

A sinalização purinérgica no contexto da fisiopatologia da toxoplasmose

Nathieli Bianchin Bottari

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

BOTTARI, N. B. A sinalização purinérgica no contexto da fisiopatologia da toxoplasmose. In: CARDOSO, A. M., MANFREDI, L. H., and MACIEL, S. F. V. O., eds. *Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas* [online]. Chapecó: Editora UFFS, 2021, pp. 287-305. ISBN: 978-65-86545-47-0. <https://doi.org/10.7476/9786586545494.0016>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO CONTEXTO DA FISIOPATOLOGIA DA TOXOPLASMOSE

Nathieli Bianchin Bottari

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no conhecimento e na prática médica, as doenças parasitárias continuam a ser um relevante problema de saúde global e uma das causas mais importantes de morbidade em crianças e adultos imunocomprometidos. Entre as principais enfermidades de importância clínica, incluem-se as causadas por protozoários, dos quais se destaca o *Toxoplasma gondii*, um parasito cosmopolita que acomete tanto os seres humanos como os animais.

O *T. gondii* é um parasito com ampla distribuição geográfica e grande potencial zoonótico que ocasiona a doença toxoplasmose em humanos. Os principais eventos durante a infecção por *T. gondii* incluem a entrada do microrganismo, invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro, evasão das respostas imunes e finalmente lesão tecidual.

Recentes desenvolvimentos na área da biologia molecular forneceram ferramentas importantes para elucidar a sobrevivência e a replicação parasitária dentro da célula hospedeira, bem como as estratégias de resistência desenvolvidas pelo parasito a fim de perpetuar-se nas células. Estudos têm demonstrado a compreensão do papel desempenhado pela sinalização purinérgica contra inúmeros invasores intracelulares, incluindo o *T. gondii*, e como esta via de

sinalização poderá ser uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de novas estratégias contra esse patógeno.

As respostas imunes contra o *T. gondii* resultam na liberação ativa de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares pelas células danificadas, especialmente o nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) e o nucleosídeo correspondente a adenosina, que culminam em respostas celulares com características únicas, ativando ou inibindo receptores purinérgicos. Dessa forma, neste capítulo, faremos uma breve discussão sobre a sinalização purinérgica no contexto da patogênese da toxoplasmose e como este sistema orquestra respostas imunológicas e funções celulares efetoras no combate à infecção pelo parasita *T. gondii*.

Etiologia da toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário onipresente que integra um dos grupos mais importantes do filo Apicomplexa e é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença clínica que afeta em torno de 30% da população mundial (Montoya; Lisenfeld, 2004; Dubey, 2012 a,b).

A infecção causada pelo parasito *T. gondii* constitui atualmente uma das zoonoses mais difundidas no mundo, uma vez que um terço da população mundial, aproximadamente, é soropositivo para toxoplasmose (Sibley, 2003). Apesar de o *T. gondii* infectar cronicamente os seres humanos, a prevalência da infecção está diretamente relacionada a fatores como exposição ambiental, hábitos alimentares, predisposição genética e clima tropical (Mack *et al.*, 1999).

A toxoplasmose pode ser transmitida ao homem, que é considerado o hospedeiro definitivo no ciclo biológico do parasito, por diferentes meios de transmissão, os quais incluem: ingestão de oocistos lançadas no meio ambiente através das fezes de gatos; ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas; transmissão vertical, em que as formas infecciosas do *T. gondii*, chamadas de taquizóitos, são transferidas para o feto via transplacentária ou leite materno; forma acidental através de transplante de sangue ou órgãos (Hill; Dubey, 2002).

A maioria das infecções em adultos não ocasiona complicações graves e são geralmente assintomáticas. Por outro lado, em pacientes imunossuprimidos, tais como HIV positivos, pacientes com câncer ou sob uso de imunossupressores a

toxoplasmose, apresenta-se de forma aguda, podendo ocasionar, em alguns casos, a encefalite toxoplásmica ou evoluir para uma fase crônica da doença, com quadros como a toxoplasmose ocular e a neurotoxoplasmose, que provoca lesões necróticas no bulbo olfatório e cérebro respectivamente (Wang *et al.*, 2017).

Outra população de risco são as gestantes. Na toxoplasmose congênita, que pode ocorrer quando a mãe adquire a infecção durante a gravidez, a parasitemia induz a placentite seguida por propagação de taquizoítos para o feto, caracterizando a transmissão vertical (Montoya; Remington, 2008). As crianças infectadas pelo *T. gondii* podem desenvolver quadros de microcefalia, hidrocefalia, calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardo mental e em alguns casos psicomotor (Remington *et al.*, 2005).

Patogenia da infecção

A capacidade de infecção e disseminação do *T. gondii* deve-se às características exclusivas deste parasito. A primeira característica que diferencia o *T. gondii* dos demais protozoários é a capacidade de infectar qualquer tipo de célula nucleada. Isto é, com exceção das hemácias, todas as células do organismo tornam-se alvos do parasita (Barragan; Sibley, 2003). Essa habilidade garante, ainda, uma ampla diversidade de propagação, já que, além de humanos, outros mamíferos, como cães, gatos, golfinhos, e até mesmo aves podem adquirir a toxoplasmose (Dubey, 2012a).

O segundo fator que contribui para a propagação da infecção pelo *T. gondii* é que este protozoário pertence ao filo Apicomplexa, tornando-o um parasita intracelular obrigatório (agem igual aos vírus) com capacidade de ocasionar doenças graves em humanos, assim como outros protozoários que fazem parte deste filo, a exemplo do *Plasmodium*, causador da Doença de Chagas e do *Cryptosporidium* agente etiológico da criptosporidíase, uma doença que causa diarreia severa em humanos (Weiss; Kim, 2007).

Diferentemente das bactérias, vírus e outros parasitas que dependem do hospedeiro para infectar as células, o *T. gondii* não depende de processos mediados pelo hospedeiro. Em vez disso, ele desliza entre os espaços intra e extracelulares para navegar pelo ambiente, atravessar as barreiras teciduais e penetrar nas células hospedeiras (Barragan; Sibley, 2002). A natureza conservada da

mobilidade de deslizamento deste parasita atesta a sua eficiência em promover uma existência intracelular. Embora aparentemente complicadas, as ações coordenadas de secreção, translocação e liberação seletiva de moléculas adesivas permitem ao parasita a fixação e migração ativamente nos tecidos.

Desse modo, o *T. gondii* transita por diversos tecidos e órgãos, tais como o fígado, os rins, o cérebro, os pulmões, as musculaturas esquelética e cardíaca (Dubey, 2012a). No entanto, o *T. gondii* tem tropismo por tecidos altamente vascularizados, como o sistema nervoso central (SNC). Neste local, o *T. gondii* se diferencia em uma forma infecciosa dormente, os chamados cistos teciduais, estabelecendo uma infecção crônica vitalícia (Sullivan *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que o *T. gondii* utiliza as células imunes inatas (macrófagos e células dendríticas) como verdadeiros “veículos de transporte”, a fim de migrar para locais imunologicamente privilegiados, como o ambiente protegido do SNC, constituindo uma infecção latente (Hitziger *et al.*, 2005).

O parasita *T. gondii* sobrevive dentro das células hospedeiras superando diversos mecanismos antimicrobianos naturais, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (ON), fusão do lisossoma (ao vacúolo parasitóforo), indução da morte da célula hospedeira e secreção de citosinas pró-inflamatórias (Denkers *et al.*, 2003). Concomitantemente, o *T. gondii* desencadeia a ativação de fatores de transcrição e vias de sinalização anti-inflamatórias na célula hospedeira, induzindo a super expressão de receptores envolvidos na migração, ativação e regulação efetora das células imunes. Esse delicado equilíbrio entre a sobrevivência do parasita e a homeostase celular do hospedeiro é mediado por moduladores da imunidade e evitam danos teciduais excessivos.

Evasão do parasita à resposta imune

Apesar da capacidade do *T. gondii* em subverter os mecanismos do sistema imunológico e disseminar-se rapidamente nos tecidos estabelecendo a fase latente da infecção (crônica), a persistência do *T. gondii* nos tecidos, por outro lado, compromete diretamente o tratamento da toxoplasmose, já que o alcance farmacológico e as respostas imunes em tecidos imunologicamente protegidos são mais complexos (Lambert; Barragan, 2010).

O primeiro mecanismo de escape do *T. gondii* envolve um processo que modifica o conteúdo das vesículas fagocíticas, tornando as membranas das células fagocíticas mais permeáveis. Assim, o *T. gondii* utiliza suprimentos de nutrientes que podem ser encontrados nas vias endocíticas ou exocíticas da célula hospedeira, como o nucleosídeo adenosina (Mahamed, 2012 ab). O mecanismo molecular por trás dessa modificação não está bem estabelecido; no entanto, o parasita secreta um grande número de proteínas roptrias (ROP) e uma segunda classe de organelas secretoras chamadas de grânulos densos, muitos dos quais são direcionados para a membrana do vacúolo fagocítico (Długońska, 2004). Como essas proteínas se juntam para aumentar a permeabilidade permanece um assunto incerto.

Após a entrada ativa do *T. gondii* nas células hospedeiras, os *taquizóitos* permanecem dentro do vacúolo parasitóforo e escapam da morte pelas células do sistema imune inibindo a fusão de organelas ácidas. Essa é outra estratégia de resistência utilizada pelo *T. gondii* e inclui a inibição da fusão do fagolisossomo o que impede a acidificação do vacúolo parasitóforo e o ataque das enzimas lisossômicas proteolíticas (Mordue, 1997; Ding *et al.*, 2004; Akerman; Muller, 2005).

O *T. gondii* também modula a produção de EROs da célula hospedeira e mediadores inflamatórios envolvidos no controle da infecção. Isso só é possível, porque o *T. gondii* expressa enzimas antioxidantes, incluindo catalases e peroxidases, para se proteger contra a atividade das EROs liberadas pelas células do hospedeiro (Ding *et al.*, 2004; Akerman; Muller, 2005).

Enquanto a produção de EROs contribui para a eliminação do patógeno, destruindo as estruturas do parasita por oxidação, este efeito é potencializado pela formação de ON (Flannagan *et al.*, 2009). O ON é um importante mediador da resistência à infecção por *T. gondii* nas respostas inatas e adaptativas, produzidas principalmente por fagócitos ativados, os quais controlam a replicação e diferenciação dos taquizóitos em bradizoítas císticos e o estabelecimento da doença crônica (Denkers, 2003).

Por fim, a sinalização de cálcio também é uma importante válvula de escape para *T. gondii*, uma vez que o parasita requer mobilização de cálcio (Ca^{2+}) para a invasão e saída nas células hospedeiras, estabelecimento nos vacúolos parasitóforos e também recrutamento de organelas. Dessa forma, a interferência

na sinalização de Ca^{2+} pode prevenir a invasão do parasita nas células hospedeiras (Caldas *et al.*, 2007).

A resposta imune desencadeada na infecção primária pelo *T. gondii* é sinalizada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*), moléculas essenciais para microrganismos e tipicamente não expressas pelas células hospedeiras (Kopp; Medzhitov, 2003). Os PAMPs são reconhecidos por receptores TLRs (TLR, do inglês *Toll-like Receptors*) presentes nos macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. No caso do *T. gondii*, é o TLR11 que reconhece e controla a sinalização de eventos intracelulares (Plattner *et al.*, 2008). Além do TLR11, estudos demonstram que outros TLRs, especialmente TLR2 e TLR4, podem ser ativados em resposta contra o parasita (Debierre-Grockiego *et al.*, 2007). Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que animais deficientes (nocaute, do inglês *knockout*) para o TLR11 expressam níveis de interleucina 12 (IL-12) reduzidos, o que diminui as respostas imunológicas contra o *T. gondii* e torna as células extremamente vulneráveis à infecção (Yarovinsky, 2008). Embora experimentos *in vitro* tenham revelado que o *T. gondii* ativa TLR2 e TLR4, a deficiência de receptores TLR2 ou TLR4 tem pouco ou nenhum efeito sobre a IL-12, mas parece estar envolvida na regulação do fator de necrose tumoral (TNF) e na produção de outras citosinas durante a toxoplasmose experimental (Sibley *et al.*, 1991).

Além dos TLRs, uma proteína adaptadora, a MyD88, estimula a transcrição nuclear de altos níveis de IL-12 e interferon gama (IFN- γ) pelas células do sistema imune inato. Estudos demonstraram que a ativação da MyD88 é essencial para a proteção contra o *T. gondii* e para a geração de respostas eficazes das células T. Por outro lado, a deficiência da MyD88 em camundongos *knockout* (MyD88 $^{-/-}$) impediu a liberação de citosinas pró-inflamatórias e os animais não conseguiram estabelecer uma forte resposta Th1 (Scanga *et al.*, 2002).

A resposta imune contra o parasita é determinada pela secreção de IL-12 e IFN- γ pelas células imunes inatas e adaptativas. A IL-12 desempenha um papel importante na regulação e na produção de IFN- γ pelas células assassinas naturais (NK, do inglês *natural killer*) e linfócitos T (Pifer; Yarovinsky, 2011). Ensaios experimentais demonstram que, na ausência de IL-12, os animais são mais suscetíveis ao *T. gondii*, e o bloqueio da IL-12 durante as fases aguda ou crônica resulta na replicação descontrolada do parasita (Gazzinelli *et al.*, 1993).

A identificação do IFN- γ como regulador importante da imunidade mediada por células para *T. gondii* foi uma descoberta chave que impulsionou para um enorme progresso na identificação dos principais mecanismos efetores e de reconhecimento para a resistência do hospedeiro contra o *T. gondii*. A falta de IFN- γ durante o início da resposta imune ao parasita ou o bloqueio do IFN- γ durante a fase crônica resulta em rápida mortalidade celular e maior susceptibilidade à infecção (Suzuki *et al.*, 1988).

Outras citosinas como a interleucina 1 beta (IL-1 β) e a IL-18 são mediadores cruciais da inflamação durante a toxoplasmose, e um controle defeituoso de sua liberação pode evoluir para um dano celular grave. No entanto, os mecanismos que regulam a secreção de IL-1 β e IL-18 são parcialmente indefinidos. Ambas as citosinas são produzidas durante a infecção como precursores citoplasmáticos inativos. O processamento para a forma ativa é mediado pela enzima caspase-1, que, por sua vez, é ativada pelo complexo multiproteico, o inflamassoma (Broz; Dixit, 2016).

Recentemente, estudos têm evidenciado que o reconhecimento de patógenos, como o *T. gondii* por monócitos, macrófagos e células dendríticas através dos TLRs, desencadeia eventos intracelulares que levam à indução da síntese da citosina pró-inflamatória pró-IL-1 β e também estimulam a secreção de ATP, o qual, através do receptor purinérgico, estimula a ativação do inflamassoma (Piccini *et al.*, 2008). O inflamassoma NLRP3 é desencadeado por condições de estresse citosólico, como afluxo de K⁺, vazamento de componentes do lisossomo, dano mitocondrial e produção de EROs (Yarovinsky *et al.*, 2008; He *et al.*, 2016).

Em testes que utilizaram macrófagos isolados de camundongos, foi possível comprovar que a ativação da sinalização purinérgica pelo ATP é estritamente necessária como um segundo sinal para o processamento e secreção da IL-1 em resposta a estímulos extracelulares (Correa *et al.*, 2010). A ativação do receptor P2X7 por ATP inibe o crescimento de *T. gondii* em macrófagos e contribui para a eliminação do parasito pela produção de EROs e pela fusão do lisossomo com o vacúolo parasitóforo. Além disso, o ATP ativa o inflamassoma NLRP3, que aumenta a produção de IL-1 β (via atividade da caspase-1), levando à geração de ROS mitocondrial como uma resposta pró-inflamatória antiparasitária (Moreira-Souza *et al.*, 2017), o que se verifica na Figura 1.

A produção de EROs é um dos mecanismos microbicidas mais potentes contra patógenos intracelulares. Contudo, o *T. gondii* bloqueia eficientemente

a produção de EROs para sobreviver e escapar dos mecanismos imunes do hospedeiro (Ding *et al.*, 2004). Assim, estímulos que atuam em diferentes receptores de detecção de patógenos convergem em uma via comum, em que a externalização do ATP é o primeiro passo dentre inúmeros eventos intracelulares desencadeados pela sinalização purinérgica.

Como o ATP modula as respostas imunes e inflamatórias contra o *Toxoplasma gondii*?

Embora a resposta imune seja essencial para controlar a infecção induzida pelo *T. gondii*, a própria resposta imune pode, ao mesmo tempo, ser danosa e causar uma inflamação sistêmica grave levando ao dano tecidual e, por conseguinte, à apoptose. Algumas substâncias de alarme são liberadas em resposta ao tecido lesionado ou na presença do parasita, essas moléculas sinalizam sinais de perigo e são chamados de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *Damage Associated Molecular Pattern*).

Nucleotídeos extracelulares, como a adenosina trifosfato (ATP), são conhecidos por funcionar como DAMPs, atuando na sinalização endógena de moléculas que contribuem para a inflamação e respostas imunológicas (Bours *et al.*, 2006; Coutinho-Silva *et al.*, 2012). Após o dano tecidual ou durante uma inflamação e/ou infecção, muitas células liberam ATP e outros nucleotídeos (Praetorius; Leipziger, 2009).

O ATP atua como um imunomediador pró-inflamatório em vários tipos de células imunológicas envolvidas na defesa contra parasitas, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Elliot *et al.*, 2009). Uma vez no espaço extracelular, o ATP comporta-se como uma substância de alarme, emitindo um “sinal de perigo”, e é rapidamente hidrolisado pela enzima ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, do inglês *ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase*), também conhecida por CD39, em monofosfato de adenosina (AMP). Em seguida, a ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT, CD73) converte o nucleotídeo AMP em adenosina (Yegutkin, 2008). Além da CD39 e CD73, que são as principais enzimas metabolizadoras de nucleotídeos que regulam a imunidade e inflamação, existem outras enzimas associadas à superfície celular envolvidas no catabolismo de nucleotídeos extracelulares, que incluem

fosfatases alcalinas, pirofosfatases e fosfodiesterases, bem como à ecto enzima adenilato-quinase (AK) regeneradoras de ATP e do nucleosídeo-difosfato quinase (Fredholm *et al.*, 2001; Deaglio; Coutinho-Silva, 2011).

Uma variedade de patógenos intra e extracelulares, como *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Vibrio cholera*, possuem uma sinalização purinérgica intrínseca e secretam uma gama de enzimas que metabolizam nucleotídeos, incluindo 5'-NT, AK e ecto-nucleosídeo difosfato quinases (Gounaris; Selkirk, 2005). Entretanto, o *T. gondii*, assim como outros parasitas do filo Apicomplexa, precisa de purinas do hospedeiro, como a adenosina para sintetizar a sua própria adenosina. Igualmente, o *T. gondii* secreta um nucleosídeo trifosfato/difosfato hidrolase (apirase) nos vacúolos endocíticos da célula hospedeira, porém enzimaticamente inativo. Assim, dois caminhos de utilização de purinas foram identificados em *T. gondii*, envolvendo as enzimas hipoxantina-xantina-guanina fosforibosiltransferase (HXGPRT) e AK. A atividade da AK parece ser dez vezes maior do que outras enzimas de resgate de purina, e a adenosina é a fonte preferida de purinas para *T. gondii*. Porém, estudos genômicos comparativos mais detalhados da via de resgate de purinas em várias espécies apicomplexas deverão desvendar rotas alternativas de salvamento de purinas (Krug *et al.*, 1989; Chaudhary *et al.*, 2004).

O receptor P2X7 interfere diretamente na morte do *Toxoplasma gondii*

O ATP pode ativar diretamente duas famílias de receptores de nucleotídeos ligados à membrana, denominados receptores P2. Os membros de ambas as famílias do P2, P2X e P2Y, modulam positivamente a imunidade contra o *T. gondii* pelo controle da migração de neutrófilos aos sítios de infecção, liberação de citosinas, e maturação das células dendríticas (Coutinho-Silva; Ojcius, 2012).

Durante a toxoplasmose, o receptor purinérgico P2X7 funciona como um receptor pró-inflamatório. A expressão do P2X7 na superfície da membrana celular é regulada pela secreção de IFN- γ liberado por macrófagos e células danificadas (Less *et al.*, 2010). A ativação do P2X7 em macrófagos demonstrou estar envolvido com a morte do parasita *T. gondii* (Figura 1) e possui fenômenos semelhante a outras espécies de parasitas intracelulares, como o

Mycobacterium, a *Clamidia*, o *Leishmania* e *Trypanossoma cruzi* (Lammas *et al.*, 1997; Coutinho-Silva *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2009).

A ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular durante a toxoplasmose abre um canal iônico específico para cátions que resulta no influxo de íons Ca^{2+} e sódio (Na^+) e no efluxo de potássio (K^+). A liberação prolongada de ATP pelas células do hospedeiro acaba criando um poro na membrana celular que aumenta ainda mais a concentração de Ca^{2+} intracelular, bem como permite a passagem de moléculas maiores. Essa alteração no ambiente iônico da célula desencadeia várias vias celulares. O mais proeminente na infecção por *T. gondii* é efluxo de K^+ , o qual estimula a formação do inflamassoma, resultando na ativação da caspase-1.

Outras vias são ativadas pelo ATP como o efluxo de K^+ e influxo de Na^+ que ativam a via das proteínas quinases ativada por estresse (SAPK)/c-Jun N-terminal (JNK), resultando na indução de apoptose. O influxo de Ca^{2+} ativa também a fosfolipase D via RhoA, levando à fusão fagossomo/lisossomo e à morte de patógenos intracelulares. O influxo de Ca^{2+} também pode ativar a proteína quinase ativada por mitógeno p38, estimulando vários efeitos a jusante. A fosforilação da p38 leva à montagem da NADPH oxidase na membrana plasmática e à produção subsequente de superóxido (O_2^-), potencializa a ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B) via sinalização do receptor TLR e a subsequente transcrição da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e produção de ON, bem como produção de TNF e IL-6. Também pode levar à fosforilação da proteína de ligação dos elementos de resposta a AMPc (CREB) via cinase ativada por mitógeno e estresse (MSK1). A CREB fosforilada (CREB-P) seqüestra a proteína de ligação a CREB (CBP), um fator de co-transcrição necessário para a transcrição gênica mediada por NF κ B, e inibe a transcrição de genes controlados por NF κ B. A CREB/CBP fosforilada estimula a produção de genes responsivos a cAMP, tais como *Cebpb*, que actuam para modular a resposta inflamatória através da produção de arginase-1 (Arg-1) e IL-10 (Iller *et al.*, 2011).

Várias linhas de evidências em torno do P2X7 seja utilizando camundongos *knockout* para o receptor P2X7 ou a análise de polimorfismos genéticos sustentam a noção de que a atividade do receptor P2X7 é essencial no controle da infecção por *T. gondii*, desencadeando atividades antimicrobianas no ambiente intracelular (como produção de EROS e fusão do lisossomo com o

vacúolo parasitóforo) e estimulando eventos pró-inflamatórios, como a produção de IL-12, IL-1 β e IFN- γ (Corrêa *et al.*, 2017), como mostra a Figura 1.

Além disso, polimorfismos pontuais no receptor humano P2X7 estão diretamente associados à suscetibilidade do hospedeiro em contrair à toxoplasmose congênita ou adquirida, em pacientes imunocompetentes. Além disso, a ausência do P2X7 ou a interrupção da função do receptor P2X7 aumenta a gravidade da infecção com cepas virulentas (RH, tipo I) ou não virulentas (Me-49, tipo II) de *T. gondii* (Jamieson *et al.*, 2010).

Enquanto o ligante natural para os receptores P2X é o ATP, os receptores P2Y são responsivos à ATP, UTP, ADP e UDP, com diferenças na preferência do ligante e afinidades dependendo o subtipo. Por lise celular, exocitose ou estresse mecânico induzido por hipóxia, esses nucleotídeos são liberados no meio extracelular, onde eles ativam os receptores da família P2Y por ligação ao seu domínio extracelular. O ADP é um potente agonista da agregação plaquetária, atuando através dos receptores purinérgicos P2Y1 e P2Y12. A agregação plaquetária leva à amplificação da resposta por meio da liberação secundária de ADP e liberação de mediadores inflamatórios incluindo o ATP. Assim, as ectonucleotidases atuam regulando negativamente várias respostas que afetam a homeostase, a inflamação e a dor. O produto final da reação, o AMP, é hidrolisado à adenosina pela ação da 5'-NT, o que se considera benéfico, pois a adenosina inibe a agregação plaquetária e tem atividade vasodilatadora, promovendo o fluxo sanguíneo.

Estudos envolvendo o receptor P2Y durante a infecção por *T. gondii* ainda são escassos na literatura. Entretanto, um estudo revelou que durante a infecção por *T. gondii* há uma ativação dos receptores P2Y quando estimulados pelos agonistas UTP e UDP. Dentre os receptores envolvidos, o P2Y2, P2Y4 e P2Y6 parecem ser mais envolvidos. Os resultados mostram que a ativação de receptores P2Y atenua a infecção por *T. gondii* em macrófagos induzindo uma saída prematura do taquizóito das células hospedeiras por um mecanismo dependente de Ca²⁺ controlando a infecção por um mecanismo diferente do P2X7 (Moreira-Souza *et al.*, 2015).

A regulação positiva da infecção por *T. gondii* dos receptores P2X e P2Y em macrófagos pode, portanto, ser vista como verdadeiras armadilhas usadas pelo hospedeiro em sua luta contra o parasita. Enquanto o ATP pode mediar as respostas imunes do hospedeiro através da ativação do inflamassoma dependente

de P2X7, outros nucleotídeos através da ligação de P2Y, podem contribuir para as defesas do hospedeiro usando os mediadores inflamatórios EROs e ON.

Adenosina limita a imunopatologia da infecção por *Toxoplasma gondii*

Durante a toxoplasmose, a resposta imune confronta com o *T. gondii*, o que impede a conversão dos bradizoítos em forma de cistos, assim como impede que o parasita permaneça dormente no SNC (Suzuki, 2002). Esse delicado equilíbrio entre a sobrevivência do parasita e a resposta do hospedeiro é mediado tanto pelos mecanismos de evasão do *T. gondii* quanto por modificação no hospedeiro para evitar danos excessivos nos tecidos. Esse papel é bem desempenhado pela adenosina, a qual regula a inflamação e ao mesmo tempo atua como um sinal de dano celular para promover a migração de mais células para locais da infecção e/ou lesão tecidual.

A adenosina extracelular é um nucleosídeo de purina gerado pela desfosforilação seqüencial do ATP pelas ectoenzimas CD39 e CD73 conforme já mencionado. A adenosina exerce seus efeitos ligando-se a quatro diferentes receptores transmembranas: A1, A2A, A2B e A3. O tipo de resposta após a ativação do receptor de adenosina (AR) pelo nucleosídeo depende da célula correspondente. Por exemplo, a sinalização da adenosina através do receptor A1 promove a quimiotaxia de neutrófilos nos locais de infecção e sua adesão ao endotélio inflamado, enquanto a sinalização através do receptor A2A inibe a adesão (Etschig *et al.*, 2006; Barletta *et al.*, 2012).

Os receptores de adenosina são altamente expressos em vários tipos celulares, incluindo células imunes e células residentes no SNC (HASKÓ e CRONSTEIN, 2004). As funções desempenhadas pela adenosina extracelular envolvem tanto a supressão de citosinas pró-inflamatórias como inibe a entrada de leucócitos nos tecidos através da regulação negativa de moléculas de adesão, quimiocinas e citosinas como TNF- α , IL-1 e as EROs desencadeando a produção de citosinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Hasló *et al.*, 1996; Linden, 2001).

Diversos estudos relatam que a deleção ou supressão da enzima CD73 em camundongos *knockout* (CD73 *-/-*) não possui a capacidade de gerar adenosina extracelular, assim os camundongos são menos susceptíveis a infecção crônica pelo *T. gondii*, com menor número de cistos e sensibilidade reduzida à

reativação da infecção no SNC hospedeiro (Mahamed *et al.*, 2012). Observou-se um aumento na expressão de CD73 no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii*, o que promove a diferenciação dos bradizóitos em cistos por um mecanismo dependente da geração de adenosina, uma molécula que é essencial para o ciclo de vida do parasita (Mahamed *et al.*, 2012; Antonioli *et al.*, 2013).

Um deficit na atividade da enzima CD73 pode levar não apenas a depleção de adenosina, mas também ao acúmulo de ATP a montante. Sabe-se que o ATP ativa o NLRP3 inflamassoma NLRP3 através da sinalização do receptor P2X7, levando à liberação de IL-1 β e IL-18 pela via de processamento da caspase-1. É possível que a inibição ou deficiência da enzima CD73, resulte em acúmulo de ATP através de falta de antagonismo.

Embora todos os quatro receptores de adenosina participem na modulação da resposta imune, o receptor A2A tem papel de destaque ao regular vários aspectos da inflamação durante a toxoplasmose. O A2A é responsável por limitar as respostas inflamatórias através da ligação da adenosina. Estudos revelaram que camundongos *knockout* para o receptor A2A exibiram imunopatologia semelhante à dos camundongos *knockout* para CD73 (Mahamed *et al.*, 2015).

Portanto, durante o estágio agudo da infecção, a sinalização da adenosina é necessária para reduzir a inflamação e limitar o dano colateral ao tecido, enquanto a sua depleção após infecção aguda pode inibir a capacidade do parasita de formar cistos e persistir no SNC (Mahamed *et al.*, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A toxoplasmose é uma doença ocasionada pelo protozoário *T. gondii* e afeta um terço da população mundial. O *T. gondii* é um parasito intracelular que infecta e sobrevive nas células imunológicas como macrófagos e em tecidos imunologicamente privilegiados como o SNC. A doença é comumente assintomática, mas apresenta manifestações clínicas graves em pacientes imunocomprometidos. A sinalização purinérgica tem sido descrita como um importante regulador imunológico durante a infecção por *T. gondii*. O sistema purinérgico parece exercer influência direta sobre as funções das células imunes, na secreção de citosinas e na eliminação do *T. gondii*.

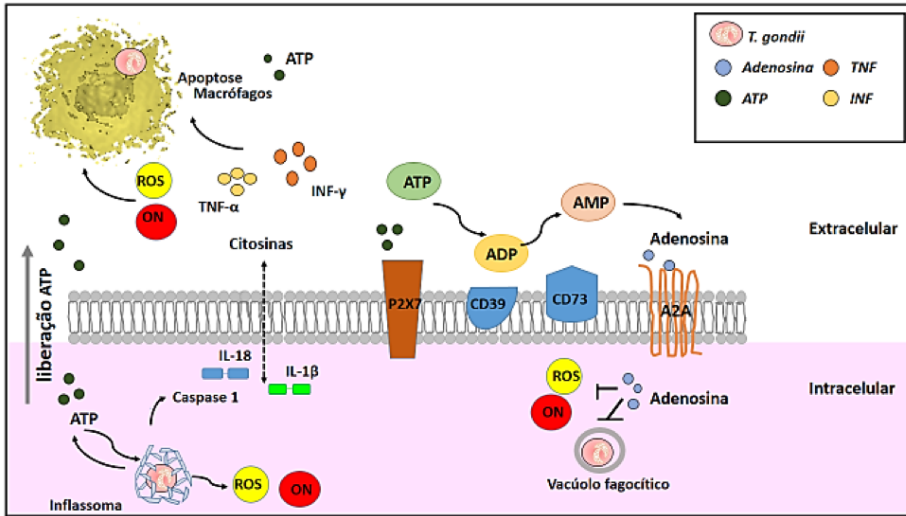
Mediadores purinérgicos, tais como o ATP e a adenosina, são liberados no espaço extracelular como substâncias de alarme em resposta a distúrbios metabólicos ou outros tipos de insultos pelas células e operaram como sinais sensoriais, moldando as respostas imunes. Após a liberação do ATP no espaço extracelular, as enzimas CD39 e CD73 convertem o ATP até a adenosina. A expressão e a atividade das enzimas CD73 e CD39 são influenciadas de acordo com o contexto fisiopatológico da toxoplasmose. Os receptores P1 e P2 expressos na superfície das células do sistema imunológico, também regulam os níveis de ATP e adenosina extracelulares respectivamente. A alteração na homeostase celular devido à presença do *T. gondii* resulta na ativação notadamente do receptor P2X7, que ativa várias vias celulares, incluindo o inflamassoma, que leva à produção de IL-1 β e IL-18 e à via da geração de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio. O envolvimento do receptor P2X7 nessas vias sugere que ele funcione como um regulador positivo, estimulando a inflamação durante a infecção.

De fato, a ausência do receptor P2X7 altera a função da célula imune. Além disso, vários polimorfismos no P2X7 também foram observados entre a população humana, o que indica uma maior susceptibilidade à doença toxoplasmose. Claramente, o receptor P2X7 compreende um importante arsenal do hospedeiro contra o *T. gondii*. Contudo, evidências têm também demonstrado um envolvimento menos acentuado dos receptores P2Y como mediadores da morte celular de *T. gondii*.

O papel da adenosina extracelular na patogênese da toxoplasmose promove a diferenciação e a formação de cistos teciduais no SNC por um mecanismo dependente da geração de adenosina. Além disso, a regulação negativa do receptor de adenosina A2A indica maior susceptibilidade a imunopatologia da toxoplasmose. Assim, a adenosina extracelular é um importante regulador imunológico que limita o dano tecidual colateral e promove a sobrevivência do hospedeiro.

A identificação de estratégias usadas pelo o *T. gondii* para manipular o sistema imunológico envolve uma cascata de eventos intracelulares regulados pelo sistema purinérgico do hospedeiro como mecanismos de defesa. Assim, pode eliminar o parasita e suprimir a infecção, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas direcionadas a receptores purinérgicos e mediadores a jusante.

Figura 1: Modulação da sinalização purinérgica por *T. gondii*



Fonte: autora (2019).

Legenda: ROS – espécies reativas ao oxigênio; ON – óxido nítrico; ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; AMP – adenosina monofosfato.

- * A ativação de macrófagos induz a formação do inflassoma, o qual ativa a proteína caspase-1 que cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em transcritos ativos que estimulam a secreção de citosinas. Células que sofrem apoptose também liberam citosinas, principalmente INF- γ e TNF- α , além de um sinalizar de dano, o ATP. O ATP extracelular é hidrolisado de forma sequencial até adenosina pelas enzimas CD73 e CD39. O nucleotídeo ATP e o nucleosídeo adenosina também podem ser regulados por receptores acoplados a membrana das células, o P2X7 e o A2A. O P2X7 provoca a morte do *T. gondii* através da estimulação da produção de EROs e ON. A adenosina bloqueia a conversão de taquizóitos em bradizóitos além de recrutar mais células imunes para o local da infecção.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signal*, v. 2, p. 595-604, 2006.
- AKERMAN, S. E.; MULLER, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. v.280, p. 564-70, 2005.
- ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKÓ, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*, v. 19, p. 355-367, 2013.
- BARLETTA, K. E. *et al.* Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 32, p. 856-864, 2012.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med*. v. 195, p.1625-1633, 2002.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiology*, v.11, n.9, p. 426-30, 2003.
- BOURS, M. J. *et al.* Adenosine 50 -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. v. 112, p. 358-404, 2006.
- BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. v.16, p. 407-20, 2016.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. v.12, p. 1471-1483, 2007.
- CALDAS, L. A.; *et al.* Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion. *Vet Parasitol*. v.147, p. 210-20, 2007.
- CHAUDHARY, K. *et al.* Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. v. 279, p. 31221-31227, 2004.
- CHAVES, S. P. *et al.* Modulation of P2X7 purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect*. v. 11, p. 842-849.
- CORREA, G. *et al.* Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect*. v. 12, p. 497-504, 2010.
- CORRÊA G; *et al.* Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute murine toxoplasmosis. *Immunobiology*, v. 222, p. 676-83, 2017.
- COUTINHO-SILVA, R. *et al.* 2001. Modulation of P2Z/P2X7 receptor activity in macrophages infected with *Chlamydia psittaci*. *Am. J. Physiol*. v.280, p. C81-C89, 2001.
- COUTINHO-SILVA R. *et al.* Cellular alarms and whispers contribute to the polyphonic melody of danger signals required for immunity. *Microbes Infect*, v.14, p.1239-40, 2012.
- COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection*. v. 14, p.1271-1277, 2012.

DEAGLIO, S. COUTINHO-SILVA, R. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv. Pharmacol.* v. 61, p. 301-332, 2011.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. *et al.* Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* v. 179, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y. *et al.* In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Microbiol.* v. 5, p. 75-83, 2003.

DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v. 39, p. 193-203, 2003.

DING, M. *et al.* The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defense against oxidative injury. *Mol Microbiol.* v. 51, p. 47-61, 2004

DŁUGOŃSKA, H. Molecular modifications of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Pol J Microbiol.* v. 53, p. 45-54, 2004.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans.* Boca Raton, v. 2, p. 313, 2012a

DUBEY, J. P. *et al.* *Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology.* *Parasitology*, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012b.

ELLIOTT, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me

signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* v. 461, 2009.

ELTZSCHIG, H. K. *et al.* Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol.* v.341, p. 73-87, 2006.

FLANNAGAN, R. S. *et al.* Antimicrobial mechanisms of phagocytes and strategies of bacterial evasion. *Nat Rev Microbiol.* v.5, p. 355-66, 2009.

FREDHOLM, B. B. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* v. 53, p. 527-552, 2001.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Interleukin-12 is required for the Tlymphocyte-independent induction of interferon-gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 90, p. 6115, 1993.

GOUNARIS, K.; SELKIRK, M. E. Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host. *Trends Parasitol.* v. 21, p. 17-21, 2005.

HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 2647 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol.* v. 157, p. 4634-4640, 1996.

HASKÓ, G, CRONSTEIN, B. N. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* v. 25, p. 33-39, 2004.

HE, Y. *et al.* Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* v. 41, p. 1012-21, 2016.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* v. 8, p. 634-40, 2002.

HITZIGER, N. *et al.* Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell Microbiol.* v. 7, p. 837-48, 2005.

ILLER, C. M. *et al.* The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases. *PLoS Pathog.* v. 7, 11, 2011.

JAMIESON, S. E. *et al.* Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun.* v. 11, p. 374e383, 2010.

KOPP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* v. 15, p. 396-401, 2003.

KRUG, E. C. *et al.* Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* v. 264, p. 10601-10607, 1989.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: Host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* v. 12, p. 292-300, 2010.

LAMMAS, D. A. *et al.* ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X7) receptors. *Immunity.* v. 7, p. 433-444, 1997.

LESS, M. P. *et al.* P2X7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii*, by Human

and Murine Macrophages. *J Immunol.* v. 15, p. 7040-6, 2010.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* v. 41, p. 775-787, 2001

MACK, D. G. *et al.* HLA- class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol.* v. 29, p.1351-1358, 1999.

MAHAMED, D. A.; MILLS, J. H.; EGAN, C. E.; DENKERS, E. Y.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 109, p.16312-16317, 2012 a.

MAHAMED, D. *et al.* CD73-generated adenosine limits immunopathology during acute *Toxoplasma gondii* (164,17). *J Immunol.* v. 1, S. 164,17, 2012b.

MAHAMED, D. A.; TOUSSAINT, L. E.; BYNOE, M. S. CD73-generated adenosine is critical for immune regulation during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun,* v. 83, p. 721-729, 2015.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD. O. Toxoplasmosis. *Lancet,* v. 363, p. 1965-76, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* v. 47, p. 554-566, 2008.

MORDUE, D. G.; SIBLEY, L. D. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the

mechanism of entry. *J Immunol.* v. 159, p. 4452-9, 1997.

MORREIRA-SOUZA, A. C. A. *et al.* The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. *Front Immunol.* v. 8, p. 1257, 2017.

PICCINI, A. *et al.* ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad.* v. 105, p. 8067-8072, 2008.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends in Parasitology.* v. 27, 2011.

PLATTNER, F. *et al.* *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe.* v. 3, p. 77-87, 2008.

PRAETORIUS, H. A.; LEIPZIGER, J. ATP releasing non-excitable cells, *Purin Sinall.* v. 5, p. 433 – 446, 2009.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIE, P.; DESMONTS, G. *Toxoplasmosis.* In: Remington JS, Baker C, Wilson E, Klein JO (ed.). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 6th edn. WB Saunders: Philadelphia, PA, 2005, p. 947-1091.

SCANGA, C. A. *et al.* Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol.* v. 168, p. 5997-6001, 2002.

SIBLEY, L. D. *et al.* Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. *J Immunol.* v. 147, p. 2340-2345, 1991.

SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii*: perfecting and intracellular life style. *Traffic.* v. 4, p. 581-586, 2003.

SULLIVAN, W. J.; JEFFERS, J. R. V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev.* v. 36, p. 717-733, 2012.

SUZUKI, Y. *et al.* Interferon- γ – the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* v. 240, p. 516-518, 1988.

SUZUKI, Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* v. 185, p. 58-S65, 2002.

WANG, Z. D. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Microbiol.* v. 8, p. 389, 2017.

WEISS, L. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii.* The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Elsevier, Burlington (US), 2007, p. 801.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Lett.* v. 119, p. 17-21, 2008.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide – and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* v. 1783, p. 673-694, 2008.