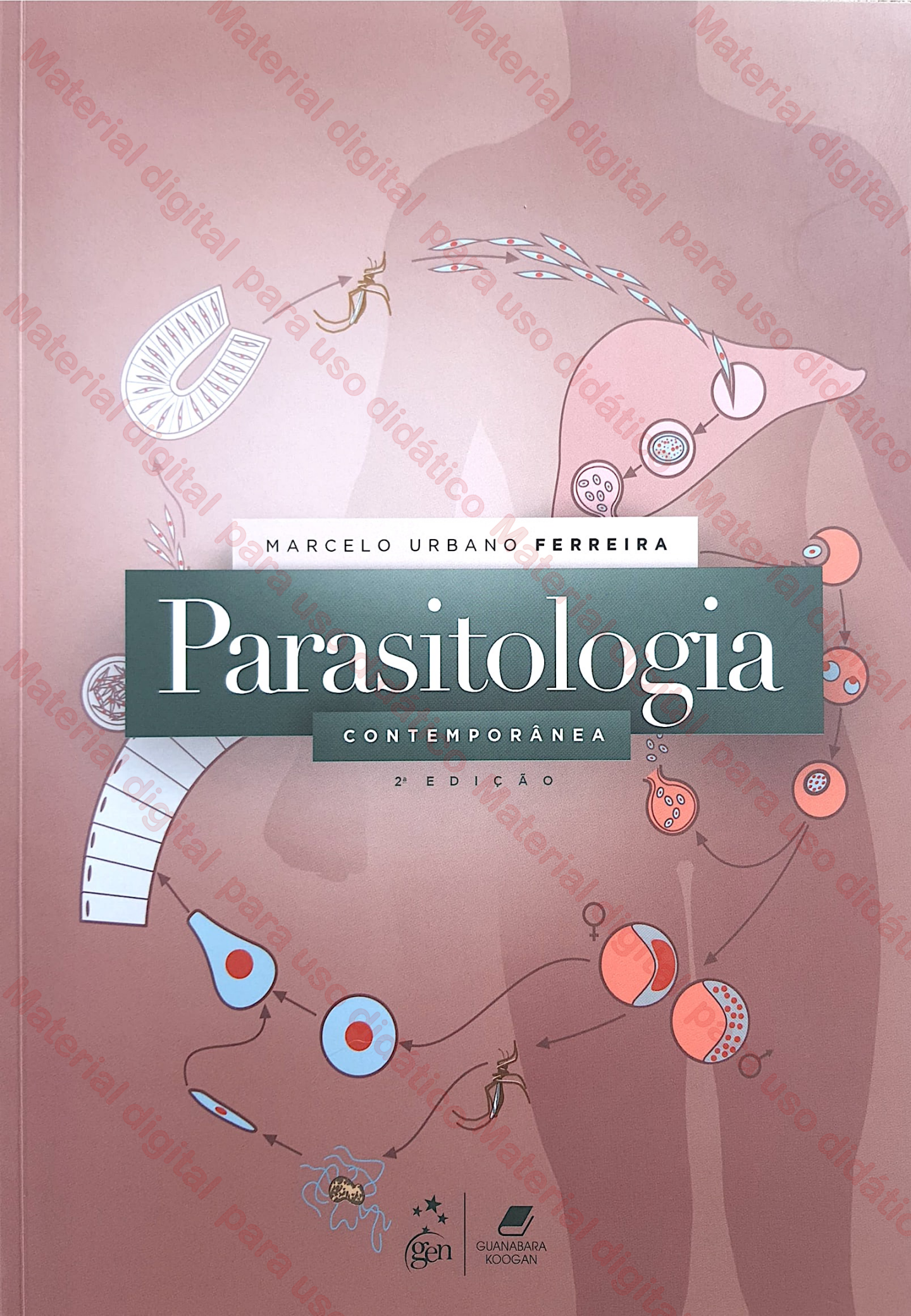


MARCELO URBANO FERREIRA

Parasitologia

CONTEMPORÂNEA

2ª EDIÇÃO



Toxoplasma gondii e a Toxoplasmose

Daniel Youssef Bargieri ■ Marcelo Urbano Ferreira

Introdução

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. A grande importância da toxoplasmose, como problema clínico e de saúde pública, 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 (1866-1936) e Louis Manceaux (1865-1934) encontraram-no em um *gundi* (*Ctenodactylus gundi*), um pequeno roedor silvestre africano semelhante ao hamster, comum no sul da Tunísia. No mesmo ano, Alfonso Spendore (1871-1953) relatou a presença do parasito no Brasil, em coelhos de laboratório (Innes, 2010). Entretanto, em ambos os casos o parasito foi erroneamente identificado como uma leishmânia.

Toxoplasma é um parasito eurixeno que infecta mamíferos e aves, tradicionalmente classificado no subgrupo Apicomplexa, como os plasmódios e diversos coccídeos intestinais. O gênero *Toxoplasma* foi criado por Frenkel em 1973. Na classificação mais recente, os protozoários do subgrupo Apicomplexa estão classificados no supergrupo Chromoalveolata, grupo Alveolata (Adl et al., 2005). Entre seus parentes mais próximos, encontra-se *Neospora caninum*, protozoário de distribuição cosmopolita e importante causa de aborto em bovinos, que tem o cão como hospedeiro definitivo. Nos 30 anos seguintes à descoberta de *T. gondii*, organismos semelhantes a ele foram descritos em diversos hospedeiros, especialmente em roedores e répteis, muitas vezes recebendo nomes distintos. O primeiro caso de infecção humana foi descrito em 1937.

Por muitas décadas permaneceram desconhecidos aspectos fundamentais do ciclo vital e do modo de transmissão de *T. gondii*. 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 descreveu, em 1965, a infecção de camundongos pela ingestão de material fecal de gatos infectados. Posteriormente, Dubey, Miller e Frenkel descreveram, em 1970, os estágios sexuados do parasito no

intestino de gatos e demonstraram que oocistos de *Toxoplasma* encontrados nas fezes desses felinos eram capazes de infectar camundongos pela via oral, explicando a alta prevalência de toxoplasmose em herbívoros (Dubey, 2009).

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, com genoma nuclear de 14 cromossomos com tamanho que varia entre 2 e mais de 6 milhões de pares de bases. O genoma tem um total de 65 a 70 milhões de pares de bases, com cerca de 8.000 genes e conteúdo de guanina (G) e citosina (C) de 52% (Boothroyd, 2009). A frequência de recombinação situa-se em torno de 1 cM, correspondente a cerca de um evento recombinatório a cada 200.000 pares de bases. O genoma mitocondrial contém cerca de 6.000 pares de bases. O parasito invade e se multiplica em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. Há três estágios infectantes: *taquizoítos*, *bradizoítos* e *esporozoítos*. Os *esporozoítos* desenvolvem-se no interior dos oocistos liberados junto com as fezes de felinos infectados. Se ingeridos por mamíferos ou aves, os oocistos liberam no trato gastrointestinal os esporozoítos, que invadem células hospedeiras (provavelmente células epiteliais) e se transformam em *taquizoítos*. Os *taquizoítos*, às vezes chamados também de trofozoítos ou endozoítos, são alongados e encurvados, em forma de arco (*toxon* = arco, em grego) ou de crescente, com 5 a 8 μm de comprimento e 2 μm de largura (Figura 4.1A). Seu núcleo tem localização central. Multiplicam-se rapidamente no interior das células. Estas, repletas de *taquizoítos*, são algumas vezes chamadas de *pseudocistos* ou *ninho de taquizoítos* (Figura 4.1B). Depois de alguns dias ou semanas de multiplicação intensa no organismo, com invasão de células, multiplicação, saída das células e reinvasão, os *taquizoítos* convertem-se em formas quiescentes conhecidas como *bradizoítos*, que se multiplicam lentamente no interior de cistos teciduais (Figura 4.1C). Os *bradizoítos* medem aproximadamente $7 \times 1,5 \mu\text{m}$. Os cistos teciduais que os contêm, quando situados no cérebro, são aproximadamente esféricos e chegam a perto de 70 μm de diâmetro (Figura 4.1C); na musculatura do hospedeiro, no entanto, tendem a ser alongados, e podem chegar a 100 μm em seu diâmetro máximo.

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 4.2): (i) os *anáis polares*, estruturas anelares elétron-densas localizadas no polo apical da célula; (ii) o *conoide*, uma rede de microtúbulos enovelados envolta pelos *anáis polares*; (iii) os *micronemas*, organelas tubulares alongadas, em forma de bastão, situadas na porção anterior da célula; (iv) as *roptrias*, organelas vesiculares ou saculares que se estendem do conoide até a porção medial da

célula; e (v) uma rede de *microtúbulos subpeliculares* (não representada na Figura 4.2), 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, bem como em sua saída dessas células. Proteínas presentes nas roptrias, algumas das quais antigênicas, são importantes para a penetração na célula hospedeira; os micronemas contêm proteínas que também desempenham papel no processo de invasão. Além disso, os parasitos apresentam em seu citoplasma uma única mitocôndria longa e ramificada, um único retículo endoplasmático e um complexo de Golgi, ribossomos, um núcleo limitado por um duplo envoltório e com um único nucléolo, cerca de dez acidocalcissomos (organelas de 40 a 150 nm envolvidas na regulação da concentração de diversos íons) e um vacúolo digestivo multivesicular (conhecido como *compartimento vacuolar* ou VAC), uma organela semelhante a um lisossomo. O vacúolo digestivo está envolvido no processo de aquisição de nutrientes da célula hospedeira por endocitose, conhecido como heterofagia, dependente de uma endopeptidase, a catepsina protease L (CPL), semelhante à falcipaina que, nos plasmódios, degrada a hemoglobina da célula hospedeira (Coppens, 2014).

Os estágios invasivos de protozoários do subgrupo Apicomplexa – esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos, no caso do *Toxoplasma* – apresentam um tipo de motilidade chamado de

deslizamento ou *gliding*, com deslocamento à velocidade de até 1 $\mu\text{m/s}$ sem deformação aparente da célula. Proteínas dos micronemas secretadas na superfície da célula desempenham papel importante na adesão do zoíto com o substrato. Essas proteínas fazem a conexão entre o meio externo e um complexo proteico submembranar que gera força, assegurando a motilidade do parasito.

Outra estrutura típica de *T. gondii* e de outros parasitos do subgrupo Apicomplexa, visível sob microscopia eletrônica, é a organela conhecida como *apicoplasto*, que alberga um genoma circular de 35.000 pares de bases. Acredita-se que essa organela envolta por quatro membranas seja um vestígio de cloroplasto, originado de algas vermelhas ou verdes como produto de uma simbiose secundária com cianobactérias. O apicoplasto tem função essencial para o parasito, pois apresenta no seu genoma a via de síntese de pirofosfato de isopentenilo (IPP), um precursor de isoprenoides. Credita-se ao apicoplasto o fato de os parasitos do grupo Apicomplexa, diferentemente dos demais eucariotos, serem sensíveis a antibióticos (McFadden; Yeh, 2017), já que o genoma dessa organela codifica uma maquinaria de replicação e expressão bacteriana remanescente de cianobactéria. A clindamicina, por exemplo, é um antibiótico macrolídeo que inibe a maquinaria de tradução de células procarióticas; seu efeito contra *Toxoplasma* e os plasmódios tem como alvo os ribossomos do apicoplasto.

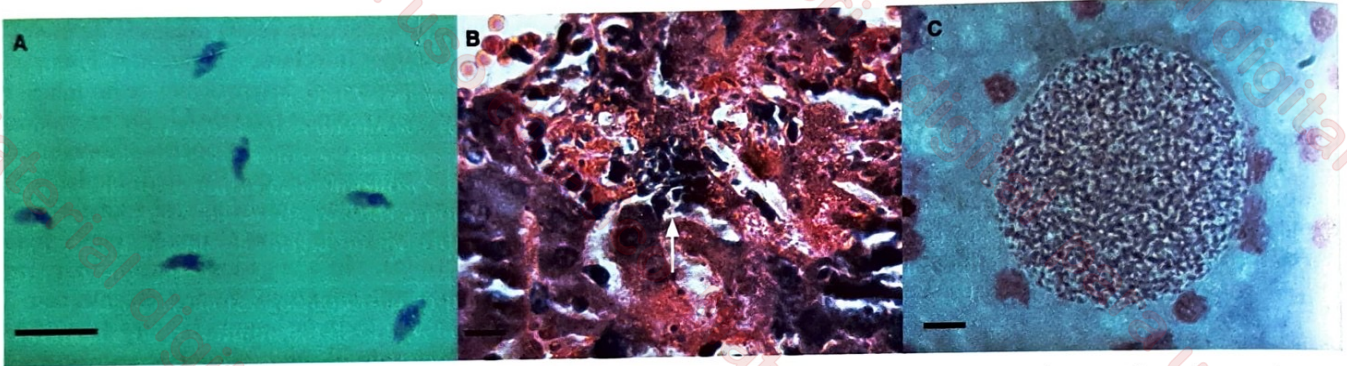


FIGURA 4.1 Estágios evolutivos de *Toxoplasma gondii*. **A.** Taquizoítos no exsudato peritoneal de camundongo infectado, corados com Giemsa. **B.** Corte histológico de fígado mostrando células infectadas por dezenas de taquizoítos, formando pseudocistos. Coloração pela hematoxilina-eosina. A seta aponta uma dessas células infectadas. **C.** Corte histológico de cérebro mostrando cisto tecidual que contém numerosos bradizoítos. Coloração pela hematoxilina-eosina. Barras de escala = 10 μm . Fotografias de Daniel Y. Bargieri.

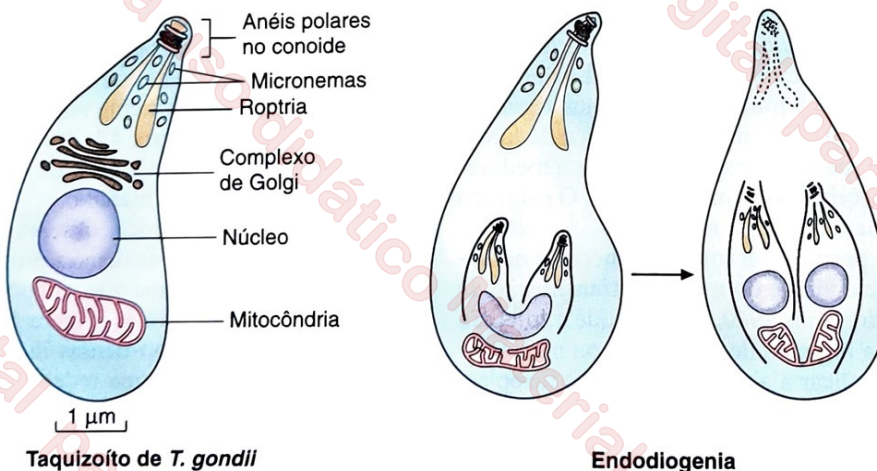


FIGURA 4.2 Representação esquemática dos taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e do processo de reprodução assexuada por endodiogenia.

Aspectos biológicos

A infecção humana pelo *T. gondii* ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos esporulados (contendo esporozoítos desenvolvidos) ou de carne contaminada com cistos teciduais (contendo bradizoítos). Os oocistos e cistos teciduais são altamente resistentes à ação de enzimas proteolíticas e ao ambiente gástrico ácido. Uma vez ingeridos, os oocistos e cistos teciduais liberam os esporozoítos e bradizoítos, respectivamente, que são capazes de invadir células hospedeiras no trato gastrointestinal. O processo de invasão é semelhante àquele caracterizado molecularmente em experimentos que utilizam taquizoítos, e será descrito mais adiante. Dentro da célula hospedeira, o parasito rapidamente se diferencia em taquizoítos, a forma replicativa. Taquizoítos são menos resistentes ao ambiente gástrico, mas a ingestão de carne altamente contaminada com *pseudocistos* (células hospedeiras repletas de taquizoítos) também pode causar infecção. Acredita-se que parte dos taquizoítos ingeridos pode penetrar células hospedeiras na mucosa oral; alguns podem sobreviver ao ambiente gástrico.

Os taquizoítos são haploides e multiplicam-se por *endodigenia* dentro de um vacúolo parasitóforo, processo de reprodução assexuada que, depois do processo de mitose, resulta na formação de duas células-filhas no interior de uma célula-mãe, que finalmente se degenera (ver Figura 4.2). A replicação da mitocôndria e do apicoplasto é desencadeada pela divisão celular; não é um processo autônomo, como na maioria dos eucariotos. Os parasitos que resultam de sucessivos processos de endodigenia permanecem ligados ao mesmo corpo residual, dando-lhes o aspecto de roseta no interior do vacúolo parasitóforo. Novos taquizoítos são liberados a cada 6 a 9 horas, quando se rompe a célula hospedeira repleta de parasitos (*pseudocisto*). A saída dos novos taquizoítos, ou *egresso*, pode ser regulada pelo parasito. Como consequência da multiplicação, há acidificação do vacúolo parasitóforo, importante para ativação de uma proteína do tipo perforina (PLP1), secretada pelo parasito, que se insere e produz poros nas membranas do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira, o que facilita a saída da célula (Kafsack et al., 2009). A saída da célula também pode ser induzida pelo ataque das células hospedeiras por linfócitos citotóxicos (Blader et al., 2015). Os taquizoítos liberados podem invadir células vizinhas ou se disseminar por via hematogênica ou linfática, eventualmente atingindo todos os tecidos do organismo.

A disseminação dos taquizoítos depende da motilidade por deslizamento destes parasitos. O deslocamento rápido dos taquizoítos é possibilitado pela adesão da célula ao substrato, via proteínas transmembranares secretadas pelos micronemas (coletivamente conhecidas como MICs), como a MIC2. As proteínas transmembranares medeiam a motilidade ao conectar o substrato externo a um complexo proteico submembranar, chamado de *motor* ou *glideossomo*, cuja arquitetura é mantida por uma série de proteínas associadas ao glideossomo (GAPs). A força no glideossomo é gerada pela interação de miosinas (MyoA) com filamentos de actina, e transloca as proteínas transmembranares do polo apical para o polo basal da célula gerando tração (Bargieri et al., 2014). No polo basal da célula, as proteínas são clivadas por proteases do tipo romboide (Blader et al., 2015) e liberadas no meio externo como antígenos solúveis junto com outros antígenos de superfície (SAGs) envolvidos em adesão celular, como a SAG1.

As etapas de invasão celular são essencialmente as mesmas para esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos (Dubremetz et al., 1998). Ocorre inicialmente uma primeira etapa de adesão, mediada por proteínas de superfície como as SAGs. Posteriormente, ocorre reorientação da célula do zoíto para promover 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, acompanhada de exocitose do conteúdo das roptrias e dos micronemas. Entre as principais adesinas do parasito liberadas pelos micronemas está a MIC2, que parece mediar uma adesão mais forte da superfície do parasito à célula hospedeira. Forma-se, então, um ponto de junção com justaposição das membranas da célula hospedeira e do zoíto. Essa junção, que à micrografia eletrônica tem aspecto similar ao das junções entre células endoteliais, serve como ponto de apoio para que o parasito ativamente aplique força, gerada no glideossomo, e entre na célula hospedeira.

A composição molecular da junção formada entre os zoítos e a célula hospedeira no momento da invasão ainda é tema de debate. Algumas observações genéticas contrariam o modelo atual (Andenmatten et al., 2013; Bargieri et al., 2014). Segundo o modelo mais aceito atualmente, o parasito injeta proteínas de roptrias no citoplasma da célula hospedeira ao reorientar seu complexo apical para a célula-alvo. Parte dessas proteínas, como as ROPs, parecem garantir a integridade do vacúolo parasitóforo a ser formado. Outras proteínas, como as RONs (principalmente RON2, RON4 e RON5), inserem-se na membrana da célula hospedeira. O complexo de RONs parece conectar-se ao citoesqueleto da célula-alvo, enquanto parte da RON2 permanece exposta na superfície da célula e serve como receptor para a invasão. Do lado do parasito, a proteína transmembranar AMA1, conectada ao motor do parasito, serve de ligante à RON2 (Frenal et al., 2017). A ligação da AMA1 à RON2 é extremamente forte (Tonkin et al., 2011). Ao conectar o citoesqueleto da célula hospedeira ao motor do parasito, essa interação fornece o ponto de apoio onde o zoíto aplica força para se projetar para dentro da célula. A secreção de outra proteína do parasito, a toxofilina, promove o desarranjo da rede de actina no citoesqueleto da célula, eliminando a resistência à entrada do zoíto (Delorme-Walker et al., 2012).

O mecanismo de invasão, com injeção na célula hospedeira do próprio receptor, explica o fato de *T. gondii* invadir uma *ampla gama de células hospedeiras*. O processo de entrada ocorre com a invaginação da membrana da célula hospedeira. Ao final da invasão, o parasito encontra-se em um vacúolo parasitóforo, no citoplasma da célula hospedeira. O revestimento proteico desse vacúolo origina-se das roptrias e dos micronemas do parasito, como as ROPs. A membrana do vacúolo parasitóforo funciona como peneira molecular, que possibilita somente a entrada de pequenas moléculas como açúcares, nucleotídeos, aminoácidos e outros nutrientes. 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, ocorre a formação de

fagolisossomos e a morte do parasito (Bogdan; Rollinghoff, 1999). Admite-se que o fato de o vacúolo parasitóforo ser revestido por proteínas provenientes das roptrias e dos microne-mas do parasito dificulta a fusão de lisossomos.

A imunopatogênese da toxoplasmose vem sendo estuda-da em detalhe. A fase inicial da infecção, com intensa multiplicação de taquizoítos, é chamada de ciclo lítico, caracterizado por intensa resposta inflamatória, com grande produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-12 e interferona gama (IFN- γ) (Dupont et al., 2012) (Figura 4.3). A resposta inflamatória é estimulada pela liberação de grande quantidade de antígenos solúveis de *Toxoplasma*. Muitos dos produtos liberados durante o *gliding* têm potencial imunestimulador. Além de gerar novos taquizoítos, o processo de endodiogenia resulta na formação de remanescentes da célula-mãe, liberados ao meio externo quando o parasito deixa a célula hospedeira; esses remanescentes contêm antígenos capazes de despertar respostas pró-inflamatórias.

Em camundongos, a principal citocina para controle da disseminação do parasito é IFN- γ , mediante a ativação de GTPases, enzimas que hidrolisam guanosina trifosfato (GTP). Algumas GTPases são importantes no controle de patógenos intracelulares, e são denominadas IRG (do inglês, *immunity related guanosine triphosphatases*). As IRGs agem diretamente na membrana do vacúolo parasitóforo, desestabilizando-a (Melzer et al., 2008). Algumas proteínas secretadas pelas roptrias, como as serina-treonina quinases ROP18 e ROP17, fosforilam e inibem a ação das IRGs; são, portanto, fatores de virulência (Steinfeldt et al., 2010). Parasitos que expressam variantes alélicas distintas dessas proteínas diferem quanto à virulência em roedores. Em seres humanos, o controle da infecção também depende largamente de IFN- γ . Como os seres humanos não têm as mesmas IRGs presentes em roedores, a ação antiparasitária dependente de IFN- γ ocorre pela produção de reativos de oxigênio, limitação da disponibilidade de triptofano pela ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), sequestro de ferro e ativação de inflamassoma. Outra via de ação antiparasitária é a deposição de LC3, um

marcador de autofagia, na membrana do vacúolo parasitóforo. O recrutamento de LC3 pode ser dependente de IFN- γ ou independente, no caso de ligação direta de CD40 ao seu receptor na superfície da célula hospedeira (Hakimi et al., 2017). Diferentes cepas de *T. gondii* diferem quanto à virulência em camundongos e em seres humanos.

O parasito desenvolveu mecanismos elegantes para sequestrar as funções da célula hospedeira e, por exemplo, evitar sua eliminação por apoptose, além de alterar diversas funções celulares. A proteína ROP16, secretada das roptrias, é capaz de fosforilar e ativar os fatores de transcrição STAT6 e STAT3, inibindo a transcrição de IL-12 e, portanto, favorecendo a multiplicação parasitária. Uma vez internalizado, o parasito secreta o conteúdo de outra organela especializada, os *grânulos densos*. Os grânulos densos contêm proteínas secretadas no citoplasma da célula hospedeira, como GRA6 e GRA15, que também modulam o programa transcricional da célula GRA16 e GRA24, por sua vez, têm a capacidade de penetrar no núcleo da célula hospedeira. GRA16 modula a expressão de genes envolvidos em metabolismo, ciclo celular e promove sobrevivência da célula por meio da modulação do fator de transcrição p53. Outro modulador importante secretado é a proteína TgIST, que também penetra no núcleo da célula hospedeira e atua como repressor da transcrição de genes induzidos por IFN- γ (Hakimi et al., 2017).

A célula parasitada pode eventualmente ser envolta por uma membrana espessa, formando um *cisto tecidual* (ver Figura 4.1C). 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 por longos períodos, mas provavelmente não por toda a vida do hospedeiro (Rougier et al., 2017). A parede do cisto, originada a partir na membrana do vacúolo parasitóforo e composta majoritariamente de polissacarídeos e glicoproteínas, chega a ter 250 nm de espessura, com permeabilidade seletiva, e protege os bradizoítos da resposta imunológica do hospedeiro.

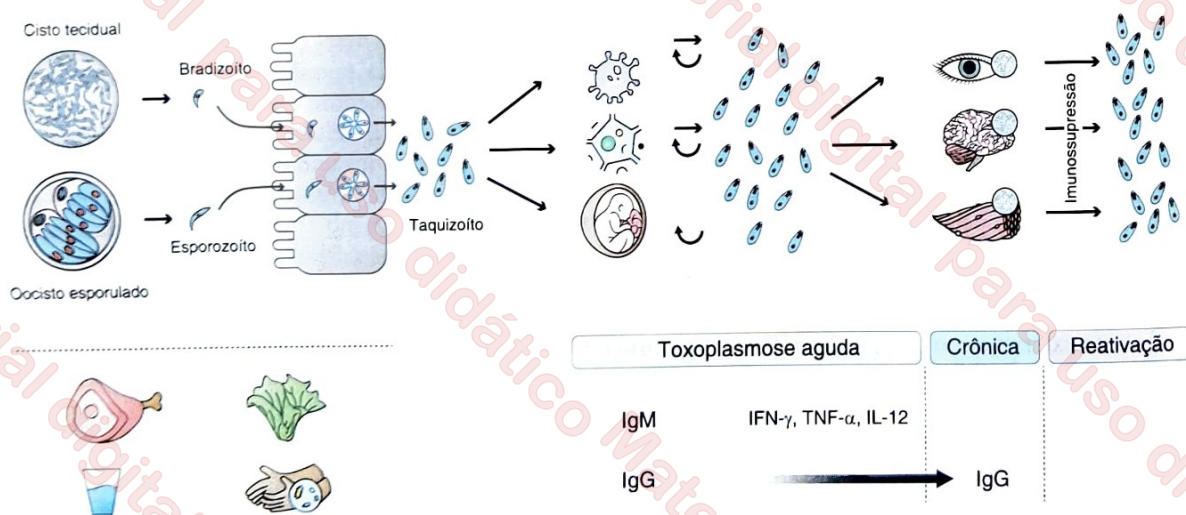


FIGURA 4.3 Representação esquemática da infecção humana por *Toxoplasma gondii*. Cistos teciduais ou oocistos esporulados ingeridos liberam bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, no lúmen intestinal. Os zoítos rapidamente invadem células epiteliais e se transformam em taquizoítos, que se disseminam pelo organismo, podendo ocorrer a passagem transplacentária de taquizoítos, o que resulta em infecção congênita. Com o controle da infecção por uma resposta imunológica competente, o parasito forma cistos teciduais preferencialmente em tecidos nervosos e musculares. Os principais sítios de reativação de toxoplasmose no ser humano são o cérebro e os olhos.

Em culturas *in vitro*, a conversão de taquizoítos em bradizoítos pode ser induzida por estresse. A taxa de conversão é maior em culturas mantidas em pH alcalino, sob estresse nutricional ou químico. Compostos que inibem a atividade mitocondrial também induzem conversão de taquizoítos em bradizoítos pelo estresse oxidativo. Algumas cepas de *Toxoplasma* convertem para bradizoítos espontaneamente *in vitro* mesmo na ausência de estímulos, especialmente quando a cultura é infectada com poucos parasitos. Além disso, o tipo de célula hospedeira infectada pode favorecer a conversão em bradizoítos, como é o caso de células musculares e nervosas (Jeffers et al., 2018). Isso explica em parte por que cistos teciduais são preferencialmente encontrados nos músculos e no cérebro em infecções crônicas (ver Figura 4.3).

Os fatores que determinam a conversão de taquizoítos em bradizoítos e formação de cistos teciduais *in vivo* são menos claros. O estresse provocado pela resposta imunológica do hospedeiro parece ter algum papel na indução da conversão. O tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com IFN- γ estimula a conversão de taquizoítos em bradizoítos pela indução de óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo. *In vivo*, o IFN- γ induz a produção de NO por macrófagos, células da microglia e astrócitos, e pode estar envolvido na conversão de taquizoítos em bradizoítos. Outro efeito do IFN- γ *in vivo* é a ativação da enzima IDO e a consequente degradação de triptofano, o que pode estimular a conversão em bradizoítos (Jeffers et al., 2018). Duas outras citocinas, IL-6 e TNF- α , induzem a conversão *in vitro*, mas seu papel na formação de bradizoítos *in vivo* ainda é pouco claro.

A resposta imunológica do hospedeiro parece ser mais importante para a manutenção da infecção crônica do que na indução dela (ver Figura 4.3). Camundongos deficientes de IFN- γ ou IL-12 são altamente suscetíveis à infecção por *Toxoplasma*, assim como camundongos deficientes de linfócitos B ou T. Em camundongos infectados cronicamente, os bradizoítos reconvertem-se em taquizoítos na ausência de estímulos como IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Lyons et al., 2002). Da mesma forma, pacientes com deficiências de linfócitos T são mais suscetíveis. Isso explica a reativação de infecção aguda por *Toxoplasma*, ou seja, reconversão de bradizoítos em taquizoítos, em pacientes infectados pelo HIV.

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), e bradizoítos parecem gerar ATP a partir de glicólise anaeróbica, pois não têm ciclo de ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) funcional (Jeffers et al., 2018). As diferenças antigênicas não chegam a ser surpreendentes, pois possibilitam 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). 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. Outro exemplo são as proteínas GRA, que, na infecção por taquizoítos, agem no citoplasma e no núcleo da célula hospedeira modulando as funções da célula. Em bradizoítos, algumas proteínas GRA são localizadas na parede do cisto e, portanto, podem desempenhar função biológica distinta nesses estágios do parasito.

As diferenças de expressão gênica entre taquizoítos e bradizoítos são em grande parte reguladas por fatores de transcrição. Parasitos do subgrupo Apicomplexa apresentam fatores de transcrição do tipo Apetala-2 (AP2), comuns em plantas. Pelo menos três membros da família AP2 – AP2IV-3, AP2XI-4 e AP2XII-6 – estão envolvidos na expressão de genes de bradizoítos (Jeffers et al., 2018). Outros três, AP2IV-4, AP2IX-4 e AP2IX-9, atuam como repressores de genes de bradizoítos. O controle transcricional em taquizoítos e bradizoítos também ocorre no nível epigenético. A acetilação de histonas em regiões promotoras de genes de bradizoítos, pela acetiltransferase *TgGCN5a*, parece favorecer a expressão desses genes, enquanto a deacetilação de histonas nestas regiões, pela *TgHDAC3*, tem o efeito inverso de reprimir a expressão de genes de bradizoítos (Jeffers et al., 2018). Finalmente, o nível global de tradução parece ser reduzido em bradizoítos pela fosforilação da subunidade alfa do fator de iniciação eucariótico 2 em *Toxoplasma* (*TgEIF2 α*). A redução dos níveis de tradução proteica contribui para a manutenção do estado de lenta multiplicação dos bradizoítos, e a defosforilação do *TgEIF2 α* parece estar envolvida na reconversão de bradizoítos em taquizoítos (Jeffers et al., 2018).

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 4.4A) e um ciclo sexuado em que se formam gametas (*gametogonia*) (Figura 4.4B). Deste modo, os felinos servem como hospedeiros definitivos para o parasito. No lúmen intestinal dos felinos, a parede dos cistos teciduais é digerida, liberando os bradizoítos. Estes penetram as células epiteliais do intestino delgado, mais precisamente do íleo, 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. Admite-se atualmente a existência de cinco estágios distintos de esquizontes, os tipos A, B, C, D e E, que se desenvolvem no interior do vacúolo parasitóforo. O primeiro estágio surge 12 a 18 horas após a ingestão de cistos teciduais. Seguem-se a eles esquizontes do tipo B, que se multiplicam por endodiogenia, morfologicamente semelhantes a taquizoítos. Os próximos estágios, esquizontes do tipo C, com $6 \times 1,5 \mu\text{m}$ de tamanho, desenvolvem-se 24 a 32 horas após a infecção e, como todos os demais esquizontes (exceto os do tipo B), multiplicam-se por endopoligenia, originando múltiplas células-filhas no interior de uma única célula-mãe. Os tipos A, B e C desenvolvem-se de modo sequencial. Seguem-se os esquizontes do tipo D, com tamanho semelhante aos do tipo C, a partir de 32 horas após a infecção. Finalmente, a partir do terceiro dia de infecção, desenvolvem-se no epitélio intestinal do gato esquizontes do tipo E, com $4,5 \times 1,1 \mu\text{m}$ de tamanho. Depois de alguns ciclos, os

merozoítos podem originar formas sexuadas, os *macrogametas* (femininos), com $8 \times 6 \mu\text{m}$, e os *microgametas* (masculinos), com $6 \times 3,5 \mu\text{m}$. Os gametas surgem simultaneamente com os esquizontes de tipos D e E, sugerindo que estes sejam precursores dos estágios assexuados. A fertilização dos macrogametas pelos microgametas forma zigotos que darão origem aos oocistos diploides. Com o rompimento da célula epitelial hospedeira, os oocistos caem no lúmen intestinal e são eliminados nas fezes dos felinos (Figura 4.4C). 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

(1 a 2 semanas), uma única vez em suas vidas. Um único filhote infectado pode eliminar centenas de milhões de oocistos junto com as fezes. *Toxoplasma gondii* também é capaz, nos felinos, de invadir uma ampla variedade de células nucleadas, além de enterócitos, e multiplicar-se por endodigenia, como ocorre nos demais hospedeiros (Figura 4.4C). Filhotes de gatos podem desenvolver doença clínica.

Os oocistos diploides recém-eliminados são subsféricos ou esféricos e medem $10 \times 12 \mu\text{m}$. Requerem entre 1 e 5 dias para sua esporulação no solo, processo conhecido como *esporogonia*, que envolve meiose e mitoses consecutivas, resultando na formação de dois esporocistos em seu interior, cada um com quatro esporozoítos haploides (Figura 4C). Ao final desse período, os oocistos tornam-se infectantes; têm agora formato

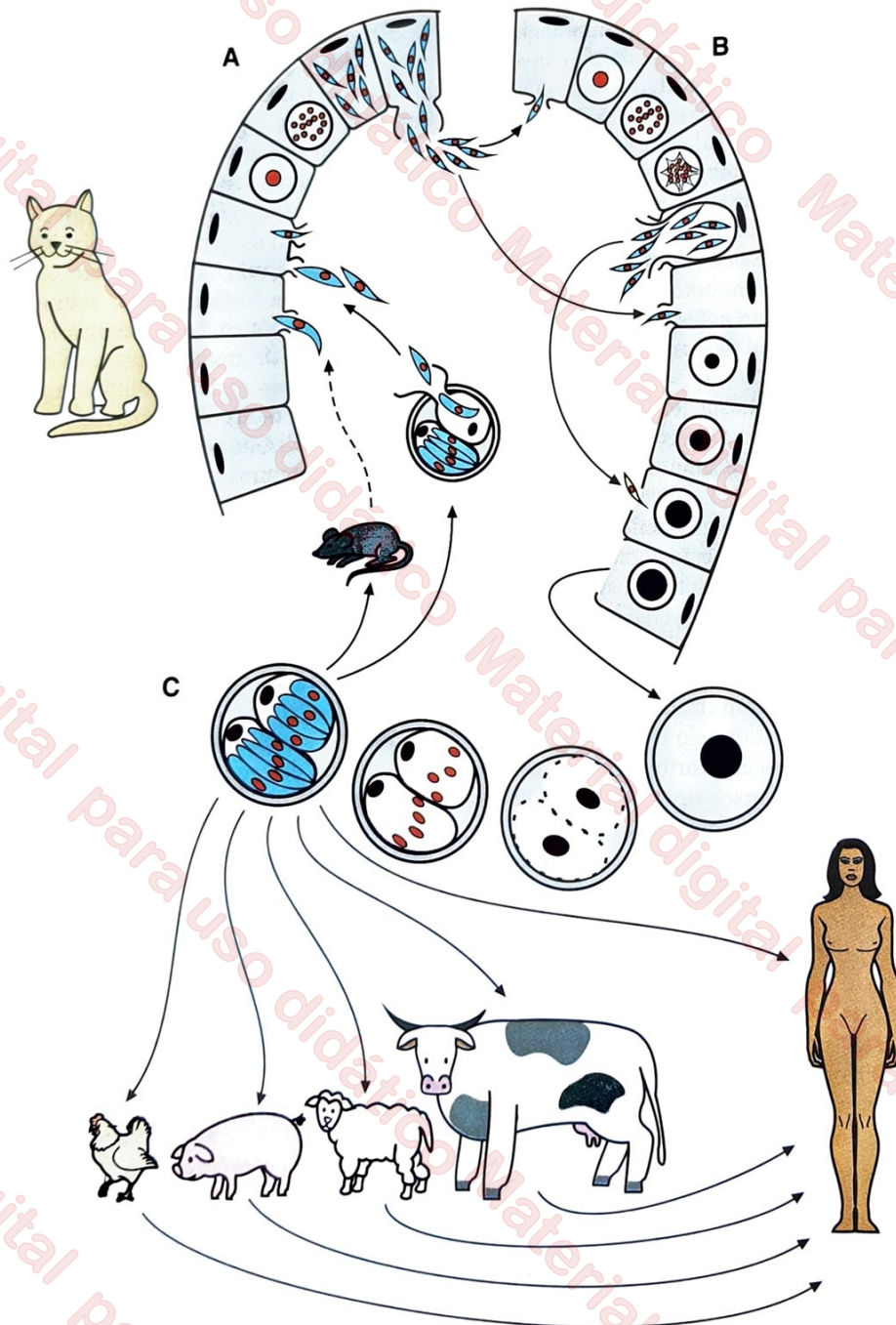


FIGURA 4.4 Ciclo vital de *Toxoplasma gondii*. São representadas as etapas de esquizogonia (A) e gametogonia (B), que ocorrem no epitélio intestinal do gato, e de esporogonia (C), que ocorre no solo.

elipsoide e medem cerca de $11 \times 13 \mu\text{m}$ (Figura 4.5). Os oocistos permanecem infectantes no solo por longos períodos, chegando a 12 a 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 cerca de 100 dias. Seu revestimento impermeável os torna resistentes a desinfetantes e outros agentes químicos; sobrevivem ao tratamento da água com o cloro, ozônio e raios ultravioleta. Entretanto, os oocistos deixam de ser infectantes quando expostos a temperaturas de 55 a 60°C por 1 ou 2 minutos.

Os herbívoros adquirem toxoplasmose mediante a ingestão de oocistos esporulados (Figura 4.4C). Os demais hospedeiros, incluindo os felinos e o ser humano, 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, são necessários entre 20 e 30 dias para os primeiros oocistos serem eliminados. Uma vez liberados no lúmen intestinal, os esporozoítos presentes nos oocistos ingeridos por felinos são capazes de invadir o epitélio intestinal e sofrer os mesmos processos de esquizogonia e gametogonia descritos acima, resultando na produção de oocistos. Somente ocorre infecção patente em um terço dos felinos infectados por essa 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 (ver Figura 4.3), inclusive do ser humano, onde se multiplicam nas próximas 24 h por endodiogenia (ver Figura 4.2). Os taquizoítos resultantes disseminam-se para os linfonodos mesentéricos e, a seguir, para órgãos distantes mediante a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos (ver Figura 4.3).

Outra via importante de infecção humana é a *passagem transplacentária de taquizoítos* durante a toxoplasmose aguda em gestantes (Figura 4.3). Os taquizoítos atingem a circulação materna e atravessam a barreira fetoplacentária, mul-

tiplicando-se de modo irrestrito nos tecidos fetais. Os felinos, os ovinos e os roedores também se infectam por via transplacentária (Hide et al., 2009). O risco de toxoplasmose congênita em seres humanos é maior em infecções contraídas no terceiro trimestre da gestação (cerca de 71% em infecções adquiridas na 36ª semana, comparado com 15% na 13ª semana), mas o risco de malformações fetais graves, uma vez contraída a infecção, tende a ser tanto maior quanto mais precoce for a gestação. Lesões intracranianas, por exemplo, são detectadas em até 40% das infecções congênicas contraídas antes de 5 semanas de gestação, mas em menos de 10% daquelas contraídas depois da 20ª semana (Devakumar et al., 2018). 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. Este último mecanismo, conhecido como cavalo de Troia, torna possível a passagem do parasito por outras barreiras naturais, como a hematóliquórica 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 congênicas) é assintomática. Em menos de 10% dos casos ocorre um quadro autolimitado de linfadenopatia febril com linfocitose, com período de incubação entre 4 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. Trata-se de um quadro clínico semelhante ao descrito na síndrome da mononucleose infecciosa. Podem ocorrer também hepatoesplenomegalia, mialgias e artralgias, com resolução espontânea dos sintomas em algumas semanas; a mialgia pode ser particularmente intensa. 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 (Figura 4.3). 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, o que resulta em um quadro de encefalite caracterizado por febre, letargia e alteração do nível de consciência no qual frequentemente ocorrem convulsões e déficits motores focais. Podem ocorrer alterações dos pares de nervos cranianos e alterações visuais em quase 20% dos pacientes. A encefalite por *T. gondii* é considerada uma doença definidora de AIDS. Em exames de imagem encontra-se uma ou múltiplas lesões nodulares com

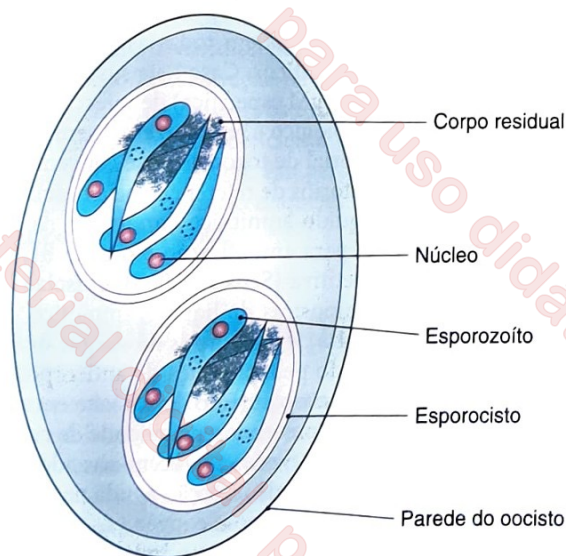


FIGURA 4.5 Representação esquemática dos oocistos de *Toxoplasma gondii*. Adaptada de Neva, Brown, 1994.

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. Com o advento da terapia antirretroviral mais potente, levando à recuperação parcial da resposta imune do hospedeiro com AIDS, os quadros mais graves de encefalite tornaram-se progressivamente mais raros em pacientes sob tratamento.

A transmissão congênita de toxoplasmose pode resultar em quadros clínicos de gravidade variável. Cerca de 12,5% dos nascidos vivos com toxoplasmose congênita desenvolvem sequelas neurológicas graves e 5% deles têm microcefalia (Devakumar et al., 2018). Algumas crianças apresentam a síndrome típica descrita por Albert Sabin em 1942, com múltiplas 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 congênitas 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 (Lambert; Barragan, 2010).

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 (*ciclo lítico*), 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. *Toxoplasma 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 de inoculação em animais, pesquisam-se taquizoítos no líquido peritoneal (Figura 4.1A) ou cistos no cérebro (Figura 4.1C) ou outros órgãos. Uma alternativa de menor sensibilidade consiste em semear amostras clínicas em culturas de células de rim de macaco verde

africano (Vero). 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 (chamados de *placas de lise*) na monocamada das células parasitadas. Podem-se também utilizar métodos imunológicos ou moleculares para o encontro do parasito em animais inoculados ou cultivo de células.

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, embora existam diversos ensaios alternativos desenvolvidos com esta finalidade (Dard et al., 2016). Diferentes padrões de resposta de anticorpos retratam as fases aguda, de transição e crônica da infecção. O perfil da fase aguda caracteriza-se pela presença de anticorpos das classes IgM, IgA, IgE e IgG contra o parasito (Figura 4.6). Caracteriza-se por títulos médios ou altos de anticorpos de classe IgG ou rápida elevação de títulos ao se obterem amostras pareadas com intervalo de 2 semanas. Os anticorpos IgG de fase aguda são em geral de *baixa avides*, característica que pode ser avaliada em ELISA com o acréscimo de agentes caotrópicos. No perfil de transição, encontram-se altos títulos de anticorpos de classe IgG, com avides 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, que se mantém por décadas. Encontram-se aqui *baixos títulos de anticorpos IgG de alta avides* na ausência de anticorpos das demais classes.

A infecção aguda, acompanhada ou não de sintomas, é diagnosticada com a detecção do perfil sorológico. 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 sorológico de infecção crônica, desde que elas sejam imunocompetentes, pois a vigência de uma infecção crônica protege os humanos contra novas infecções agudas. Entretanto, as gestantes soronegativas devem ser acompanhadas durante a gravidez, para a detecção precoce de eventual soroconversão, já que a transmissão congênita ocorre na vigência de infecção aguda. 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 específica) 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 sorológico de infecção aguda 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,

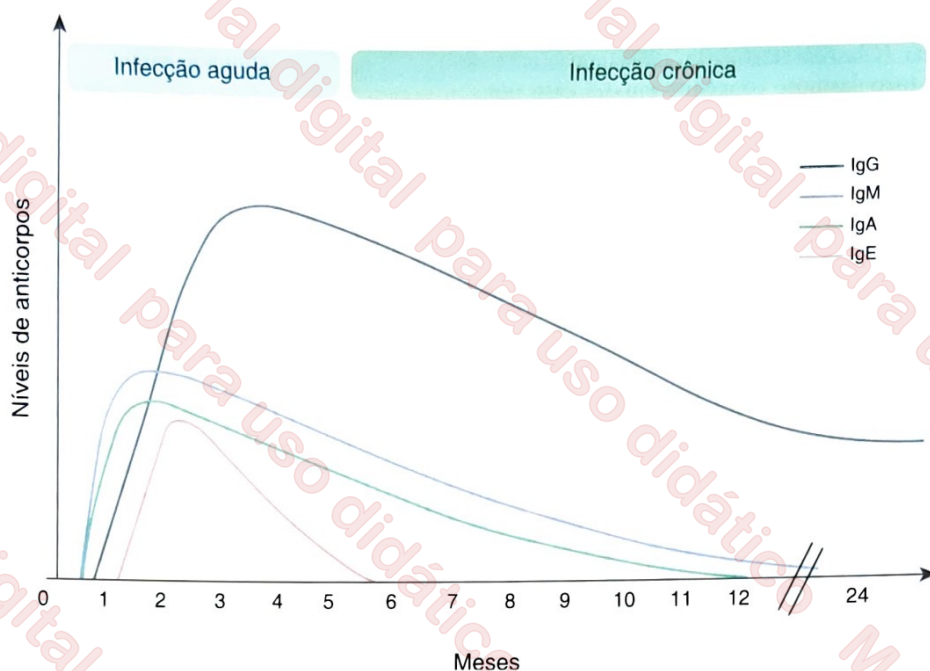


FIGURA 4.6 Cinética da resposta de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* na infecção humana. Na exposição primária, encontram-se imunoglobulinas de diferentes classes, com o aparecimento de IgM e IgA na primeira semana. IgG surge por volta da terceira semana, com um pico de concentração em 2 a 3 meses e persistência por muitos anos. Adaptada de Dard et al., 2016.

reativação de toxoplasmose em pacientes com AIDS que apresentam um típico perfil de infecção crônica. Nesses casos, o isolamento do parasito e a detecção de seu DNA por PCR podem ser alternativas úteis, ainda que de baixa sensibilidade. Em tais 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, o exame de fundo de olho pode indicar o diagnóstico clínico, e títulos de anticorpos IgE elevados no humor aquoso são altamente sugestivos do diagnóstico. A produção intraocular de anticorpos pode ser avaliada com a medida simultânea de anticorpos em amostras de soro e humor aquoso, calculando-se o coeficiente de Goldmann-Witmer: (concentração de anticorpos específicos de classe IgG no humor aquoso/concentração de anticorpos específicos de classe IgG no soro) dividida por (concentração de IgG total no humor aquoso/concentração de IgG total no soro). A produção intraocular de anticorpos específicos contra *Toxoplasma* é confirmada por um coeficiente de Goldmann-Witmer superior a 3 (Garweg, 2005). 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 fólico. Uma alternativa em pacientes 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 fim 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. O tratamento precoce, iniciado até 3 semanas após a soroconversão, reduz o risco de infecção congênita, mas não há evidência conclusiva de associação entre o tratamento pré-natal e a redução de risco de manifestações clínicas no recém-nascido (SYROCOT Study Group et al., 2007).

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). Estima-se a incidência global de toxoplasmose congênita em 1,5 caso por 1.000 nascidos vivos, com a maior incidência (cerca de 3,4 por 1.000 nascidos vivos) na América Latina.

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 é geralmente identificado como a principal via de infecção (Jones et al., 2009). Nos EUA, cerca de 50% das infecções podem ser pela ingestão de carne contaminada (Hill; Dubey, 2016), ao passo que no Brasil 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). Entretanto, a contribuição exata de cada via de transmissão é difícil de ser determinada. A contaminação de carnes produzidas para alimentação depende largamente dos processos de criação dos animais. A carne de animais criados em confinamento raramente contém cistos teciduais de *Toxoplasma*, enquanto animais não confinados são mais frequentemente infectados. Em um exemplo extremo, carne de frangos criados em confinamento e com grande controle sanitário em indústrias avícolas raramente está contaminada; entretanto, é frequente encontrar 100% das galinhas e frangos criados em quintais, sítios e fazendas infectados por *T. gondii*. Outras formas de aquisição da toxoplasmose humana, mais raras, são o aleitamento materno, a transfusão de hemoderivados e o transplante de órgãos e tecidos.

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 cortes de carne bovina contendo cistos teciduais a temperaturas iguais ou superiores a 63°C é suficiente para inativá-los imediatamente; para a carne moída, recomenda-se temperatura superior a 71°C. 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. 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). Os vegetais e as hortaliças crus devem ser cuidadosamente lavados antes de seu consumo.

Gestantes e pacientes com comprometimento imunológico, que representam os grupos sob risco de complicações clínicas graves, devem ser particularmente estritos no seguimento das medidas profiláticas sugeridas na Tabela 4.1. 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*. A profilaxia deve ser mantida por pelo menos 3 meses ou até a elevação sustentada da

TABELA 4.1 Medidas profiláticas contra a toxoplasmose.

Contato com carne crua

- Evitar o consumo de carnes cruas ou malpassadas, 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 de 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 essa tarefa a outros
- Os tanques de areia de parques 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/ μ l sangue, recomenda-se o uso de quimioprofilaxia (geralmente com sulfametoxazol-trimetoprima).

Investigação de surtos

- Definir a fonte de infecção é o objetivo central da investigação de surtos, com vistas à prevenção de novos casos. No Brasil, a maioria dos surtos investigados resultou da contaminação de reservatórios de água com oocistos. Sempre que possível, recomenda-se isolar o agente.

contagem de linfócitos T CD4 acima de 200 células por microlitro de sangue. O esquema profilático mais utilizado emprega sulfametoxazol (800 mg/dia) e trimetoprima (160 mg/dia), com eficácia entre 70 e 80% (Nascimento et al., 2001). O tratamento precoce 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, mas uma vacina com parasitos vivos atenuados da cepa 48 (Toxovax) está disponível para uso veterinário. É administrada a fêmeas de ovinos semanas antes da fertilização para a prevenção da toxoplasmose durante a gestação, que frequentemente leva a infecções congênitas e ao abortamento, com grandes prejuízos econômicos (Innes, 2010). A proteção conferida por uma única dose parece perdurar por toda a vida do animal. Várias outras vacinas para uso veterinário estão atualmente em desenvolvimento, com alguns resultados preliminares muito promissores (Hiszczynska-Sawicka et al., 2014)

PARASITOLOGIA EM FOCO

Invasão de células hospedeiras por *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* são capazes de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro. Usando microscopia eletrônica, observou-se que, durante a invasão, a membrana do taquizoíto une-se de maneira íntima à membrana da célula

hospedeira. Esta estrutura, chamada de junção, também pode ser visualizada durante a invasão de células hospedeiras por merozoítos de *Plasmodium* e *Babesia*, e esporozoítos de *Toxoplasma*, *Plasmodium* e *Eimeria*, todos pertencentes ao subgrupo Apicomplexa. Determinar os componentes moleculares da

PARASITOLOGIA EM FOCO (continuação)

junção é um objetivo antigo em estudos de protozoologia molecular. Durante muito tempo considerou-se que deveria existir um receptor muito conservado na célula hospedeira, com expressão em vários tipos celulares, já que parasitos apicomplexos invadem desde eritrócitos (*Plasmodium*) a qualquer célula nucleada (*Toxoplasma*). A este receptor se ligaria um ligante do parasito, provavelmente uma proteína transmembranar conectada ao glideossomo, já que tais parasitos entram na célula de maneira ativa e dependente de actina.

Em 2005, dois grupos demonstraram que proteínas RON de taquizoítos são localizadas na junção durante a invasão, e que uma proteína transmembranar, AMA1, forma um complexo proteico com a RON2 (Alexander et al., 2006; Lebrun et al., 2005). Mais tarde, foi demonstrado que as proteínas RON2, RON4 e RON5 são injetadas pelo parasito na célula-alvo e que RON2 é inserida na membrana da célula-alvo (Besteiro et al., 2009), levando à proposição do modelo de invasão de apicomplexos em que a RON2 serve de receptor para a AMA1, e que este é o complexo estrutural da junção. A ligação forte entre RON2 e AMA1 foi confirmada por estudos de biologia estrutural (Tonkin et al., 2011), reforçando o modelo proposto.

Ao passo que evidências bioquímicas dão suporte ao modelo AMA1-RON de invasão, experimentos genéticos desafiam o modelo. Taquizoítos de *Toxoplasma* e merozoítos e esporozoítos de *Plasmodium* geneticamente modificados, com o gene da AMA1 deletado do genoma, são capazes de invadir células hospedeiras com a formação de uma junção (Bargieri et al., 2013). Estes resultados questionam o papel da AMA1 como componente estrutural da junção. Taquizoítos de *Toxoplasma* sem o gene da AMA1 aumentam a expressão de parálogos desta proteína, sugerindo que a função dela possa ser compensada e explicando como estes parasitos mantêm a capacidade de invasão (Bargieri et al., 2013). Entretanto, os plasmódios não têm parálogos da AMA1 em seu genoma. Além disso, ainda não foi encontrada uma conexão entre a AMA1 e o glideossomo.

Mesmo com dados genéticos questionando o modelo AMA1-RON de invasão, este é ainda o modelo mais aceito. Restam, no entanto, questões em aberto. A identificação da conexão molecular entre o complexo AMA1-RON e o glideossomo é tema importante de estudos. Ainda é um desafio explicar como o plasmódio é capaz de invadir células hospedeiras sem a AMA1. Estudos usando taquizoítos de *Toxoplasma* demonstram que a invasão de células hospedeiras ocorre mesmo na ausência de outros componentes até pouco tempo considerados essenciais, como MIC2, MyoA e actina (Andenmatten et al., 2013). Estes dados têm contribuído para discussões sobre possíveis mecanismos de invasão diferentes do modelo atual, com maior participação da célula hospedeira na geração da força mecânica para a internalização (Andenmatten et al., 2013; Bargieri et al., 2014).

Referências bibliográficas

- Alexander DL, Arastu-Kapur S, Dubremetz JF, Boothroyd JC. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*. 2006;5:1169-73.
- Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ et al. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*. 2013;10:125-7.
- Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N et al. Host cell invasion by Apicomplexan parasites: the junction conundrum. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004273.
- Bargieri DY, Andenmatten N, Lagal V et al. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat Commun*. 2013;4:2552.
- Besteiro S, Michelin A, Poncet J et al. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000309.
- Lebrun M, Michelin A, El Hajj H et al. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol*. 2005;7:1823-33.
- Tonkin ML, Roques M, Lamarque MH et al. Host cell invasion by Apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*. 2011;333:463-7.

Referências bibliográficas

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005;52:399-451.
- Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ et al. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*. 2013;10:125-7.
- Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N et al. Host cell invasion by Apicomplexan parasites: the junction conundrum. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004273.
- Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:463-85.
- Bogdan C, Rölinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today*. 1999;15:22-8.
- Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol*. 2009;39:935-46.
- Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. 1998;28:3-9.
- Coppens I. *Toxoplasma*, or the discovery of a heterophage. *Trends Parasitol*. 2014;30:467-9.
- Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends Parasitol*. 2016;32:492-506.
- De Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:326-9.
- Delorme-Walker V, Abrivard M, Lagal V et al. Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. *J Cell Sci*. 2012;125:4333-42.
- Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:e1-e13.
- Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2009;39:877-82.
- Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*. 1998;28:1007-13.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*. 2012;34:793-813.
- Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*. 2010;26:190-6.
- Ferreira MU, Hiramoto RM, Aureliano DP et al. A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:171-6.
- Frénil K, Dubremetz JF, Lebrun M, Soldati-Favre D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:645-60.
- Garweg JG. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol*. 2005;27:61-8.
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992;114:136-44.
- Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:615-45.
- Henríquez SA, Brett R, Alexander J et al. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16:122-33.

- Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Moura RC et al. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:287-9.
- Hide G, Morley EK, Hughes JM et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2009;136:1877-85.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control. *Microbiol Spectr*. 2016;4.
- Hiszczyńska-Sawicka E, Gatkowska JM, Grzybowski MM, Długońska H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. *Parasitology*. 2014;141:1365-78.
- Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*. 2010;57:1-7.
- Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan Jr WJ. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75:2355-73.
- Jones JL, Dargelas V, Roberts J et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49:878-84.
- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I et al. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*. 2009;323:530-3.
- Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*. 2010;12:292-300.
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*. 2002;18:198-201.
- McFadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. *Int J Parasitol*. 2017;47:137-44.
- McLeod R, Kieffer F, Sautter M et al. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:320-44.
- Melzer T, Duffy A, Weiss LM, Halonen SK. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for *Toxoplasma* vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect Immun*. 2008;76:4883-94.
- Nascimento LV, Stollar F, Tavares LB et al. Risk factors for toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients: a case-control study in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001;95:587-93.
- Neva FA, Brown HW. *Basic clinical parasitology*. 6. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994.
- Petersen E, Vesco G, Villari S, Buffolano W. What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses Public Health*. 2010;57:8-17.
- Rougier S, Montoya JG, Peyron F. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: a questionable dogma? *Trends Parasitol*. 2017;33:93-101.
- Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:504-12.
- Steinfeldt T, Könen-Waisman S, Tong L et al. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000576.
- SYROCOT Study Group, Thiébaud R, Leproust S et al. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007;369:115-22.
- Tonkin ML, Roques M, Lamarque MH et al. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*. 2011;333:463-7.

Leitura sugerida

- Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:463-85.
- De Souza W, Belfort Jr R. *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2014. 214p.
- Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:615-45.