da membrana da célula hospedeira, dependente da ação dos filamentos de actina do parasito. Ao final da invasão, o parasito encontra-se em um vacúolo parasitóforo, no citoplasma da célula hospedeira. O revestimento proteico desses vacúolos origina-se das roptrias e dos micronemas do parasito. A membrana do vacúolo parasitóforo funciona como peneira molecular, que possibilita somente a entrada de pequenas moléculas como açúcares, nucleotídeos, aminoácidos e outros nutrientes. O fato de *T. gondii* invadir uma ampla gama de células implica a existência de um receptor celular altamente conservado ou a capacidade de utilizar diversos receptores celulares. Uma estratégia indireta de interação reside na capacidade dos taquizoítos se revestirem de laminina, ligando-se então aos múltiplos receptores para esta molécula existentes nas células hospedeiras.

A escolha do receptor para a entrada na célula determina o destino intracelular do parasito. Em geral, *T. gondii* é capaz de

impedir a fusão do vacúolo que ele habita com os lisossomos da célula hospedeira, inibindo desta maneira a acidificação dos vacúolos e a sua destruição pelas enzimas digestivas lisossômicas. Compartilha este mecanismo de sobrevivência com outros microrganismos intracelulares, como as micobactérias, *Salmonella*, *Legionella* e *Chlamydia*. No entanto, quando taquizoítos opsonizados entram em macrófagos através dos receptores para a fração conservada dos anticorpos (Fc) ou de complemento, ocorrem a formação de fagolisossomos e a morte do parasito (Bogdan & Röllinghoff, 1999). Admite-se que o fato de o vacúolo parasitóforo ser revestido por proteínas provenientes das roptrias e dos micronemas do parasito dificulte a fusão de lisossomos.

No ciclo natural, *gatos e outros felinos* alimentam-se frequentemente de roedores que contêm cistos teciduais repletos de bradizoítos. Menos de dez bradizoítos são suficientes para a infecção de um gato não imune. No epitélio intestinal dos felinos, *T. gondii* realiza um ciclo assexuado (*esquizogonia*) (Figura 3.3A) e um ciclo sexuado em que se formam gametas (*gametogonia*) que se fundem, formando um zigoto que se encista (Figura 3.3B). Deste modo, os felinos servem como hospedeiros definitivos para o parasito. Em seu lúmen intestinal, a parede dos cistos teciduais é digerida, liberando os bradizoítos. Estes penetram as células epiteliais do intestino delgado e sofrem várias etapas de divisão celular, resultando na formação de uma célula multinucleada conhecida como *esquizonte*. Ao romper-se, a célula hospedeira libera dezenas de *merozoítos*, que invadirão novas células e sofrerão novo ciclo de esquizogonia. Depois de alguns ciclos, os merozoítos podem originar formas sexuadas, os *macrogametócitos* (femininos) e *microgametócitos* (masculinos). A fertilização dos macrogametócitos pelos microgametócitos, sempre no interior de células epiteliais, dará origem aos oocistos. Com a ruptura das células hospedeiras, os oocistos caem no lúmen intestinal e são eliminados nas fezes dos felinos. Entre a infecção com cistos teciduais com bradizoítos e a primeira eliminação de oocistos nas fezes decorrem 3 a 10 dias.

Os gatos infectam-se ainda quando filhotes e adquirem imunidade contra novas infecções; por isso, geralmente eliminam oocistos durante um curto período de tempo, uma única vez em suas vidas. Considera-se que *T. gondii* também seja capaz, nos felinos, de invadir uma ampla variedade de células nucleadas e multiplicar-se por endodiogenia, como ocorre nos demais hospedeiros (Figura 3.3D).

Os oocistos recém-eliminados são subsféricos ou esféricos e medem 10 μm por 12 μm . Requerem entre um e 5 dias para sua esporulação no solo (processo conhecido como *esporogonia*), que resulta na formação de dois esporocistos em seu interior, cada um contendo quatro esporozoítos (Figuras 3.3C e 3.5). Ao final deste período, os oocistos tornam-se infectantes; têm agora formato elipsoide e medem cerca de 11 por 13 μm . Os oocistos permanecem infectantes no solo por longos períodos, chegando a 12-18 meses. Em condições experimentais, os oocistos sobrevivem a temperaturas em torno de 4°C por até 54 meses e ao congelamento a -10°C por até 106 dias. Seu revestimento impermeável os torna resistentes a desinfetantes e outros agentes químicos. Entretanto, os oocistos deixam de ser infectantes quando expostos a temperaturas de 55 a 60°C por 1 ou 2 min.

Os herbívoros adquirem toxoplasmose mediante a ingestão de oocistos esporulados (Figuras 3.3C e 3.5); os demais hospedeiros, incluindo os felinos e o homem, podem adquirir a infecção tanto pela ingestão de oocistos contendo esporozoítos como pela ingestão de cistos contendo bradizoítos. Entretanto, os camundongos requerem uma dose infectante substancialmente maior que os felinos, da ordem de 1.000 bradizoítos, para infectarem-se com esses estágios. Quando os felinos se infectam ingerindo oocistos, entre 20 e 30 dias são necessários para os primeiros oocistos serem eliminados. Somente ocorre infecção patente em um terço dos felinos infectados por esta via; acredita-se que a dose infectante mínima para felinos seja da ordem de 1.000 oocistos, muito superior àquela necessária para a infecção de roedores, suínos e outros hospedeiros (Elmore *et al.*, 2010). Os bradizoítos provenientes dos cistos teciduais e os esporozoítos provenientes dos oocistos penetram nas células do epitélio intestinal dos hospedeiros intermediários, inclusive do homem, onde se multiplicam nas próximas 24 h por endodiogenia (Figura 3.2). Os taquizoítos resultantes

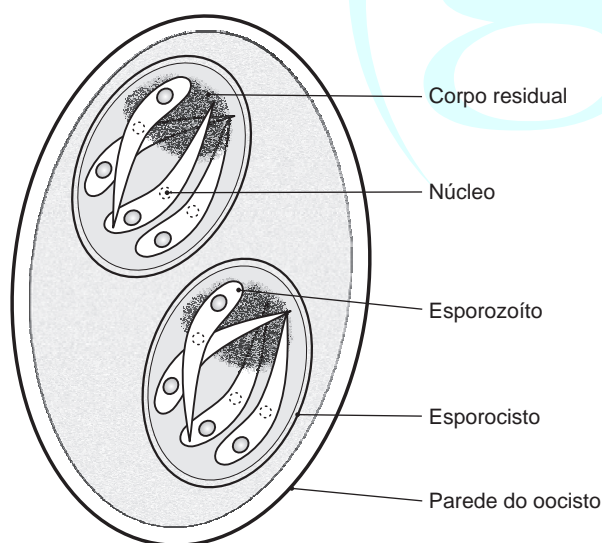


Figura 3.5 Representação esquemática dos oocistos de *Toxoplasma gondii*. (Adaptada de: Neva, F. A. & Brown, H. W. 1994. *Basic Clinical Parasitology*, 6ª edição. Norwalk: Appleton & Lange.)

disseminam-se para os linfonodos mesentéricos e, a seguir, para órgãos distantes mediante a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos.

Outra via importante de infecção para o homem é a passagem transplacentária de taquizoítos durante a infecção aguda em gestantes. Os felinos, os ovinos e os roedores também se infectam por via transplacentária (Hide *et al.*, 2009). O risco de toxoplasmose congênita é maior em infecções contraídas no terceiro trimestre da gestação, mas o risco de malformações fetais graves, uma vez contraída a infecção, tende a ser tanto maior quanto mais precoce for a gestação. Os taquizoítos livres podem ultrapassar a barreira placentária por migração ativa paracelular, sem romper a integridade do epitélio, ou por uma travessia transcelular. Os taquizoítos podem também explorar as vias normais de migração das células hospedeiras, como os leucócitos. Os leucócitos parasitados por taquizoítos, ao aderirem ao endotélio de pequenos vasos, facilitam a passagem do parasito pela barreira celular. Esse último mecanismo, conhecido como cavalo de Troia, permite a passagem do parasito por outras barreiras naturais, como a hematoliquórica e a intestinal. A infecção por *T. gondii* e outros patógenos intracelulares, como *Salmonella typhimurium*, pode aumentar significativamente a motilidade de algumas células hospedeiras, como células dendríticas e macrófagos, facilitando a sua disseminação pelo organismo (Lambert & Barragan, 2010).

► Aspectos clínicos

Em pacientes imunocompetentes, a maioria das infecções primárias adquiridas após o nascimento (ou seja, excluindo as infecções congênitas) é assintomática. Em menos de 10% dos casos ocorre um quadro autolimitado de linfadenopatia febril com linfocitose, com período de incubação entre quatro e 21 dias. Essa forma clínica, conhecida como linfoglandular, caracteriza-se por linfadenomegalia localizada ou generalizada, eventualmente unilateral, com febre de intensidade variável, mas geralmente baixa. Podem ocorrer também hepatoesplenomegalia, mialgias e artralgias, com resolução espontânea dos sintomas em algumas semanas. Mais raramente ocorre uma infecção aguda disseminada, acompanhada de exantema cutâneo, febre alta e prostração, em que pode haver meningoencefalite, hepatite, pneumonite e miocardite. As infecções primárias podem resultar em comprometimento ocular, geralmente uma coriorretinite unilateral.

Em pacientes imunocomprometidos, particularmente entre aqueles infectados pelo HIV, ocorre frequentemente a reativação de infecções crônicas latentes. Estima-se em 10 a 50% a possibilidade de reativação de infecção entre os pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) que apresentem infecções latentes por *T. gondii*. O sítio mais comum de reativação é o sistema nervoso central, resultando em um quadro de encefalite caracterizado por febre, letargia e alteração do nível de consciência em que frequentemente ocorrem convulsões e déficits motores focais. Em exames de imagem encontra-se uma ou múltiplas lesões nodulares com padrão típico, geralmente hiperdensas e com edema ao redor. A reativação de infecções oculares latentes ocorre tipicamente em indivíduos imunocompetentes, mas pouco se sabe sobre os possíveis fatores de risco associados a esta reativação.

A transmissão congênita de toxoplasmose pode resultar em quadros clínicos de gravidade variável. Algumas crianças

apresentam a síndrome típica, em que se observam calcificações intracranianas, coriorretinite (geralmente grave e bilateral), hidrocefalia ou microcefalia, alterações psicomotoras e convulsões. Os sintomas oculares variam segundo a idade dos pacientes; geralmente incluem diminuição da acuidade visual, podendo haver nistagmo, estrabismo, dor ocular e fotofobia, entre outros. O quadro clínico da toxoplasmose ocular compreende uma retinite, muitas vezes associada a coroidite, irite e uveíte anterior. Pode ocorrer também comprometimento visceral e muscular. Acredita-se que 5 a 15% das infecções congênicas resultem em aborto e 8 a 10% resultem em lesões graves, oculares ou do sistema nervoso central. As demais crianças infectadas apresentam distúrbios visuais leves ou moderados, ou são completamente assintomáticas ao nascer. Entre as crianças assintomáticas, sequelas neurológicas ou oculares podem desenvolver-se mais tarde, até mesmo na idade adulta.

A toxoplasmose, congênita ou adquirida, pode ser um fator desencadeante de esquizofrenia e de diversas alterações psicomotoras e comportamentais (Henríquez *et al.*, 2009). Em ratos experimentalmente infectados, por exemplo, observam-se comportamentos de risco que podem facilitar sua captura por predadores, especialmente os gatos, aumentando as chances de transmissão do parasito (Lamberton *et al.*, 2008).

► Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

O isolamento do agente e a detecção de seus produtos, como ácidos nucleicos ou antígenos, são relativamente difíceis. Durante a fase aguda da infecção, a pesquisa de *T. gondii* pode ser feita em amostras de creme leucocitário, coletado após a centrifugação do sangue na interface entre as hemácias e o plasma. Os esfregaços preparados com o creme leucocitário podem ser examinados ao microscópio a fresco ou após coloração com Giemsa. A sensibilidade da técnica é de aproximadamente 90%, variando de acordo com a parasitemia. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada na pesquisa de DNA de *T. gondii* no líquido amniótico e no líquido cefalorraquidiano. *T. gondii* pode ser ocasionalmente isolado pela inoculação de amostras clínicas (creme leucocitário do sangue venoso, sedimento de líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico etc.) no peritônio de camundongos. Ao final de 1 a 3 semanas, pesquisam-se taquizoítos no líquido peritoneal (Figura 3.1A) ou cistos no cérebro (Figura 3.1C) ou outros órgãos. Uma alternativa de menor sensibilidade consiste em semear amostras clínicas em culturas de células. Após 4 a 5 dias de cultura, as células devem ser coradas com Giemsa e examinadas ao microscópio, para a busca de taquizoítos intracelulares ou livres no meio de cultura. Geralmente são observados pontos de necrose nas células parasitadas.

Na prática clínica, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose primária baseia-se geralmente na pesquisa de anticorpos específicos. Os testes sorológicos mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a hemaglutinação. Diferentes padrões de resposta de anticorpos caracterizam a fase aguda (*perfil I*), a fase de transição (*perfil II*) e a fase crônica da infecção (*perfil III*). O perfil I caracteriza-se pela presença de anticorpos das classes IgM, IgA, IgE e IgG contra o parasito. Caracteriza-se por altos títulos de anticorpos de classe IgG ou rápida elevação de títu-

los, ao se obterem amostras pareadas com intervalo de 2 semanas. Esses anticorpos IgG de fase aguda são em geral de baixa avidéz, característica que pode ser avaliada em ELISA com o acréscimo de agentes caotrópicos. No perfil de transição (*perfil II*), encontram-se altos títulos de anticorpos de classe IgG, com avidéz crescente, na ausência das classes IgA e IgE. Anticorpos IgM podem estar presentes em baixos títulos. Este perfil é gradativamente substituído, em algumas semanas ou meses, por aquele encontrado em infecções crônicas ou latentes (*perfil III*), que se mantém por décadas. Encontram-se aqui baixos títulos de anticorpos IgG de alta avidéz na ausência de anticorpos das demais classes.

A infecção aguda, acompanhada ou não de sintomas, é diagnosticada com a detecção do perfil I. Em certas circunstâncias clínicas, especialmente em gestantes, a diferenciação entre infecções agudas e crônicas é essencial. Não há risco de transmissão congênita de toxoplasmose em gestantes com perfil III, desde que elas sejam imunocompetentes. Entretanto, as gestantes soronegativas devem ser acompanhadas durante a gravidez, para a detecção precoce de eventual soroconversão. Preconiza-se, em geral, a realização de testes sorológicos sequenciais em todas as gestantes sem anticorpos IgG ou IgM específicos. Caso haja suspeita clínica ou sorológica (detecção de IgM sem níveis detectáveis de IgG) de infecção durante a gestação, o exame sorológico é repetido em 3 semanas.

O diagnóstico laboratorial de toxoplasmose congênita tem sido realizado, em laboratórios de referência, pela pesquisa de DNA de *T. gondii* no líquido amniótico com o uso da PCR. O alvo mais empregado para amplificação é o gene B1, uma sequência altamente repetitiva (Sensini, 2006). O isolamento do parasito, a partir de amostras de líquido amniótico, pode também ser útil. A pesquisa de anticorpos no sangue fetal, no entanto, tem papel limitado pela presença de anticorpos maternos. No recém-nascido, o isolamento do parasito em amostras de creme leucocitário apresenta sensibilidade de cerca de 90%. Títulos de anticorpos elevados no recém-nascido, na vigência de um perfil I ou II na mãe, são altamente sugestivos de toxoplasmose congênita.

Em pacientes com comprometimento imunológico, como aqueles infectados pelo HIV, a análise de perfis sorológicos tende a ser pouco confiável. É comum encontrar, por exemplo, reativação de toxoplasmose em pacientes com AIDS que apresentam um típico perfil III. Nestes casos, o isolamento do parasito e a detecção de seu DNA por PCR podem ser alternativas úteis, ainda que de baixa sensibilidade. Nestes pacientes, o diagnóstico de toxoplasmose, que comumente acomete o sistema nervoso central, é geralmente feito com base no quadro clínico e nos exames de imagem. Na toxoplasmose ocular, títulos de anticorpos IgG elevados no humor aquoso são altamente sugestivos do diagnóstico. Em geral, esses anticorpos são de baixa avidéz, ao contrário daqueles encontrados simultaneamente no soro do paciente.

► Tratamento da toxoplasmose

O tratamento das infecções primárias sintomáticas e de reativações é feito com a combinação sinérgica de sulfadiazina (dose para adultos: 4 g/dia dividida em quatro tomadas) e pirimetamina (dose para adultos: 75 mg no primeiro dia, seguidos de 25 mg/dia) por 4 a 6 semanas, acompanhada de 10 a 15 mg/dia de ácido folínico. Uma alternativa, em pacien-

tes alérgicos a sulfas, é a clindamicina (1,2 a 1,8 g/dia para adultos dividido em três tomadas diárias) acompanhada de pirimetamina. Na gravidez, emprega-se a espiramicina (3 g/dia divididos em três tomadas diárias) ou a clindamicina para o tratamento de infecções primárias e a consequente prevenção da toxoplasmose congênita. O tratamento é feito durante 21 semanas ou até o final da gestação. O tratamento das infecções oculares pode requerer o uso de corticosteroides para reduzir a inflamação e o risco de necrose. A toxoplasmose congênita é tratada com sulfadiazina (100 mg/kg/dia divididos em duas tomadas diárias) e pirimetamina (dose de ataque, 2 mg/kg/dia durante 2 dias, seguidos de 1 mg/kg/dia durante 2 a 6 meses e de 1 mg/kg 3 vezes/semana) por um período de 12 meses.

► Prevenção e controle da toxoplasmose

No Brasil, entre 70 e 80% dos adultos apresentam evidência sorológica de infecção crônica por *T. gondii*. Os dados existentes referem-se principalmente a gestantes participantes de programas de cuidado pré-natal em grandes cidades, mas a infecção pode ser ainda mais frequente em áreas rurais remotas do país. Algumas das taxas mais elevadas de soroprevalência de toxoplasmose no Brasil foram descritas em estudos de base populacional na Amazônia rural (Ferreira *et al.*, 2009). Manifestações oculares da toxoplasmose ocorrem em cerca de 80% dos casos de toxoplasmose congênita e em 2 a 3% dos pacientes que adquirem infecção aguda sintomática após o nascimento; em estudo no sul do Brasil, 18% dos indivíduos de uma amostra aleatória apresentavam evidência clínica de toxoplasmose ocular (Glasner *et al.*, 1992). A incidência de toxoplasmose congênita em diferentes países é estimada entre 1 e 10 casos a cada 1.000 gestações.

Os principais fatores de risco para a infecção humana por *T. gondii* variam segundo características culturais e geográficas de cada país (Petersen *et al.*, 2010). Na Europa e nos EUA, por exemplo, o consumo de carne crua ou malpassada, especialmente de carne suína, é geralmente identificado como a principal via de infecção (Jones *et al.*, 2009). No Brasil, entretanto, as infecções contraídas pela ingestão de oocistos contaminando a água e os alimentos são relativamente comuns, especialmente em surtos (de Moura *et al.*, 2006; Heukelbach *et al.*, 2007). A presença de gatos (especialmente de filhotes) nos domicílios pode ser um fator de risco para infecção, ainda que os dados epidemiológicos disponíveis não sejam conclusivos (Ferreira *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2010).

As medidas práticas para a prevenção da toxoplasmose consistem no cozimento adequado de carnes e em evitar o contato com as fezes de gatos. O aquecimento de carnes contendo cistos teciduais a temperaturas iguais ou supe-

riores a 67°C é suficiente para inativá-los imediatamente. O congelamento da carne contaminada a temperaturas abaixo de -12°C reduz acentuadamente a viabilidade dos cistos teciduais. Gatos domésticos alimentados com rações comerciais e mantidos em ambientes isentos de roedores têm menor risco de infectar-se. Os vegetais e as hortaliças crus devem ser cuidadosamente lavados antes de seu consumo.

Gestantes e pacientes com comprometimento imunitário, que representam os grupos sob risco de complicações clínicas graves, devem ser particularmente estritos no seguimento das medidas profiláticas sugeridas na Tabela 3.1. Recomendam-se esquemas quimioprofiláticos em todos os pacientes infectados pelo HIV com contagem de linfócitos T CD4 abaixo de 100 células por microlitro de sangue que tenham evidência sorológica de infecção latente por *T. gondii*. O esquema profilático mais utilizado emprega sulfametoxazol e trimetoprima, com eficácia entre 70 e 80% (Nascimento *et al.*, 2001). A vasta experiência na França e em outros países europeus sugere que o tratamento da toxoplasmose adquirida durante a gravidez reduz o risco de transmissão congênita (McLeod *et al.*, 2009).

Não existe vacina contra a toxoplasmose licenciada para uso humano. Na Europa e na Nova Zelândia, uma vacina com organismos vivos atenuados (Toxovax, produzida na Holanda) é utilizada para a prevenção da toxoplasmose em ovinos, que frequentemente leva a infecções congênicas e a abortamento, com grandes prejuízos econômicos (Innes, 2010).

Tabela 3.1 Medidas profiláticas contra a toxoplasmose.

Contato com carne crua
Evitar o consumo de carnes cruas ou mal-passadas, mesmo aquelas que tenham sido congeladas.
Não provar carnes cruas durante seu preparo.
Lavar cuidadosamente as mãos com sabão depois de manusear carne crua durante seu preparo.
Consumo de água e vegetais crus
Evitar o consumo de água não filtrada, não fervida ou se origem desconhecida.
Lavar cuidadosamente os vegetais (frutas, hortaliças) consumidos crus.
Contato com fezes de gatos
Limpar diariamente os ambientes domésticos contaminados com fezes de gatos. O uso de água fervente para desinfetar esses ambientes oferece bons resultados. Lavar as mãos ao concluir esta tarefa. Pessoas sob maior risco de complicações clínicas devem delegar esta tarefa a outras pessoas da casa.
Os tanques de areia em que as crianças brincam devem ser cobertos quando não estão sendo utilizados.
Gestantes
A sorologia no início da gravidez distingue as gestantes com infecção crônica daquelas soronegativas, que ainda podem contrair uma infecção aguda.
Gestantes com infecção aguda diagnosticada durante a gestação devem ser tratadas para reduzir o risco de transmissão congênita da infecção.
Pacientes infectados pelo HIV
Caso o paciente tenha evidência de infecção latente e contagem de linfócitos T CD4 abaixo de 100 células por microlitro de sangue, recomenda-se o uso de quimioprofilaxia (geralmente com sulfametoxazol-trimetoprima).

Parasitologia em foco

Variação genética e virulência em *Toxoplasma gondii*

Em meados da década de 1990, sugeriu-se que as diferenças no espectro clínico das infecções primárias deviam-se, em grande parte, a diferenças de virulência entre genótipos de *T. gondii*. A maioria dos isolados de *T. gondii* disponíveis na época, predominantemente originários da Europa e da América do Norte, classificavam-se em três grupos clonais. No genótipo I foram classificados os parasitos altamente virulentos em camundongos (mas não em ratos), que apresentam rápida multiplicação em cultivo e raramente se convertem de taquizoítos a bradizoítos. São raramente isolados em infecções humanas. Os genótipos II e III são os mais comuns na Europa e América do Norte. São avirulentos em camundongos, sendo frequentemente isolados de animais naturalmente infectados que não apresentam manifestações clínicas evidentes (Howe & Sibley, 1995). O genótipo II é o mais comum em infecções humanas, enquanto o genótipo III é frequentemente encontrado em animais domésticos. O desenvolvimento de métodos moleculares para a tipagem de isolados clínicos de *T. gondii* e sua classificação em genótipos traria, portanto, importante informação prognóstica.

A divergência de sequência de DNA entre os três genótipos principais situa-se entre 1 e 2% de seus nucleotídeos, sugerindo que eles compartilhem um ancestral comum nos últimos 10.000 anos. Embora a contribuição de variantes distintas de diversas proteínas de roptrias, especialmente ROP16 e ROP18, para a virulência tenha sido bem documentada, não deixa de ser surpreendente que linhagens tão semelhantes, que se diferenciaram em um período de tempo relativamente curto, apresentem características fenotípicas tão diversas (Sibley & Ajioka, 2008).

Estudos subsequentes na América do Sul, na África e na Ásia mostraram, entretanto, numerosas linhagens recombinantes em *Toxoplasma gondii*, que combinavam alelos típicos dos três genótipos tradicionalmente reconhecidos. Essas linhagens são geralmente mais virulentas que os isolados prototípicos do genótipo II (Sibley & Ajioka, 2008).

A grande quantidade de linhagens recombinantes em certas regiões do globo sugere que as diferenças no modo predominante de transmissão da toxoplasmose exerçam grande impacto na estrutura populacional do parasito. Na natu-

reza, a única oportunidade para a realização de troca genética mediante *crossing over* ocorre durante o ciclo sexuado do parasito, no epitélio intestinal do gato. Entretanto, o parasito pode propagar-se sem uma passagem obrigatória por seus hospedeiros definitivos, circulando entre herbívoros e carnívoros ou onívoros. Em contextos epidemiológicos que favoreçam a infecção de gatos e outros felinos, aumenta a probabilidade de que o mesmo gato esteja coinfestado por linhagens distintas de *Toxoplasma*, permitindo o surgimento e a disseminação de novas formas recombinantes. Entretanto, quando são raramente encontrados múltiplos clones do parasito no mesmo felino, reduzem-se as oportunidades de recombinação genética, mantendo-se intactos os genótipos ao longo de diversas gerações. De fato, foram encontradas diferenças acentuadas nos níveis de recombinação genética e endocruzamento entre isolados de *Toxoplasma* obtidos de animais domésticos provenientes do Brasil e dos EUA (Lehmann *et al.*, 2004), sugerindo que as condições epidemiológicas vigentes no Brasil sejam muito mais propícias ao surgimento de linhagens recombinantes. O próximo desafio consiste em determinar se essas linhagens recombinantes diferem dos genótipos tradicionais quanto a características clinicamente relevantes, como por exemplo a sua virulência em infecções humanas.

Bibliografia

► Bibliografia

- Howe, D. K. & Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases* 172: 633-9.
- Lehmann, T., Graham, D. H., Dahl, E. R. *et al.* 2004. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibrium. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 107-14.
- Maubon, D., Ajzenberg, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Dardé, M. L. & Pelloux, H. 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends in Parasitology* 24: 299-303.
- Sibley, L. D. & Ajioka, J. W. 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology* 62: 329-51.
- Glasner, P. D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D. *et al.* 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology* 114: 136-44.
- Henríquez, S.A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J. & Roberts, C.W. 2009. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation* 16: 122-33.
- Heukelbach, J., Meyer-Cirkel, V., Moura, R.C.S. *et al.* 2007. Waterborne toxoplasmosis, Northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 13: 287-9.
- Hide, G., Morley, E.K., Hughes, J.M. *et al.* 2009. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 136: 1877-85.
- Innes, E.A. 2009. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and Public Health* 57: 1-7.
- Innes, E.A. 2010. Vaccination against *Toxoplasma gondii*: an increasing priority for collaborative research? *Expert Reviews in Vaccines* 9: 1117-9.
- Jones, J.L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C. *et al.* 2009. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 49: 878-84.
- Lambert, H. & Barragan, A. 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology* 12: 292-300.
- Lamberton, P.H.L., Donnelly, C.A. & Webster, J.P. 2008. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology* 135: 1143-50.
- Lyons, R. E., McLeod, R. & Roberts, C.W. 2002. *Toxoplasma gondii* taquizoite-bradizoite interconversion. *Trends in Parasitology* 18: 198-201.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A. *et al.* 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399-451.
- Bogdan, C. & Röllinghoff, M. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today* 15: 22-8.
- Boothroyd, J. C., Hehl, A., Knoll, L. J. & Manger, I. D. 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *International Journal for Parasitology* 28: 3-9.
- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M.G., Wada, M.Y. *et al.* 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases* 12: 326-9.
- Denkers, E. Y. & Gazzinelli, R. T. 1998. Regulation of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 569-88.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V. & Fourmaux, M. N. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology* 28: 1007-13.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S. & Dubey, J.P. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology* 26: 190-6.
- Ferreira, M.U., Hiramoto, R.M., Aureliano, D.P. *et al.* 2009. A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 171-6.

- McLeod, R., Kieffer, F., Sautter, M., Hosten, T. & Pelloux, H. 2009. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 320-44.
- Mineo, J.R. & Kasper, L.H. 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein SAG1 (P30). *Experimental Parasitology* 79: 11-20.
- Nascimento, L.V., Stollar, F., Tavares, L.B. *et al.* 2001. Risk factors for toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients: a case-control study in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 95: 587-93.
- Petersen, E., Vesco, G., Villari, S. & Buffolano, W. 2010. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses and Public Health* 57: 8-17.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P. & Boothroyd, J.C. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology* 21: 476-481.
- Sensini, A. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 504-12.
- Skarish, S., McIntyre, M.K. & Mordue, D.G. 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research* 107: 253-60.
- Soldati, D. 1999. The apicoplast as a potential therapeutic target in *Toxoplasma* and other Apicomplexan parasites. *Parasitology Today* 15: 5-7.

► Leitura sugerida

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. & Speer, C.A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 267-99.
- Boothroyd, J.C. 2009. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology* 39: 935-46.

