

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**O PAPEL DA PROTEÍNA CINASE 4 ASSOCIADA AO RECEPTOR DE  
INTERLEUCINA 1 (IRAK4) NA INFECÇÃO PELO PARASITO**

*Toxoplasma gondii*

**SAMANTHA RIBEIRO BÉLA**

BELO HORIZONTE/MG  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**O PAPEL DA PROTEÍNA CINASE 4 ASSOCIADA AO RECEPTOR DE  
INTERLEUCINA 1 (IRAK4) NA INFECÇÃO PELO PARASITO**

***Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia.

**SAMANTHA RIBEIRO BÉLA**

**ORIENTADOR: DR. RICARDO TOSTES GAZZINELLI**

**ORIENTADORA: DRA. LIS RIBEIRO DO VALLE ANTONELLI**

BELO HORIZONTE/MG  
2012

Ao sonho mais  
esperado da minha vida, minha filha, Mariana.

*“Todo saber e todo aumento de nosso saber, em vez de terminar em uma  
solução, dá antes, início a nova dúvida.  
Aumentar o saber significa aumentar as dúvidas.  
E a cada resposta nova, nova pergunta se segue.”*

*(Herman Hesse)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por todos os momentos de felicidade e também por todos os momentos difíceis que me fizeram realmente crescer durante esta longa caminhada. Pela força, perseverança, paciência e alegria nos momentos de dedicação a este trabalho que não foi fácil, mas que me fez confiar ainda mais em mim. Agradeço também por ter colocado em minha trajetória pessoas que tenho muito orgulho em chamar de amigos e que com certeza tiveram papel fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha mãe pelas palavras de incentivo nos momentos que pensei em desistir, e que não foram poucos! Minha irmã pela admiração. Aos meus maiores amores, meu marido pelo companheirismo e pelas inúmeras maneiras de me mostra que eu seria capaz de finalizar mais este objetivo profissional, e a maior, mais importante e mais amada produção da minha vida, Mariana, por ser o ar que eu respiro! Meus amigos que são muitos graças à Deus, sejam eles de pertinho, perto, longe e bem longe, pela infinita torcida para que tudo desse certo, muito obrigada!

Muito obrigado, ao meu orientador, Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, que me permitiu trabalhar em seus laboratórios ampliando meus conhecimentos. Agradeço pela paciência e envolvimento neste trabalho e também por me proporcionar o contato com pesquisadores importantes na minha área.

Minha orientadora Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, pela dedicação e esforço no desenvolvimento desta tese como um todo, prática e intelectual. Agradeço pelas palavras carinhosas nos momentos em que mais precisei. Por nos tornarmos amigas pessoais e dividirmos momentos incríveis na realização de um sonho. Obrigada!

Aos meus colaboradores, Dr. Sérgio Costa, Dra. Fernanda Souza, Dra. Rosa Arantes e Dra. Rima McLeod, pelos materiais necessários para a realização deste trabalho, pelos esforços constantes e pelo tempo cedido a este trabalho que é nosso. Em especial a Dra. Miriam Santos Dutra pela disponibilidade em me ajudar na parte prática do final dos experimentos, sendo compreensiva e extremamente proativa.

Meus colegas de laboratório, todos sem exceção! Em especial, Luara, Guilherme, Bárbara, Marco Ataíde, Bruno, Rafael Polidoro, Fabiana e Humberto, por serem mais que colegas de trabalho, mas sim amigos de verdade! Obrigado por sempre estarem dispostos em me ajudar, me escutar, me animar e principalmente por deixarem a convivência sempre tão divertida!

Clécia, Lorena, Marina, Carla e Fernanda, por fazerem tudo pra todos sempre. Pela proatividade e pelas conversas gostosas durante o café da tarde, do qual já sinto tanta falta! Obrigada.

Agradeço as agências financiadoras NIH, CNPq, CAPES e Fapemig.

## RESUMO

A cinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK4) é um dos membros da família IRAK com um papel importante na produção de mediadores inflamatórios. Esta cinase é subsequente a molécula adaptadora MyD88 na via de sinalização dos receptores Toll (TLR). Toxoplasmose é uma zoonose importante que atinge cerca de um terço da população mundial com consequências graves para indivíduos imunossuprimidos e para doença congênita. A produção de mediadores inflamatórios é essencial para a resistência do hospedeiro a infecção por *T. gondii*, e indivíduos deficientes para a molécula IRAK4, tanto modelo murino quanto humano, tornam-se interessantes para a investigação do papel desta molécula durante a infecção. Assim, nós investigamos o papel da cinase IRAK4 durante a infecção oral de animais deficientes e controles, com a cepa ME49 de *T. gondii*. Animais IRAK4<sup>-/-</sup> apresentaram alta morbidade, perda de peso, parasitismo e uma acelerada mortalidade quando comparados com animais controles. Análise histopatológica mostrou que cérebro de animais deficientes apresentaram inúmeros focos de necrose associados com o parasito e ausência de infiltrado inflamatório perivascular. Avaliação esplênica apresentou uma redução significativa dos folículos e centros germinativos nos animais deficientes infectados, corroborando com o reduzido número de células B ativadas com capacidade proliferativa nestes mesmos animais, assim como, de linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ . Além disso, tanto o número de monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs), quanto a produção de citocinas (IL-12 e TNF $\alpha$ ) e expressão de moléculas de ativação por estas células, também foram afetados pela infecção em animais deficientes. A resistência à infecção foi restaurada quando animais deficientes infectados foram tratados *in vivo* com IL-12 recombinante. Interessante, em humanos, observamos uma importante associação de dos polimorfismos presentes no gene *IRAK4* (rs1461567 and rs4251513,  $p < 0.023$  and  $p < 0.045$ , respectivamente) com a doença congênita em indivíduos afetados por lesões oculares e/ou cerebrais. Assim, a sinalização via IRAK4 é essencial para a ativação de células da imunidade inata e desenvolvimento de imunidade adquirida efetora para a resistência do hospedeiro a infecção por *T. gondii*.

## ABSTRACT

IL1R-associated kinase (IRAK) 4 is a member of the IRAK family, and has an important role in inducing the production of inflammatory mediators. This kinase is downstream of MyD88, an adaptor protein essential for Toll-Like Receptors (TLRs) function. Herein, we investigated the role of this kinase in IRAK4 deficient mice orally infected with the cystogenic ME49 strain of *T. gondii*. IRAK4<sup>-/-</sup> mice displayed higher morbidity, tissue parasitism and accelerated mortality, when compared to the control mice. Lymphoid follicles and germinal centers from infected IRAK4<sup>-/-</sup> mice were significantly smaller. Consistently, IRAK4<sup>-/-</sup> mice showed a defect on splenic B cell activation and expansion as well as diminished production of IFN $\gamma$  by T lymphocytes. The myeloid compartment was also affected. Both frequency and ability of dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophage to produce IL-12 were significantly decreased, and resistance to infection with *Toxoplasma* was rescued by treating IRAK4<sup>-/-</sup> mice with rIL-12. Additionally, we report the association of IRAK4 haplotype-tagging single nucleotide polymorphisms (tag-SNPs) with the outcome of congenital toxoplasmosis in infected affected individuals (rs1461567 and rs4251513,  $p < 0.023$  and  $p < 0.045$ , respectively). Thus, signaling via IRAK4 is essential for activation of innate immune cells, development of parasite specific acquired immunity and host resistance to infection with *T. gondii*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estágios morfológicos de <i>T. gondii</i>	16
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	18
<b>Figura 3.</b> Soroprevalência mundial da toxoplasmose	23
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização TLR	31
<b>Figura 5.</b> Família das proteínas cinases associadas ao receptor de IL-1	33
<b>Figura 6.</b> Animais deficientes em IRAK4 são mais susceptíveis a infecção pelo <i>T. gondii</i>	52
<b>Figura 7.</b> O controle da parasitemia tecidual é dependente de IRAK4	54
<b>Figura 8.</b> A deficiência de IRAK4 impacta na formação de centros germinativos durante a infecção pelo <i>T. gondii</i>	56
<b>Figura 9.</b> Células B de animais deficientes em IRAK4 apresentam ativação prejudicada durante a infecção pelo <i>T. gondii</i>	57
<b>Figura 10.</b> IRAK4 deficientes apresentam falha na produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias	59
<b>Figura 11.</b> Células do baço de animais IRAK4 deficientes apresentam falha na produção de citocinas pró-inflamatórias	60
<b>Figura 12.</b> A deficiência de IRAK4 causa alterações na distribuição das populações de monócitos/macrófagos durante a infecção pelo <i>T. gondii</i>	62
<b>Figura 13.</b> Deficiência de IRAK4 leva a diminuição da produção de citocina inflamatória	63
<b>Figura 14.</b> Deficiência de IRAK4 altera a produção de citocinas inflamatórias desencadeada pela infecção pelo <i>T. gondii</i>	65
<b>Figura 15.</b> A susceptibilidade dos animais IRAK4 deficientes é dependente da produção de IL-12.	66
<b>Figura 16.</b> Deficiência de IRAK4 influencia na resposta de células T	68
<b>Figura 17.</b> Análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene IRAK4	70

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.2 Toxoplasmose	21
1.3 Epidemiologia e soroprevalência	21
1.4 Toxoplasmose congênita	23
1.5 Resposta Imune	25
1.5.1 Imunidade humoral	25
1.5.2 Imunidade celular	28
<b>2. OBJETVO</b>	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
3.1 Camundongos	40
3.2 Tipagem nos camundongos	40
3.3 Obtenção e manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i>	41
3.4 Obtenção e manutenção da cepa ME49	42
3.5 Extração de antígenos	42
3.6 Infecção, morbidade e mortalidade	42
3.7 Patologia	43
3.8 Reconstituição IL-12 recombinante (rIL-12) <i>in vivo</i>	43
3.9 PCR Real Time	43
3.10 Isolamento de esplenócitos	44
3.11 Citocinas	45
3.12 Citometria de Fluxo	45
3.13 População	47
3.14 Obtenção do material biológico	47
3.15 Seleção dos SNPs e Associação alélica	47
3.16 genotipagem dos SNPs	48
3.17 Estatística	49
<b>4. RESULTADOS</b>	50
4.1 Análise de morbidade, mortalidade e parasitismo, de animais infectados oralmente com o parasito <i>T. gondii</i>	50
4.2 Avaliação do baço e de linfócitos B durante a infecção pelo <i>T. gondii</i>	55
4.3 Defeito na produção de citocinas pró-inflamatórias em animais IRAK4 <sup>-/-</sup> infectados com <i>T. gondii</i>	58
4.4 Frequência e produção de citocinas por células mielóides de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	60
4.5 Animais deficientes em IRAK4 apresentam resposta Th1 deficiente	66
4.6 SNPs de IRAK4 estão associados a susceptibilidade a doença ocular	69
<b>5. DISCUSSÃO</b>	71
<b>6. CONCLUSÃO</b>	80
<b>REFERÊNCIAS</b>	81
<b>TRABALHOS PUBLICADOS</b>	94

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório que infecta uma grande variedade de hospedeiros. Foi identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte-africano, popularmente chamado de gondi (*Ctenodactylus gondi*). Este feito aconteceu no Instituto Pasteur da Tunísia em 1908 (Nicolle 1908) e, no mesmo ano, foi isolado também de coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (Splendore 1908). O gênero *Toxoplasma* foi introduzido um ano depois, após o parasito ter sido diferenciado de parasitos do gênero *Leishmania* (Nicolle 1909), e apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii*, tem sido identificada em isolados de animais e humanos (Dubey 2009). O primeiro relato de infecção congênita humana por *T. gondii* foi feito em 1923, enquanto a primeira infecção no ser humano adulto foi diagnosticada em 1940 (Sukthana 2006).

O genoma de *T. gondii* é haplóide, exceto durante a fase de reprodução sexuada que ocorre no interior das células intestinais de seus hospedeiros definitivos, e contém cerca de  $8 \times 10^7$  pares de nucleotídeos (Montoya e Liesenfeld 2004). A maioria dos isolados de *T. gondii* compreende três linhagens clonais diferentes, as quais diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% ou menos de seus genes. Linhagens recombinantes (atípicas ou exóticas) são ainda mais raras, representando menos de 5% dos isolados até agora caracterizados (Su et al. 2003; Ferreira Ade et al. 2006). As três linhagens clonais de *T. gondii* são designadas tipo I, tipo II e tipo III, as quais diferem na virulência e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I (RH) são altamente virulentas para camundongos, enquanto as linhagens do tipo II (ME49) são consideradas de baixa virulência

e as linhagens do tipo III (CEP e VEG) moderadamente virulentas (Kim e Weiss 2004; Saeij et al. 2005; Switaj et al. 2005).

A rápida disseminação destes três genótipos de *T. gondii* tem sido atribuída à capacidade deste parasito ser transmitido diretamente de um hospedeiro intermediário para outro intermediário, tornando seu ciclo de reprodução sexuado não obrigatório para a sua transmissão. Esta característica o torna um parasito atípico entre os demais integrantes do filo Apicomplexa, os quais requerem o ciclo sexuado para uma transmissão efetiva entre seus hospedeiros (Su et al. 2003). Atualmente, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar a correlação entre o genótipo de *T. gondii* e as manifestações da doença em humanos, verificando se há diferenças relacionadas à linhagem do parasito no que diz respeito à estimulação da resposta imune do hospedeiro e gravidade da doença (Saeij et al. 2005; Peixoto-Rangel et al. 2009; Jamieson et al. 2010).

As três formas infecciosas de *T. gondii* (**Figura 1**) (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) apresentam várias diferenças morfológicas quando analisadas sob microscopia óptica, bem como diversas diferenças ultraestruturais, evidenciadas por análises de microscopia eletrônica (Dubey et al. 1998; Speer et al. 1999; Kim e Weiss 2004).

Taquizoítas apresentam forma de meia-lua e representam os estágios de multiplicação rápida do parasita durante a fase aguda da infecção, a qual ocorre por meio do processo de endodiogenia no interior de vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos. Apresentam dimensões aproximadas de 4-8 $\mu$ m x 2-4 $\mu$ m. Possuem uma película externa, consistindo de uma membrana externa contínua (plasmalema) e um conjunto de duas membranas internas incompletas. Na extremidade anterior ou apical situa-se o conóide, composto por anéis de microtúbulos (anéis apicais 1 e 2 e anéis polares 1 e 2). O citoesqueleto subpelicular é composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da

membrana interna e se estendem do anel polar até a extremidade posterior do parasita, conferindo-lhe sua alta capacidade de motilidade (Dubey et al. 1998). Possuem também diversas organelas secretórias, como as roptrias, as micronemas e os grânulos densos. São encontradas cerca de 4-10 roptrias localizadas na região anterior ao núcleo, enquanto as micronemas são mais numerosas também concentradas na região anterior do parasita. Já os grânulos densos são encontrados dispersos por todo o citoplasma, concentrando-se na extremidade anterior. Na região central da película, localiza-se o microporo, que é considerado como um sítio ativo de endocitose. Além disso, são encontradas diversas outras organelas e inclusões citoplasmáticas típicas de células eucariontes e características de parasitas apicomplexas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, grânulos de amilopectina, corpos lipídicos e o núcleo, organizado na porção central da célula (Speer et al. 1999). Uma organela intrigante, de função pouco conhecida e aparentemente essencial para a sobrevivência de *T. gondii* e da grande maioria dos demais integrantes do filo Apicomplexa é o apicoplasto. Trata-se de uma organela aparentemente derivada do cloroplasto, mas sem capacidade fotossintética, portadora de genoma próprio, muito similar ao genoma de seres procariontes, portador de genes que codificam uma enzima RNA polimerase e componentes ribossomais. Sua função primária parece ser a síntese de ácidos graxos e isoprenóides (Kim e Weiss 2004).

Bradizoítas são morfologicamente idênticos aos taquizoítas, mas funcionalmente diferentes, pois se multiplicam de forma bem mais lenta e expressam algumas moléculas de superfície diferentes daquelas expressas pelos taquizoítas. As principais diferenças ultraestruturais observadas entre as duas formas estão relacionadas à posição do núcleo (próximo à extremidade posterior nos bradizoítas e centralizado nos taquizoítas), maior número de roptrias nos taquizoítas, predominância de grânulos de amilopectina nos

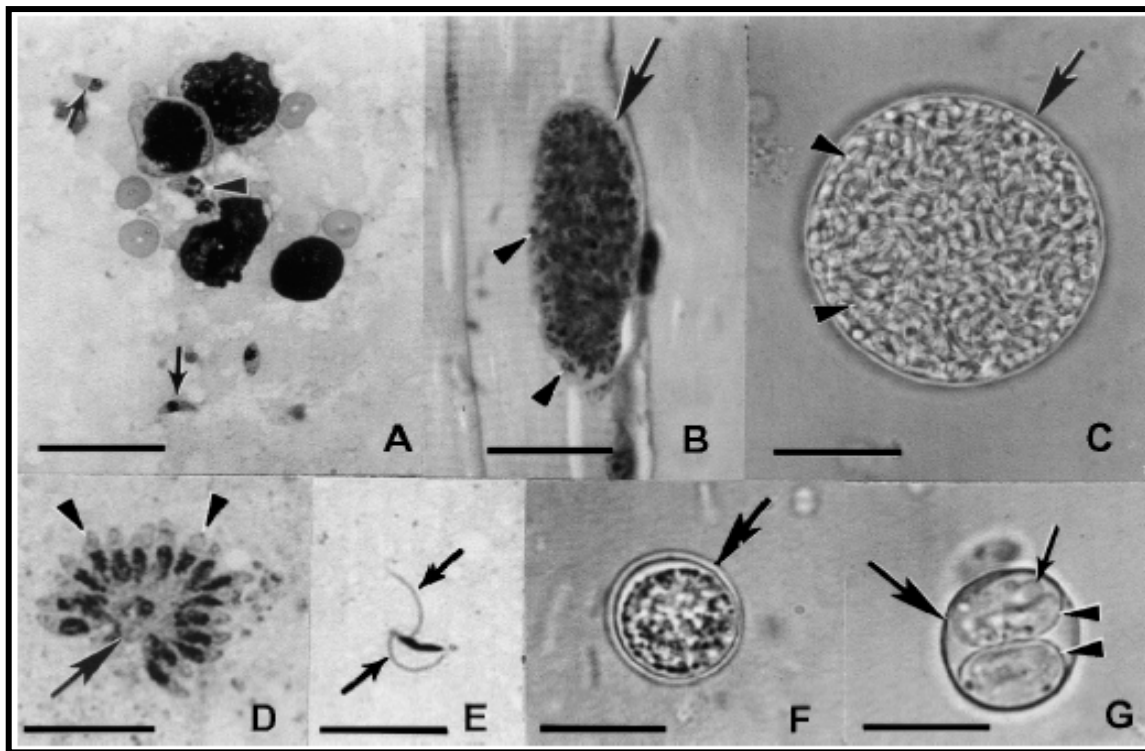
bradizoítas e maior resistência dos bradizoítas à ação de enzimas proteolíticas (Dubey et al. 1998). Os bradizoítas apresentam dimensões aproximadas de 7,5µm x 2,5µm, apresentando roptrias, micronemas e grânulos densos concentrados preferencialmente na porção anterior do parasita (Speer et al. 1999).

Cistos de *T. gondii* podem ser encontrados em diversos tecidos, mas principalmente em tecidos neurais e musculares. Seu tamanho é muito variável, dependendo do número de bradizoítas no seu interior, de sua forma e do tecido onde se encontram. Geralmente, apresentam em torno de 50-500 bradizoítas, apresentam parede fina e lisa e o seu interior não se encontra separado em compartimentos por meio de septos (Speer et al. 1999). Cistos representam estágios infecciosos tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos e, no seu interior, os bradizoítas persistem por toda a vida de seus hospedeiros. Porém, podem ser liberados e se converterem novamente em taquizoítas em situações de imunossupressão do hospedeiro (Montoya e Liesenfeld 2004).

Esporozoítas são estágios morfológicamente semelhantes aos taquizoítas, porém apresentam micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes e estão contidos em esporocistos no interior dos oocistos. Os oocistos não esporulados de *T. gondii* apresentam dimensões aproximadas de 12µm x 10µm, com formato aproximadamente esférico, cujas paredes são formadas por duas camadas incolores. A esporulação ocorre no ambiente em torno de 1-5 dias após sua liberação nas fezes de felídeos infectados. Oocistos esporulados são subesféricos, medindo aproximadamente 13µm x 11µm e contêm dois esporocistos elipsóides, cada um medindo 8µm x 6µm, e cada esporocisto contém quatro esporozoítas (Dubey et al. 1998). Durante a fase aguda, um gato com infecção primária pelo parasita libera milhões de oocistos por um período de até 28 dias (Montoya e Liesenfeld 2004).

*T. gondii* apresenta uma grande variedade de hospedeiros intermediários, nos quais ocorrem as fases assexuadas de sua reprodução, podendo infectar qualquer célula nucleada de seus hospedeiros. Qualquer animal homeotérmico, incluindo aves e mamíferos domésticos, silvestres, selvagens ou marinhos, além de seres humanos, podem funcionar como hospedeiros intermediários deste parasito. Sua presença já foi demonstrada em seres pecilotérmicos, como peixes, anfíbios e répteis, embora não se conheça a viabilidade do parasito nestes animais e a importância dos mesmos no seu ciclo de vida (Stone e Manwell 1969). Já os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, nos quais ocorrem as fases sexuadas de seu ciclo de vida, são os mamíferos carnívoros pertencentes à família Felidae, dentre os quais estão os gatos domésticos (Tenter et al. 2000).

O ciclo de vida de *T. gondii* somente começou a ser elucidado de forma completa em 1969, após 60 anos da sua identificação e classificação. Isto ocorreu quando foram demonstradas as fases assexuadas do parasita nos tecidos de seus hospedeiros intermediários e os oocistos eliminados nas fezes de gatos. Além disso, foram descobertas as formas sexuadas nas células intestinais de felídeos (Tenter et al. 2000). *Toxoplasma gondii* apresenta um ciclo biológico, representado na **figura 2**, heteroxeno e complexo, alternando entre fases de reprodução assexuada em seus hospedeiros intermediários e fases de reprodução sexuada em seus hospedeiros definitivos.



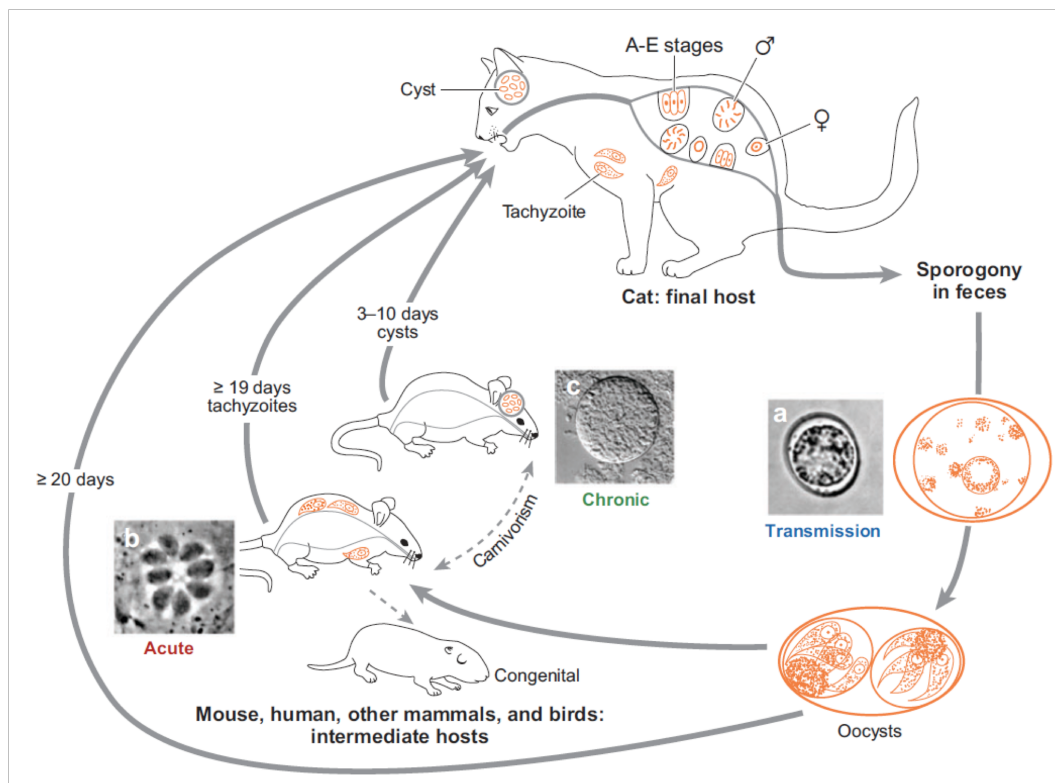
**Figura 1. Estágios morfológicos de *T. gondii*.** (A) Taquizoítas circulantes. As setas apontam taquizoítas individuais em forma de crescente, enquanto as cabeças de seta apontam taquizoítas em divisão; (B) Cistos teciduais em corte de músculo esquelético. A seta está apontando para a fina parede do cisto, enquanto as cabeças de seta estão apontando para bradizoítas no seu interior; (C) Cisto tecidual separado dos tecidos do hospedeiro por homogeneização de cérebro infectado. A parede do cisto está apontada pela seta, enquanto centenas de bradizoítas no seu interior estão apontados pelas cabeças de seta; (D) Esquizonte com alguns merozoítas (cabeças de seta) presentes em tecido intestinal de gato infectado; (E) Gameta masculino com dois flagelos (setas) presente em tecido intestinal de gato infectado; (F) Oocisto não esporulado eliminado nas fezes de gato infectado. Sua parede é formada por duas camadas (seta) circundando uma massa central única; (G) Oocisto esporulado com uma parede mais fina (seta maior), dois esporocistos (cabeças de seta). Cada esporocisto contém quatro esporozoítas (seta menor), não totalmente focados nesta figura. **Fonte:** (Hill e Dubey 2002).

Taquizoítas invadem ativamente qualquer célula de seus hospedeiros, nucleadas e eritrocíticas (Jadin 1968) não apresentando um tropismo especial por nenhum tipo celular, correspondem a uma fase de multiplicação rápida. Estes ciclos de reprodução levam à produção de vários outros taquizoítas, que rompem a célula hospedeira, são liberados e



invadem novas células incluindo monócitos e macrófagos (Dubey 1974), onde ocorrerá novo ciclo de reprodução. Deste modo, os taquizoítas espalham-se pelos diversos tecidos do hospedeiro, disseminando-se, principalmente, para as células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco (Montoya e Liesenfeld 2004).

Bradizoítas são formas de multiplicação lenta localizados em cistos teciduais que podem ser encontrados 8 dias após a infecção (Lainson 1958). A formação dos cistos ocorre pelo parasitismo da célula do hospedeiro e são formados parte pelo parasito e parte pela célula hospedeira parasitada (Ferguson 1988; Sadak 1988). Tais cistos podem persistir por toda a vida do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da infecção. Quando o cisto é ingerido por um hospedeiro definitivo, sua parede é digerida pelas enzimas proteolíticas do estômago e do intestino do hospedeiro, o que leva ao seu rompimento e à liberação das formas bradizoítas. Estas invadem as células epiteliais intestinais e iniciam uma fase de reprodução assexuada rápida que resulta na formação dos esquizontes e liberação dos merozoítas. Após a formação dos merozoítas, inicia-se a fase de reprodução sexuada resultando na produção de oocistos não esporulados, os quais são eliminados juntamente com as fezes dos felídeos primoinfectados por um período de 7 a 20 dias, com pico de eliminação do quinto ao oitavo dia (Miller 1972). No ambiente, em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação, ocorre o processo pelo qual os oocistos se tornam infecciosos, em torno de 1 a 4 dias pós eliminação (Coutinho et al. 1982; Sumyuen et al. 1995) (oocistos esporulados), podendo permanecer viáveis no solo por períodos indeterminados em temperaturas que podem variar de 4 a 37°C (Dubey 1974; Frenkel et al. 1975; Tenter et al. 2000).



**Figura 2. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.** A infecção dos felinos se dá através da ingestão de presas infectadas com cistos teciduais ou ingestão de oocistos presentes no ambiente. A replicação sexuada ocorre no seu intestino, resultando na liberação de (a) cistos diplóides que desenvolvem em esporozoítos. A–E referem-se aos estágios de desenvolvimento dos cistos. Durante a infecção aguda pela ingestão de (a) oocistos, ocorre a liberação dos (b) taquizoítos capazes de infectar quaisquer células nucleadas do hospedeiro. Cistos teciduais contendo (c) bradizoítos são resultado da doença crônica e são transmitidos através de ingestão de alimentos crus, principalmente carne. **Fonte:** (Sibley et al. 2009).

Quando os hospedeiros intermediários ingerem tais oocistos esporulados, sua parede protetora é digerida pelas enzimas digestivas, resultando na liberação dos esporozoítos. Estes invadem as células epiteliais intestinais, bem como outros tipos celulares locais e, após alguns ciclos de reprodução rápida, são liberados diversos taquizoítos, que invadem novas células, disseminando-se pelos vários tecidos do organismo. Sob pressão da resposta imune do hospedeiro, estes taquizoítos convertem-se em bradizoítos, que formarão novos cistos teciduais (Dubey et al. 1998).

## 1.2 Toxoplasmose

As três formas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) são infecciosas, tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos. Seres humanos podem se tornar infectados pelas seguintes vias: (i) ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos com a forma bradizoíta, principalmente carnes de suínos, ovinos e caprinos (Kijlstra e Jongert 2009); (ii) ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados, principalmente gatos domésticos (Bahia-Oliveira et al. 2003); (iii) transmissão congênita, por meio da transferência de taquizoítas da mãe para o feto através da placenta (transmissão vertical), principalmente na fase aguda da infecção (Bale 2002); (iv) transplante de órgãos de um doador infectado para um receptor soronegativo, principalmente transplantes de coração, pulmão, fígado e rim (Rogers et al. 2008); (v) transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos e (vi) acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos perfuro-cortantes contaminados com taquizoítas viáveis presentes em secreções, ou acidentes laboratoriais envolvendo animais infectados (Bowie et al. 1997).

Uma vez o parasita tendo sido ingerido, o parasito invade ativamente as células epiteliais do intestino delgado de modo ativo, iniciando o ciclo de reprodução (Barragan e Sibley 2002). A penetração de *T. gondii* em suas células hospedeiras ocorre por um complexo de adesão-movimentação, sendo um processo diferente da fagocitose, uma vez que ocorre a reorientação do parasita em direção à membrana da célula e o rearranjo do citoesqueleto do mesmo. Após a penetração, o parasito é encontrado no interior do vacúolo parasitóforo, cuja membrana é lisa, formada por cerca de 20% de membrana fornecida pelo parasito durante a invasão e 80% de membrana da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo não funde com lisossomos da célula hospedeira, pois marcadores necessários

para esta fusão são excluídos pelo parasito durante a invasão. No interior do vacúolo parasitóforo, os parasitos replicam sincronicamente, de forma assexuada, sendo encontrados agrupados uns aos outros, em números múltiplos de dois (Hegab e Al-Mutawa 2003).

Clinicamente, a infecção por *T. gondii* pode ser assintomática ou apresentar alguns sinais e sintomas que variam enormemente, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e do tipo da infecção. A infecção primária por *T. gondii* em adultos e crianças imunocompetentes é assintomática na maioria dos pacientes, causando uma infecção auto-limitada e com sintomas não específicos, que raramente demandam tratamento. A manifestação clínica mais típica neste grupo de pacientes é uma linfadenopatia cervical ou occipital discreta e isolada. Em casos muito raros, já foram relatadas miocardite, polimiosite, pneumonia, hepatite ou encefalite em indivíduos imunocompetentes durante infecção primária (Montoya e Liesenfeld 2004).

A coriorretinite toxoplásmica é um quadro comum na toxoplasmose adquirida ou na doença congênita, como resultado de uma infecção aguda ou reativação de uma infecção crônica. Os principais sinais de uma coriorretinite toxoplásmica são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada. Geralmente, a coriorretinite em adultos têm sido associada a uma manifestação tardia ou à reativação de uma infecção congênita ocorrida, principalmente, no terceiro trimestre de gestação (Montoya e Remington 1996; Burnett et al. 1998; Holland 1999; Hegab e Al-Mutawa 2003).

Apesar de causar uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a infecção com o *T. gondii* pode causar doença grave, muitas vezes fatal, em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com AIDS ou em tratamento com drogas imunossupressoras. Nestes indivíduos, a toxoplasmose geralmente resulta da

reativação de uma infecção crônica e afeta preferencialmente o sistema nervoso central, levando ao quadro típico de encefalite toxoplásmica. As manifestações clínicas mais comuns são: confusão mental, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares, desordens dos movimentos e sinais neuropsiquiátricos. Os achados neurológicos mais típicos são hemiparesia e distúrbios da fala. Deve ser feito o diagnóstico diferencial das lesões da encefalite toxoplásmica com linfoma do sistema nervoso central, leucoencefalopatia multifocal progressiva, ventriculite e encefalite causadas por citomegalovírus, abscessos cerebrais bacterianos e lesões focais causadas por outros microrganismos, como *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia* sp.. A toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos também pode se apresentar associada com coriorretinite, pneumonia e envolvimento de múltiplos órgãos (Porter e Sande 1992; Luft et al. 1993; Montoya e Liesenfeld 2004).

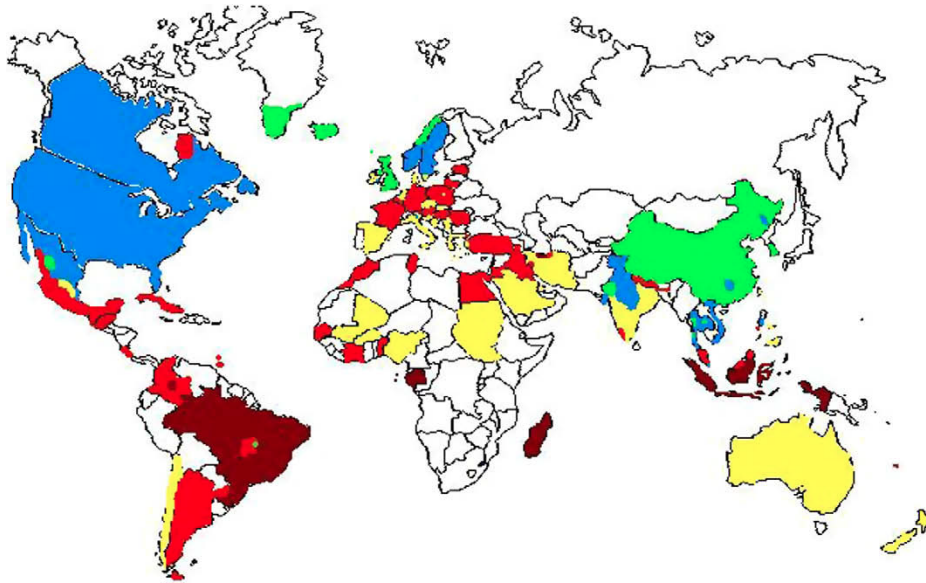
### **1.3 Epidemiologia e soroprevalência**

Toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns no mundo. É estimado que cerca de um terço da população mundial está infectada por *T. gondii* (Ribeiro et al. 2008). Porém, a soroprevalência varia enormemente entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas do mesmo país e entre diferentes grupos étnicos vivendo na mesma área. Alguns fatores estão envolvidos nesta variação da soroprevalência como: (i) exposição da população aos fatores de risco à infecção; (ii) prevalência da toxoplasmose nos hospedeiros definitivos e intermediários e (iii) fatores climáticos que favorecem o desenvolvimento e manutenção da viabilidade dos oocistos (Hill e Dubey 2002). Deste modo, anticorpos anti-*T. gondii* podem ser encontrados numa taxa que varia de 0-100% da população, dependendo

do grupo analisado. Uma dificuldade em se estabelecer a taxa de prevalência real da infecção em diferentes regiões reside na grande diversidade de métodos utilizados nos inquéritos epidemiológicos, os quais podem variar muito em sensibilidade, especificidade e valores preditivos (Tenter et al. 2000; Montoya e Liesenfeld 2004).

Para melhor exemplificar a distribuição desta parasitose, a **figura 3** apresenta não só a distribuição da toxoplasmose no mundo, mas também as taxas de prevalência em todos os continentes (Pappas et al. 2009). Na Europa, a França é o país com maior prevalência da doença, onde 43,8% das mulheres grávidas em 2003 eram soropositivas para a parasitose (Berger et al. 2009). Já em outros países como a Áustria (Edelhofer e Prossinger 2010) e a Holanda (Hofhuis et al. 2011), as taxas ainda são altas mas se encontram em franco decréscimo. Nos Estados Unidos, a soroprevalência no período de 1988 a 1994 encontrava-se em torno de 22,5% (Jones et al. 2001). Nos países da América Latina a prevalência sempre é maior que 40%, com exceção do Chile que apresentou uma taxa de 36,9% em um levantamento feito em 1996 (Contreras et al. 1996).

No Brasil, a prevalência é de 30 a 80%, dependendo da região do país e da classe sócio-econômica da população analisada. No sul do país, um estudo recente, realizado com mais de vinte mil mulheres grávidas, relatou 53% de prevalência (Vaz et al. 2010), e no Recife, em estudo realizado com amostras de doadores de sangue, a prevalência chega a 75% (Coelho et al. 2003). Na região metropolitana de São Paulo a soroprevalência encontrada foi de cerca de 65% (Fernandes et al. 2009) muito semelhante à prevalência de quase 66% encontrada em um estudo com amostras de indivíduos provenientes de assentamentos rurais da Amazônia (Ferreira et al. 2009).



**Figura 3. Soroprevalência mundial da toxoplasmose.** Os países coloridos indicam prevalência de: marrom - > 60%, vermelho - 40 e 60%, amarelo - 20 a 40%, azul - 10 a 20% e verde - <10%. A cor branca indica que estudos de prevalência não foram realizados na região. **Fonte:** (Pappas et al. 2009).

#### 1.4 Toxoplasmose Congênita

A transmissão por via placentária, da mãe para o filho, é a forma de transmissão que mais merece a atenção das autoridades de saúde, pois resulta na toxoplasmose congênita, uma das formas mais graves da infecção, que pode acarretar consequências graves para o feto ou para o recém-nascido. A transmissão congênita ocorre quando formas taquizoítas do parasito atravessam a placenta durante uma infecção materna primária adquirida durante a gestação, sendo denominada, atualmente, de transmissão transplacentária exógena (Mombro et al. 2003).

A frequência da transmissão congênita varia muito de acordo com o estágio da gestação em que a mulher adquire a infecção. Em geral, quando a mãe adquire a infecção no primeiro trimestre de gestação, a taxa de transmissão congênita é de aproximadamente 9%, aumentando para 27% e 59% quando a infecção é adquirida no segundo e no terceiro

trimestre de gestação, respectivamente. Porém, a frequência de transmissão e a gravidade das consequências da infecção para o feto ou recém-nascido são inversamente proporcionais, de modo que as consequências mais graves são observadas quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre de gestação, enquanto a transmissão que ocorre no terceiro trimestre geralmente resulta em toxoplasmose subclínica (Hohlfeld et al. 1994; Dunn et al. 1999; Wallon et al. 1999).

A transmissão congênita durante a infecção crônica, ou seja, quando a infecção materna é adquirida antes da gestação, é menos comum, mas pode ocorrer em algumas situações, tais como, quando a gestante apresenta doenças imunossupressoras, como a AIDS, ou está sob uso de drogas imunossupressoras, como corticosteróides ou outras drogas usadas por portadores de doenças autoimunes ou indivíduos transplantados. Tais situações levam à reativação de uma infecção crônica, com a conversão de bradizoítas em taquizoítas, que atravessam a placenta (Minkoff et al. 1997). Esta forma de transmissão caracterizada pela reativação de uma infecção crônica tem sido denominada atualmente como transmissão transplacentária endógena (Trees e Williams 2005). Há trabalhos relatando a transmissão transplacentária de *T. gondii* após reinfecção materna durante a gestação em mulheres imunocompetentes (Gavinet et al. 1997), bem como a transmissão transplacentária em uma mulher imunocompetente infectada antes da gestação (Vogel et al. 1996).

A toxoplasmose congênita raramente pode ser diagnosticada por meio de exames ultrassonográficos, mas alguns sinais sugestivos de infecção por *T. gondii* no feto visualizáveis pela ultrassonografia são calcificações intracranianas, dilatação ventricular, aumento do fígado e aumento da espessura da placenta. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita variam enormemente, em geral, de acordo com a fase da gestação



em que ocorre a transmissão do parasito para o feto. Deste modo, as consequências mais comuns são: aborto espontâneo e morte fetal no interior do útero, ou nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Nenhum dos sinais descritos anteriormente em recém-nascidos com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose, uma vez que podem se manifestar em decorrência de infecções congênitas causadas por outros patógenos, como citomegalovírus, herpes simples, rubéola e em casos de sífilis congênita (Swisher et al. 1994; Montoya e Liesenfeld 2004; Kravetz e Federman 2005).

## **1.5 Resposta imune**

A imunidade à infecção é uma batalha constante entre o patógeno invasor e os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a invasão e resolução da infecção. Nesta batalha, o parasito usa todas as estratégias possíveis para evadir às defesas do hospedeiro e conseguir estabelecer uma infecção duradoura, enquanto o hospedeiro tenta responder a todas estas estratégias e eliminar o patógeno, evitando que este se instale e lhe cause maiores danos. A resposta imune ao *T. gondii* já está bem estabelecida e, como parasito intracelular obrigatório, a resposta protetora é fundamentalmente mediada por células. No entanto, a resposta imune humoral participa diretamente na neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares, auxiliando no controle da disseminação da infecção (Hegab e Al-Mutawa 2003).

### **1.5.1 Imunidade humoral**

A imunidade humoral induzida por *T. gondii* é direcionada principalmente contra a forma taquizoíta, de modo que anticorpos específicos impedem a adesão do parasito aos receptores da célula hospedeira, prevenindo, assim, a sua invasão. Indivíduos com infecção crônica são usualmente resistentes à reinfecção por *T. gondii*, possivelmente devido à presença de imunoglobulinas circulantes, as quais podem ser produzidas no próprio sangue ou no tecido infectado (Hegab e Al-Mutawa 2003).

As principais imunoglobulinas, bem como sua participação no curso da infecção por *T. gondii* são descritas a seguir:

**IgM:** A produção de anticorpos IgM específicos a antígenos de *T. gondii* é um sinal de infecção recém adquirida e não um sinal de reinfecção. Em seres humanos, estes anticorpos podem ser detectados logo nos primeiros 7 dias de infecção, aumentando gradualmente até atingir um pico cerca de 1-2 meses depois, diminuindo gradativamente até níveis não detectáveis por volta de 8 meses. Porém, em muitos casos, anticorpos IgM podem permanecer persistentes por muitos meses e, até anos, tornando problemático o diagnóstico da infecção primária por *T. gondii* baseado na detecção de IgM específica (Remington et al. 2004). Anticorpos IgM detectados na circulação do recém-nascido são geralmente considerados como indicativo de infecção congênita, pois esta classe de imunoglobulina não atravessa a barreira placentária. A ausência de anticorpos IgM específicos pode excluir a possibilidade de infecção congênita em recém-nascidos ou de infecção recente em outros grupos de indivíduos (Ashburn et al. 1998; Hegab e Al-Mutawa 2003).

**IgG:** A imunoglobulina G corresponde à principal classe de anticorpos envolvida na resposta humoral contra *T. gondii*. Em seres humanos infectados, anticorpos IgG específicos a antígenos de *T. gondii* aparecem após 1-2 semanas de infecção e seus níveis aumentam

muito lentamente até atingir um valor máximo por volta dos 6-14 meses após a infecção, com uma ligeira queda após este período. Porém, níveis mais baixos de IgG podem permanecer circulantes indefinidamente. Em infecções recentes, a afinidade funcional da IgG pelos seus respectivos antígenos (avidez de IgG) é mais baixa e, à medida que a infecção avança, ocorre a maturação da resposta imune e estes anticorpos passam a apresentar avidez crescente. Deste modo, em infecções de maior duração, encontra-se um predomínio de anticorpos IgG de alta avidez. Altos títulos de IgG de baixa avidez não identificam uma infecção adquirida recentemente, mas altos níveis de IgG de alta avidez podem excluir infecções primárias ou recém adquiridas (Montoya e Liesenfeld 2004).

**IgA:** Durante uma infecção por *T. gondii*, anticorpos IgA são produzidos durante a fase digestiva do parasito, quando linfócitos parasito-específicos circulam pela lâmina própria do trato digestivo do hospedeiro. Tais linfócitos podem circular por outros locais, podendo produzir anticorpos IgA em outros sítios ativos de infecção, diferentes da região intestinal. Anticorpos IgA são produzidos apenas durante a fase aguda de uma infecção primária, não sendo observados durante a infecção crônica, constituindo, portanto, um bom marcador imunológico de infecção recente. Durante a fase aguda de infecção, IgA persiste circulante no sangue por cerca de 8-9 meses após a infecção, enquanto anticorpos IgM podem persistir por períodos mais longos. Níveis persistentes de anticorpos IgM na ausência de anticorpos IgA indica uma imunidade estabelecida e uma infecção mais tardia, caracterizando um período de transição no perfil imunológico de resposta à infecção. Apesar de ser secretada no colostro, IgA não atravessa a barreira placentária. A IgA pode ser detectada em recém-nascidos, quando a infecção congênita ocorre no terceiro trimestre de gestação. Já se a infecção congênita ocorre no primeiro trimestre de gestação, esta imunoglobulina está ausente no sangue do recém-nascido (Hegab e Al-Mutawa 2003).

Além destas classes principais de anticorpos envolvidas na infecção por *T. gondii*, também são observados anticorpos IgE, no entanto poucos estudos têm explorado a importância desta imunoglobulina na resposta humoral contra este parasito, bem como seu valor no diagnóstico e na determinação da fase da infecção (Ashburn et al. 1998).

### 1.5.2 Imunidade celular

A imunidade mediada por células é o mais importante mecanismo na regulação da infecção por *T. gondii*, com a participação das células T CD4 e T CD8, células da linhagem mielóide como células dendríticas (DCs), monócitos e macrófagos, e ainda células *natural killer* (NK). A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo, atuando de forma a conter infecções e direcionar a resposta adaptativa promovendo a eliminação do agente infeccioso. Dentre as características da resposta imune inata, pode-se dizer que ela não possui especificidade refinada, atuando através de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Existem inúmeras famílias de receptores de PAMPs, entre elas pode-se citar os receptores do tipo Toll (TLR), os receptores do tipo NOD (NLR) e os receptores ionotrópicos de ATP extracelular. A **figura 4** representa esquematicamente as vias de sinalização da família Toll, evidenciando os diversos receptores, moléculas adaptadoras e fatores de transcrição regulados pelo reconhecimento dos seus agonistas.

Muitas espécies apresentam de 10 a 15 TLR, que diferem em sua especificidade pelo ligante, padrões de expressão e a via de transdução de sinal ativada (Frenkel e Parker 1996). Dentre os ligantes e seus respectivos receptores podemos citar: lipopeptídeos (TLR2), lipopolissacarídeos (TLR4), flagelina (TLR5), RNA fita dupla e fita simples (TLR3 e TLR7/8), e DNA (TLR9). Somente camundongos expressam o TLR11, que possui como ligante a

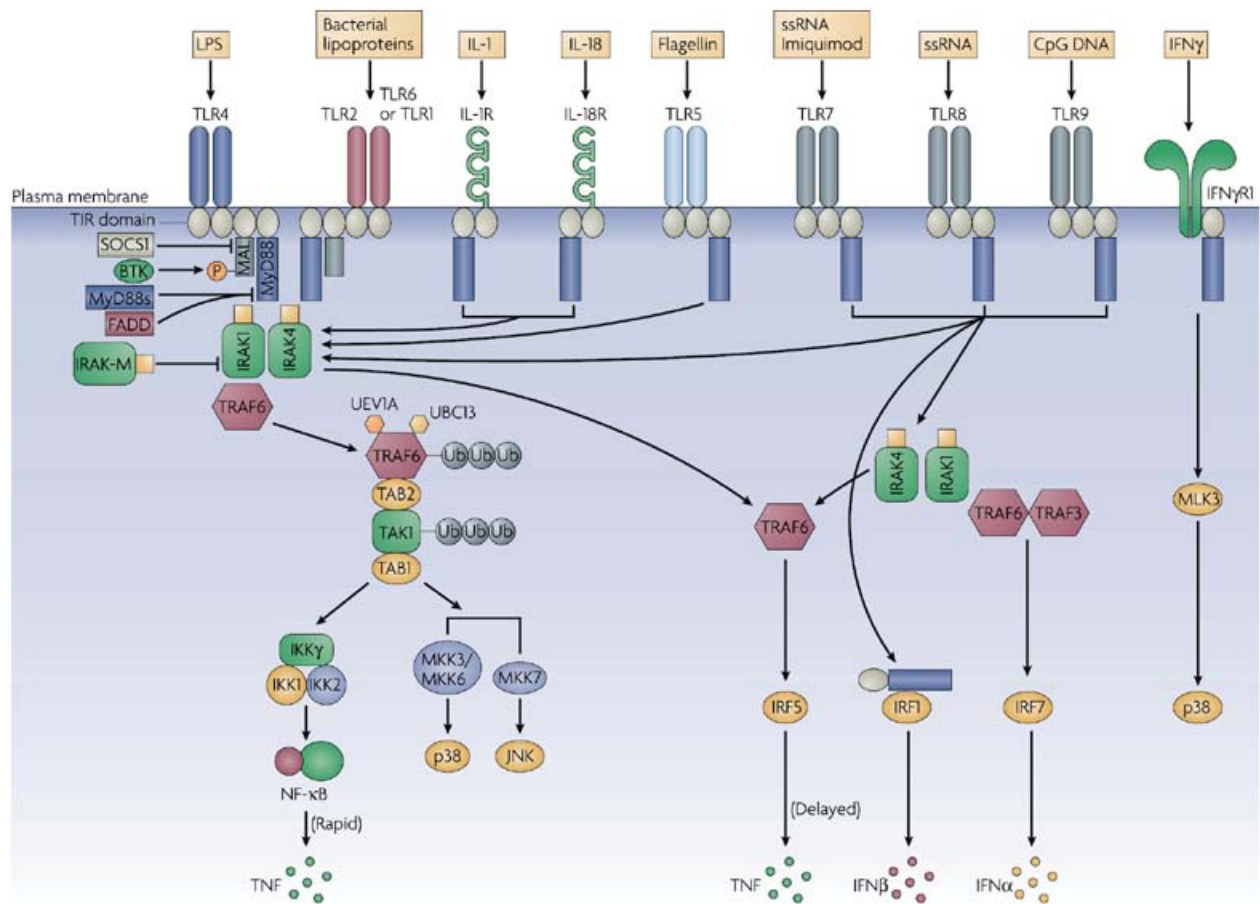
profilina, uma proteína que contribui para a polimerização da actina do parasito (Wallon et al. 1999; Lyons et al. 2002; Kawai e Akira 2005; Albuquerque et al. 2009; Fernandes et al. 2009). A ativação da via dos TLR leva a ativação do NFκB que migra para o núcleo e induz a transcrição de genes para expressão de moléculas co-estimulatórias, produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Takeuchi et al. 1999; Hayashi et al. 2001).

A molécula adaptadora MyD88 é essencial para a via de sinalização de todos os TLR, com exceção de TLR3 e parcialmente de TLR4, participando também da sinalização dos receptores de IL-1 e de IL-18. Estudos com animais nocautes para MyD88, evidenciaram a importância dessa molécula na resistência à infecção, uma vez que esses animais sucumbem após dez dias de infecção pelo parasito (Scanga et al. 2002). Camundongos nocautes para TLR2 são sensíveis à infecção com alto número de cistos de uma cepa avirulenta de *T. gondii*. No entanto os animais TLR4 nocaute não sucumbem à infecção. No que se refere ao TLR2, um dos mecanismos envolvidos na perda da resistência à infecção é a produção de NO, que se encontra completamente comprometida nesses animais. Por outro lado, níveis dentro da normalidade foram encontrados nos animais deficientes em TLR4 (Mun et al. 2005). Esses experimentos demonstraram que o TLR4 não está envolvido no reconhecimento do parasito, enquanto que o receptor 2 parece ter um papel importante na geração da resposta imune na infecção com *T. gondii*.

Com o objetivo de identificar quais antígenos de *T. gondii* que seriam reconhecidos pelo TLR2, Debierre-Grockiego e colaboradores isolaram moléculas de glicofostatidilinositol (GPI) e suas porções, e as testaram quanto a sua capacidade de estimular os TLR. Apesar de haver o reconhecimento de porções das GPI por macrófagos peritoneais em cultura e produção de TNFα, o reconhecimento dessa molécula parece não ser importante durante a infecção (Debierre-Grockiego et al. 2007).

O TLR9 também parece contribuir para o reconhecimento do parasito. Em 2006, Minns e colaboradores demonstraram que animais deficientes em TLR9 apresentam maiores níveis de parasitos em comparação com animais selvagens, o que é consistente com a menor produção de IFN $\gamma$  detectada nos animais nocaute. Esse processo inflamatório é dependente da indução de resposta Th1, indicando talvez que a deficiência na produção de IFN $\gamma$  seja decorrente do menor número de células Th1 responsivas, encontradas na lâmina própria (Minns et al. 2006). O TLR11 está envolvido com a resistência dos animais selvagens a infecção. A ausência deste receptor acarreta falha na produção de IL-12 preferencialmente produzida por células dendríticas aumentando a susceptibilidade destes animais à infecção (Yarovinsky et al. 2005). Estudos recentes evidenciaram o papel de UNC93-B1 no transporte dos TLR endossomais, incluindo os TLR 3, 7 e 9, do retículo para os endossomos, possibilitando assim o encontro destes receptores com antígenos de agentes infecciosos. Em animais nocautes para o gene *UNC93B1*, a função dos TLR endossomais fica prejudicada, deixando o animal mais susceptível a infecções virais, como o citomegalovirus murino MCMV (Tabeta et al. 2006) e na infecção por *T. gondii* (Melo et al. 2010).

Em sequência à sinalização de MyD88 encontramos as cinases associadas aos receptores de interleucina 1 (IRAK) como: IRAK1 (Cao et al. 1996) , IRAK2 (Muzzio et al. 1997), IRAK M (Wesche et al. 1999) e IRAK4 (Li et al. 2002) (**Figura 5**). Expressas ubiquitariamente em humanos, com exceção de IRAK M que é detectada somente em monócitos e macrófagos (Rosati e Martin 2002), estas proteínas cinases intracelulares podem ser diferentemente recrutadas pelos TLR para mediar a sua sinalização. Inicialmente, foi descrito que todas as proteínas IRAK apresentavam funções redundantes, como à ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B. Contudo, vários estudos recentes utilizando animais transgênicos indicam que cada proteína IRAK tem sua função distinta (Schaes et al. 2005).



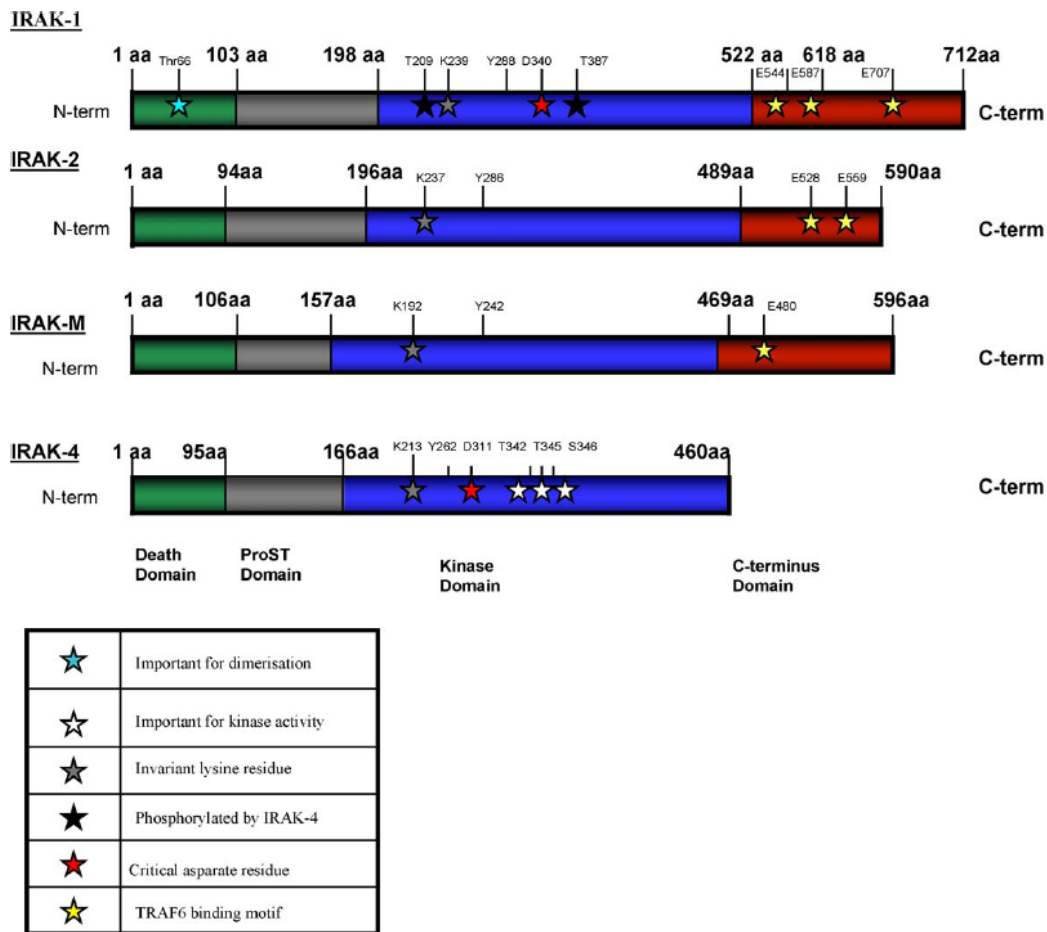
**Figura 4. Via de sinalização TLR.** Os TLR são receptores de membrana celular que reconhecem (PAMPs) dando início a resposta imune do hospedeiro. A maioria dos receptores Toll (com exceção total do receptor 3 e parcial do 4), e os receptores de IL-1 e IL-18 utilizam do adaptador MyD88 e da cinase IRAK4 como moléculas essenciais para a transdução de sinal da sua via e consequente ativação de fatores de transcrição nuclear que são responsáveis por ativar os genes inflamatórios com consequente produção de mediadores importantes para a resistência do hospedeiro. **Fonte:** (O'Neill e Bowie 2007).

Todas as quatro cinases possuem seu domínio de morte na porção N terminal e o domínio cinase na porção C terminal, contudo somente IRAK1 e 4 tem apresentado atividade enzimática. Diferentemente de IRAK1 ou M, a deficiência em IRAK4 exibe grave falha na ativação de fatores de transcrição (NFκB, AP1, cJUN) e na expressão de várias

citocinas inflamatórias produzidas pela sinalização através dos TLR (Suzuki et al. 2002; Gazzinelli e Denkers 2006). IRAK4 é o mais recente membro da família IRAK a ser descoberto. Em humanos, IRAK4 possui 460 aminoácidos apresentando similaridade de 84% com a proteína IRAK4 murina. O papel de IRAK4 na sinalização e ativação do sistema imunológico foi demonstrado em modelo murino em infecção viral (Suzuki et al. 2002) e em humanos que sofrem recorrentes infecções por bactérias piogênicas (Medvedev et al. 2003; Picard et al. 2003). Em 2006, Suzuki e seus colaboradores também demonstraram o crítico envolvimento desta molécula na sinalização através dos receptores de células T (TCR) (Suzuki et al. 2006).

O reconhecimento de antígenos de *T. gondii*, por células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas (Isnardi et al. 2008), desencadeia a produção e secreção de altos níveis de IL-12 por estas células, em resposta a alguns antígenos e proteínas liberados por taquizoítas, tais como a ciclofilina-18 (C-18), que é uma proteína ligante do receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5) (Aliberti et al. 2003). IL-12 estimula células NK a produzirem e secretarem altos níveis de IFN $\gamma$ , o qual induz a diferenciação de células T CD4 na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN $\gamma$ . Altos níveis de IFN- $\gamma$  estimulam macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, amplificando a liberação de IFN $\gamma$ . O IFN $\gamma$  é capaz de ativar mecanismos antimicrobianos efetores, como a produção de óxido nítrico (NO) (Gazzinelli et al. 1994; Gazzinelli et al. 1994). Animais deficientes em IL-12 são extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, o que demonstra a importância dessa citocina na contenção da replicação do parasito nos momentos iniciais da infecção (Scanga et al. 2002).





**Figura 5. Família das proteínas cinases associadas ao receptor de IL-1.** A família IRAK é constituída por 4 membros IRAK1, 2, M e 4. Todas possuem um domínio N terminal chamado domínio de morte que interage com moléculas adaptadoras durante a via de sinalização de receptores tipo Toll (MyD88) ou até mesmo com moléculas responsáveis pela cascata de ativação de células T (ZAP70). Os membros IRAK1 e 4 apresentam atividade enzimática enquanto IRAK M apresenta função reguladora. **Fonte:** (Flannery e Bowie 2010).

Existem duas vias de produção de IL-12 em camundongos, aquelas que dependem de MyD88 e aquelas dependentes da sinalização via CCR5, através da ativação da proteína G. As células T CD8 também sofrem ação da citocina IL-12 e contribuem significativamente no controle da infecção aguda, uma vez que produzem IFN $\gamma$ , e portanto levam à ativação de macrófagos.

As células T CD4 e CD8 parecem ter importância diferente durante a infecção. Enquanto as células T CD8 são essenciais para a sobrevivência dos animais nas fases aguda e crônica, as células T CD4 parecem ser dispensáveis durante a fase aguda e ter papel durante a fase crônica (Suzuki et al. 2010). Uma série de estudos examinaram o papel das células T CD4 na resistência à infecção pelo *T. gondii*. A depleção de células T CD4 exacerba a infecção em animais com infecção crônica, revelando a contribuição dessas células no controle do parasito (Gazzinelli et al. 1991; Gazzinelli et al. 1992). Além disso, células T CD8, em função de sua atividade citotóxica, destroem células infectadas, liberando taquizoítas, que ficam acessíveis a vários tipos celulares e mediadores imunológicos, tais como anticorpos, sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (Hegab e Al-Mutawa 2003; Aliberti 2005). IFN $\gamma$  representa o principal mediador de resistência ao *T. gondii* através da ativação de macrófagos, os quais inibem a replicação dos parasitos por meio da produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (Witola et al. 2011), tais como o NO. Estes mediadores promovem a inativação de enzimas fundamentais para o metabolismo do parasito e, portanto, para a sua sobrevivência. Além disso, macrófagos ativados secretam altos níveis de TNF $\alpha$ , que também estimula atividades microbidas (Aliberti 2005).

Os efeitos da atividade pró-inflamatória mediada por IFN $\gamma$  e principalmente TNF $\alpha$  podem ser tóxicos para o hospedeiro, levando a sérios danos teciduais no local da infecção. Desta forma, alguns mecanismos imunomoduladores devem entrar em ação, de modo a prevenir respostas inflamatórias exacerbadas e, com isso, evitar danos teciduais mais sérios ao hospedeiro. Um papel importante na regulação da resposta imune celular ao *T. gondii* é exercido pela IL-10, que é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos

ativados por IFN $\gamma$ , sobre a diferenciação de clones Th1 de células T, sobre a produção de IFN $\gamma$  por células NK e linfócitos T, e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Camundongos deficientes de IL-10 não conseguem controlar a resposta inflamatória induzidas pela infecção e morrem durante a fase aguda, devido ao grande infiltrado leucocitário e à necrose tecidual no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Gazzinelli et al. 1996; Suzuki et al. 2000). Interessante observar que estes animais controlam a infecção pelo *T. gondii* e portanto morrem em função da imunopatologia decorrente da ausência de IL-10. De fato, a mortalidade pode ser prevenida utilizando-se tratamentos que limitam a magnitude da resposta de células T CD4, como por exemplo a administração de anticorpos anti-CD4 (Gazzinelli et al. 1996), bloqueio simultâneo de CD28/CD80 (Villegas et al. 2000) e CD40/CD40L ou de CD28/CD80 e neutralização da IL-2 (Wille et al. 2002).

Durante a fase crônica da infecção, as respostas do hospedeiro continuam pelas mesmas vias descritas para a infecção aguda, o que faz com que o parasito permaneça no interior dos cistos teciduais com uma baixa taxa de replicação. Porém, para evitar danos teciduais durante a fase crônica, as respostas inflamatórias do hospedeiro são controladas pela expressão de IL-10 e por outros mecanismos, dentre eles, a produção de lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), a qual também limita a produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes. Estes mecanismos previnem a resposta exacerbada do hospedeiro, principalmente no sistema nervoso central, mas garantem a continuidade da atividade microbicida de macrófagos no controle da reativação da infecção (Aliberti 2005).

Alguns mecanismos podem ser usados pelo *T. gondii* para evadir da resposta imune do hospedeiro e garantir uma infecção bem sucedida. Um mecanismo inicial que garante a sobrevivência do *T. gondii* após a infecção é a prevenção da união do vacúolo parasitóforo

com lisossomos da célula hospedeira, evitando sua digestão intracelular. Como macrófagos são as principais células efetoras na destruição dos parasitos, outro mecanismo de evasão é a invasão ativa dos próprios macrófagos, fazendo com que escapem da explosão respiratório, processo microbicida que segue a fagocitose de patógenos por fagócitos (Hegab e Al-Mutawa 2003). Muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de decifrar outras vias de evasão imune desenvolvidas por *T. gondii*, tais como a secreção de fatores imunossupressores, que podem limitar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, interferir nas vias de sinalização intracelular de células imunes e, mesmo, prevenir a apoptose de células infectadas (Montoya e Liesenfeld 2004; Aliberti 2005). Apesar do *Toxoplasma gondii* ter capacidade de infectar uma série de espécies causando patologia de igual evolução nos diversos hospedeiros, a resposta imune protetora por trás desse processo pode ser diferente nos vários organismos. Contudo, humanos infectados pelo *T. gondii* também apresentam resposta Th1 específica ao parasito, caracterizada por níveis elevados de IgG1 e IgG3 anti-*T.gondii* (Johnson e Sayles 2002) e intensa produção de IFN $\gamma$ .

Em humanos, as células T CD4 parecem ter papel fundamental na resposta imune contra o parasito. Em 1991, Saavedra & Herion, identificaram a produção de IL-2 e IFN $\gamma$  por clones de células T CD4 específicos para *T gondii*, isolados do sangue de pacientes soropositivos para toxoplasmose (Saavedra et al. 1991). Também foi demonstrado que as células T CD4 apresentam um perfil Th0 nos pacientes com toxoplasmose crônica, uma vez que, quando estimuladas com células infectadas com o parasito, essas células produzem níveis comparáveis de IL-4 e IFN $\gamma$ , detectadas pelo ELISA (Prigione et al. 2000).

Na prima infecção pelo parasito, mulheres grávidas apresentam diminuição da razão celular T CD4/CD8 e aumento significativo de células T expressando o TCR do tipo  $\gamma\delta$ . As células T CD4 responsivas ao taquizoíto em sua maioria apresentam perfil Th0 ou Th1, com

expressão de grandes quantidades de IFN $\gamma$  (Prigione et al. 2006). De fato, em humanos, ambas as células T CD4 e CD8 apresentam atividade citolítica, eliminando células infectadas pelo parasito (Montoya e Remington 1996). Essas células atuam através de perforina e FasL, e essa atividade é aumentada pelo IFN $\gamma$  (Suzuki et al. 2010).

A susceptibilidade genética do hospedeiro também pode contribuir para o desenvolvimento da toxoplasmose, influenciando na resposta imune ao parasito. Estudos genéticos realizados em 160 indivíduos brasileiros acometidos pela retinocoroidite toxoplásmica encontraram associação entre o polimorfismo de base única (SNP) rs352140 no gene do *TLR9* e o desenvolvimento de lesão ocular. Além do *TLR9*, foram também investigados os *TLR2* e *TLR5*, porém a associação com a doença não ficou evidente (Peixoto-Rangel et al. 2009). Já o polimorfismo de *NOD2* foi associado com a susceptibilidade a doença ocular (Dutra et al. 2012). Também foram examinados SNPs no gene *P2X7* em 149 trios de crianças com toxoplasmose congênita e seus respectivos pais e foi encontrada uma forte associação com o SNP rs1718119, que causa uma mudança de aminoácido no receptor na posição 348, Thr-348-Ala, com manifestações da doença, considerando casos de toxoplasmose cerebral e oftálmica (Jamieson et al. 2010). Além disto, macrófagos de indivíduos com o alelo 1513C SNP rs3751143, que leva à perda de função do P2X7R, são menos eficientes em eliminar o parasito, em comparação com macrófagos possuindo o alelo selvagem, 1513A (Lees et al. 2010). Polimorfismos no gene do IFN $\gamma$  também foram associados ao desenvolvimento de retinocoroidite. Em 34 indivíduos com lesões oculares, o genótipo A/A do polimorfismo (+874T/A) foi encontrado com maior frequência, em comparação com 134 indivíduos do grupo controle, o que sugere que a homozigose para o alelo A nessa população possa estar relacionado ao desenvolvimento das lesões (Albuquerque et al. 2009).

A infecção com *Toxoplasma gondii* tem sido um modelo de grande valia para elucidar o papel de moléculas que participam da resposta imune. Considerando os dados da literatura, a infecção pelo *T. gondii* tem a característica marcante de ativar fortemente mecanismos da imunidade inata e, como consequência, o desenvolvimento de uma sólida imunidade mediada por células antígeno-específicas. O desenvolvimento da imunidade inata, por sua vez, depende da sinalização via receptores específicos que reconhecem padrões moleculares expressos pelo parasito e a eficiente sinalização através destes receptores depende de moléculas como a cinase IRAK4. Sendo assim, justificamos este estudo que visa o melhor entendimento do papel da cinase IRAK4 na resistência à toxoplasmose.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Geral**

Neste trabalho temos como objetivo geral avaliar o papel da proteína cinase 4 associada ao receptor da interleucina 1 (IRAK4) na infecção pelo parasito *Toxoplasma gondii*, tanto em humanos quanto em modelo murino.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1** Caracterização da susceptibilidade de camundongos deficientes para a proteína cinase 4 associada ao receptor da interleucina 1 (IRAK4<sup>-/-</sup>) frente à infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

**2.2.2** Caracterização da resposta imune inata e adaptativa frente à infecção ao *Toxoplasma gondii* em modelo murino deficiente para IRAK4.

**2.2.3** Seleção de polimorfismos de base única (SNPs) associados ao gene da proteína cinase 4 associada ao receptor da interleucina 1.

**2.2.4** Análise da associação dos SNPs selecionados quando a susceptibilidade ou resistência a toxoplasmose.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Camundongos

Camundongos deficientes para a molécula IRAK4 foram produzidos por meio da inserção de um cassete de neomicina no éxon 2 do gene codificador da proteína IRAK4 (Suzuki et al. 2002). Animais homozigotos (IRAK4<sup>-/-</sup>) e heterozigotos (IRAK4<sup>+/-</sup>) machos de 8 a 12 semanas apresentando *background* genético C57BL6 e 129/Ola foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Costa de Oliveira. Todos os animais foram mantidos em microisoladores nos Biotérios de Experimentação da Universidade Federal de Minas Gerais e Centro de Pesquisas René-Rachou/FIOCRUZ durante o período experimental. Todos os procedimentos de manipulação e experimentais foram conduzidos de acordo com os protocolos de Ética animal (CEUA UFMG P-4/09-2) de ambas as instituições anteriormente citadas.

#### 3.2 Tipagem dos camundongos

Em colaboração com a Dra. Fernanda Souza de Oliveira, todos os animais utilizados neste estudo foram submetidos a testes para a confirmação da deficiência homozigota ou heterozigota (Oliveira et al. 2011). DNA genômico foi extraído dos camundongos a partir de uma porção da extremidade da cauda, e em seguida submetido a genotipagem utilizando os iniciadores com as seguintes seqüências:

A. Iniciador Controle: 5' TCT TCT ACC TGA AAT ATG AAA GAT TCC T 3';

B. Iniciador Mutante: 5' TGA ATG GAA GGA TTG GAG CTA CGG GGG T 3'

C. Iniciador Comum: 5' GAA CAC GCT CCC AGG TCT CTT TCC AAC A 3'.



Os iniciadores A e C foram utilizados para amplificação do gene selvagem e o produto de amplificação gerado foi de 500 pb. A combinação dos iniciadores B e C foi utilizada para amplificação do gene interrompido e o produto da amplificação gerado foi de 600 pb. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L contendo: tampão 1x, 0,2mM dNTPs, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 $\mu$ M dos iniciadores A ou B e 0,25 $\mu$ M do iniciador C, 1U de Taq DNA polimerase (Promega) e 1ng/ $\mu$ L de DNA. Foi utilizado o aparelho termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.) conforme as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos para os iniciadores A e C, e 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos para os iniciadores B e C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%.

### **3.3 Obtenção e manutenção da cepa RH de *T. gondii***

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos *in vivo*, por inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, através de passagens seriadas, com intervalos de 48-72 horas. Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fosfato a 0,01 M (PBS, pH 7,2) e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (45 x *g*, 1 minuto, 4°C) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x *g*, 10 minutos, 4°C) com PBS. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 10mL de PBS e os parasitos contados em câmara hemocitométrica e avaliados quanto a viabilidade e contaminação sob microscopia de luz. Após nova lavagem com PBS, o sedimento foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii* (Gazzinelli et al. 1991).

### **3.4 Obtenção e manutenção da cepa ME49**

Cérebros de camundongos Swiss cronicamente infectados com a cepa ME-49 foram removidos e macerados em PBS estéril e submetidos a sucessivas passagens em agulha para total liberação dos cistos teciduais. Após a contagem dos cistos sob microscopia de luz, os mesmos foram diluídos para a concentração de 10 a 20 cistos em 100µL de PBS estéril. Para a manutenção da cepa, o volume e a concentração previamente estabelecidos foi inoculada nos animais pelo método de gavagem. Animais em fase crônica da infecção se tornavam elegíveis para o repique da cepa ou utilização dos seus cistos em ensaios experimentais (de Oliveira et al. 2009).

### **3.5 Extração de antígenos**

Antígeno solúvel de taquizoítas de *T. gondii* foi preparado como descrito por Scott e colaboradores (1987) (Scott et al. 1987), com algumas modificações. Suspensões parasitárias ( $1 \times 10^8$  taquizoítas/mL) foram submetidas a seis ciclos de ultra-som durante 1 minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação ( $10.000 \times g$ , 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada. Alíquotas dos antígenos foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

### **3.6 Infecção, morbidade e mortalidade**

Animais IRAK4 deficientes ( $^{-/-}$ ), IRAK4 heterozigotos ( $^{+/-}$ ) e da linhagem 129/Ola, foram infectados pelo método de gavagem com 20 cistos da cepa ME-49. Durante 30 dias, foram observados quanto a morbidade e mortalidade. Para a avaliação de morbidade foram atribuídos índices que aumentavam de acordo com a gravidade da morbidade apresentada pelo animal como: 0 - pelagem normal, manutenção do peso e atividade motora normal; 1 -

pelo arrepiado; 2 - 10% de perda de peso; 3 - arqueamento postural, dificuldade motora e pelagem arrepiada e endurecida; 4 - relutância em se mover e 20% de perda de peso; 5 - morte.

### **3.7 Patologia**

Animais IRAK4<sup>-/-</sup>, IRAK4<sup>+/-</sup> e 129/Ola foram avaliados 7, 9 e 20 dias após infecção quanto a patologia desencadeada pela infecção. Animais não infectados foram avaliados como controle. Órgãos como cérebro, pulmão, fígado e baço foram examinados. Os tecidos foram coletados com instrumentais estéreis, banhados em PBS estéril e acondicionados em formol tamponado até a sua inclusão em parafina. Após, seccionados por micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou Giemsa. Os cortes foram observados sob microscopia de luz quanto á arquitetura tecidual, infiltrado celular e presença de cistos do parasito (cérebro). Avaliações morfométricas foram feitas no baço dos animais IRAK4<sup>-/-</sup>, IRAK4<sup>+/-</sup> infectados e não infectados para determinar a área dos folículos e centros germinativos utilizando o programa KS300 (Zeiss, Alemanha).

### **3.8 Reconstituição IL-12 recombinante (rIL-12) *in vivo***

Camundongos deficientes infectados oralmente com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* foram tratados diariamente por via intraperitoneal com rIL-12 (eBioscience) na concentração de 150ng por animal. O tratamento foi feito por 7 dias consecutivos tendo início 24 horas após a infecção. Como controle experimental, camundongos deficientes foram infectados e tratados com PBS em idênticas condições (Pifer et al. 2011).

### **3.9 PCR Real Time**

Células do baço e fígado de animais infectados por 7 e 9 dias foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização. DNA total foi extraído utilizando o método de fenol clorofórmio e quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). Para a amplificação do gene B1 de *Toxoplasma gondii* foram desenhados pelo nosso laboratório iniciadores utilizando o software PrimerSelect (Lasergene software suite, DNASTAR) com as seguintes sequências: 5'- CTGGCAAATACAGGTGAAATG-3' e 5'- GTGTACTGCGAAAATGAATCC-3'). As reações de PCR foram padronizadas em um volume final de 20 $\mu\text{L}$ , 25ng de DNA total, 10ng de cada iniciador e SYBR Green Supermix 1x (BioRad). A especificidade da amplificação foi analisada através da curva de dissociação de cada amostra. Amostras não infectadas não apresentaram amplificação e foram utilizadas como parâmetros negativos das reações. Quantificação relativa foi feita utilizando uma curva padrão de DNA do parasito e os resultados foram expressos em pg de DNA por 25ng de DNA total.

### **3.10 Isolamento de esplenócitos**

Baços de animais IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> 7 dias infectados oralmente com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e animais controles não infectados, foram coletados para ensaios *ex vivo*. Os órgãos foram lavados após a retirada em PBS estéril e armazenados sob refrigeração até a sua utilização. Para melhor obtenção das células, os baços foram incubados 0,4 mg/mL de Liberase CI (Roche) por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e em seguida macerados em peneira de nylon (100 $\mu\text{m}$ ). As células coletadas em tubo cônico contendo 25ml de meio RPMI 1640 suplementado com sulfato de gentamicina 40mg sem soro fetal bovino (SFB, RPMI incompleto) foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10min a 170 x g. As células foram submetidas ao tratamento com tampão de lise de hemácias (NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tris-

HCl 10mM pH 7,0) com subsequente lavagem das células em meio de cultura. A contagem das células por mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com sulfato de gentamicina 40mg e SFB (Gibco; RPMI completo) foi feita em câmara de Neubauer com a utilização de Azul de Tripán. Após contagem, as células foram plaqueadas nas quantidades necessárias para cada ensaio.

### 3.11 Citocinas

Esplenócitos de animais IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> infectados por 7 dias ou controle não infectados, foram cultivados na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células por poço, em um volume final de 500 $\mu$ L de meio RPMI completo, sem estímulo, por 48 horas, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após cultura, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C. O soro destes mesmos animais foi também coletado e armazenado a -20°C. Tanto os sobrenadantes quanto os soros foram utilizados para a dosagem de citocinas: IL-12p40 por ELISA e TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MCP1, IL-10 e IL-6 por CBA (BD).

### 3.12 Citometria de Fluxo

Células do baço foram avaliadas quanto ao fenótipo celular ((células dendríticas: CD11c, MHCII, CD40 e CD86), (monócitos/macrófagos: CD11b, F4/80 e GR1), (linfócitos T: CD3, CD4, CD8, CD62L e CD44), (linfócitos B: CD19 e CD69) e (células *natural killer* (NK): CD3 e NK1.1)), produção intracelular de citocinas (IL12p40, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) e proliferação celular (Ki67). Para avaliar a produção de citocinas pelas células dendríticas e monócitos/macrófagos,  $2 \times 10^6$  células do baço foram cultivadas na presença de Brefeldina-A (*GolgiPlug Protein Transport Inhibitor*, BD Biosciences) por 6 horas, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, com LPS (100ng/mL), STAg (5 $\mu$ g/mL) ou somente meio de cultura. Para analisar linfócitos T e células

NK,  $1 \times 10^6$  de células do baço foram cultivadas por 20 horas na presença de STAg (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-CD3 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou somente meio de cultura. Brefeldin-A foi adicionada nas culturas de linfócitos T e células NK após 12 horas de cultura e antes da marcação fenotípica com anticorpos monoclonais. Linfócitos B foram avaliados *ex vivo* a partir de  $1 \times 10^6$  esplenócitos. Suspensões celulares foram lavadas com PBS suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA), centrifugadas a  $270 \times g$  por 5 minutos e incubadas com diferentes combinações de anticorpos diluídos em PBS 1% BSA por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  protegida da luz. As células foram então novamente lavadas com PBS 1% BSA, fixadas e permeabilizadas com *Cytofix/Cytoperm* (BD) por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Para a marcação intracelular de citocinas ou do marcador de proliferação celular, as suspensões foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) com anticorpos específicos para estas moléculas, previamente diluídos em tampão de permeabilização (BD). As células foram então finalmente lavadas por duas vezes pela centrifugação por  $270 \times g$  por 5 minutos em tampão de permeabilização, para que o excesso de anticorpo não ligado deixasse o interior das células. As suspensões celulares foram finalmente resuspensas em  $200 \mu\text{L}$  de paraformaldeído 2%. Os dados coletados em Citômetro de Fluxo LSR II, software Diva (BD Biosciences), foram analisados com o programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR) na versão 8.8.6.

**Anticorpos: BD Pharmigen:** I-A/I-E-Biotin (2G9); I-A/I-E-APC (M5/114.15.2), CD86-PECy7 (IT2.2), NK1.1-FITC (PK136), CD3-PerCP5.5 (145-2C11), CD19-FITC (1D3), CD69-PE (H1.2F3), CD8-PECy7 (53-6.7), CD62L-APC (MEL-14), FC Block, IL-12-PE (C17.8), TNF $\alpha$ -PECy7 (TN3-19), IFN $\gamma$ -PE (XMG1.2) and Ki67-PerCP5.5 (20Raj1). **eBioscience:** CD19-APC-eFluor780 (1D3), CD86-APC (B7-2), CD11c-Alexa700 (N418), CD40-PECy5 (1C10), GR1/Ly-6G and Ly-6C-PECy5 (RB6-8C5), CD4-PO (RM4-5), CD44-PB (IM7), CD11b-FITC (M1/70), F4/80-APC (BM8), and recombinant IL-12 (rIL-12). **Invitrogen:** streptavidin-QD605 (Q10101MP).

### **3.13 População**

A aprovação ética deste estudo foi obtida no *Institutional Review Boards* da Universidade de Chicago, Hospital e Centro médico *Michael Reese*, pelo comitê e diretoria do *Data Safety Monitoring* e NIH. Um total de 179 crianças acompanhadas de seus pais (trios) foi selecionado do *National Collaborative Chicago-based Congenital Toxoplasmosis Study* (NCCCTS). O diagnóstico da toxoplasmose congênita foi confirmado com base em achados clínicos; diagnósticos (tomografia cerebral e avaliação oftalmológica) e testes de sorologia para toxoplasmose, feitos em colaboração com o Laboratório do Instituto de Pesquisa Médica Palo Alto. Os critérios para a inclusão no estudo foram: (i) idade inferior a 2,5 meses no momento do diagnóstico; (ii) o diagnóstico de toxoplasmose congênita altamente provável como descrito anteriormente; (iii) disponibilidade de serem avaliados periodicamente pelos profissionais deste estudo e (iv) não estarem fazendo uso de substâncias imunossupressoras.

### **3.14 Obtenção do material biológico**

Células do sangue periférico de todos os indivíduos do estudo e seus pais (trios) foram isoladas e criopreservadas. Uma pequena amostra (10mL) dessas células foi misturada a tampão de lise (meio de transporte) e enviados ao laboratório em temperatura ambiente para extração do material genético (DNA). De todos os indivíduos selecionados, 149 crianças e pais que preencheram os critérios de inclusão tiveram seu material genético (DNA) extraído com sucesso.

### **3.15 Seleção dos SNPs e Associação alélica**

Para obter boa cobertura haplotípica em nossas análises foi utilizado um limiar de frequência alélica mínima (MAF) de 5%. Dezoito SNPs distribuídos ao longo do gene de IRAK4 foram selecionados da base de dados **HapMap** (<http://www.hapmap.org>) usando sequências flanqueadoras de 10kb de cada lado do gene. Além disso, também foi utilizado o método de seleção de tag-SNPs ( $r^2=0.8$ ) implementado através do programa **Haploview** (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) para eleger os SNPs a serem genotipados que melhor contribuiriam para análise do gene selecionado.

A análise de associação alélica foi feita usando **UNPHASED** (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>).

### **3.16 Genotipagem dos SNPs**

A genotipagem de sete SNPs foi realizada nos 124 trios que apresentaram confirmação da infecção congênita por *T. gondii*, através da presença de calcificações cerebrais com ou sem hidrocefalia e lesões oculares. Utilizando a técnica TaqMan™, foram feitas diluições de 5ng/μl das amostras de DNA e de controles de DNA conhecidos em placas de 96 poços e transferidas para uma placa de 384 poços (Applied Biosystems), incluindo uma amostra de água. O volume final de reação foi de 5μl, e continha 10ng de DNA, 2,5μl de PCR Mastermix Universal (Applied Biosystems), 0,56X do mix de iniciadores/sondas (do estoque de 40X). As reações foram montadas automaticamente usando o sistema robotizado BiomekFX. As placas foram seladas com plásticos adesivos (Applied Biosystems) e as PCR foram feitas nos termocicladores MJ Research PTC-225, da seguinte maneira: 95°C por 10 minutos, 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, repetindo os ciclos por 40 vezes.



Os dados obtidos foram analisados no sistema de detecção de seqüência ABI Prism® 7900HT (Applied Biosystems™, CA, USA). O agrupamento dos dados em três grupos de genótipos foi realizado usando o programa *Sequence Detection System* (SDS) da Applied Biosystems.

### **3.17 Estatística**

Para os estudos em camundongo, a mortalidade dos grupos experimentais foi analisada usando teste de *Log-rank*. A diferença estatística entre os grupos foi verificada usando Teste *t* ou *Mann-Whitney* para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Todos os testes foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism (v 5.0) (GraphPad Softwares Inc., La Jolla CA). Para os estudos genéticos em humanos, a análise de associação alélica foi feita usando o teste convencional para a transmissão do desequilíbrio de ligação gênica (TDT). O desequilíbrio de ligação (LD) é uma associação não randômica de alelos de dois ou mais locus. Seria uma aproximação do histórico de recombinações gênicas entre dois locus. Os valores de  $p$  foram calculados utilizando Haploview (<http://www.broadinstitute.org/haploview>). Os valores de  $p =$  ou  $< 0,05$  foram consideráveis estatisticamente significativas para as avaliações em modelo experimental e humanos.

## 4. RESULTADOS

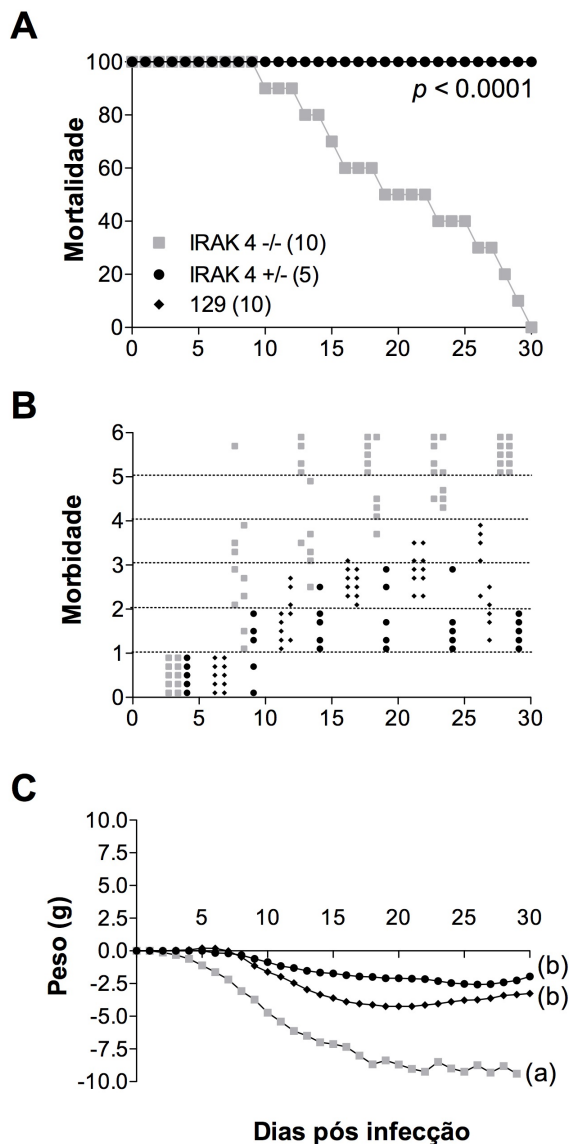
### 4.1 Análise de morbidade, mortalidade e parasitismo, de animais infectados oralmente com o parasito *T. gondii*.

No intuito de avaliar o papel da cinase IRAK4 na resistência durante a toxoplasmose, infectamos animais deficientes para cinase IRAK4 com a cepa ME49 do *Toxoplasma gondii*. Animais IRAK4<sup>-/-</sup>, IRAK4<sup>+/-</sup> e 129/Ola foram infectados pelo método de gavagem com 20 cistos da cepa ME49, e acompanhados diariamente pelo período de 30 dias após a infecção para a avaliação da morbidade, mortalidade e parasitismo. Durante este período os animais foram avaliados quanto a perda de peso, sinais clínicos e morte. A avaliação da morbidade foi feita baseando-se em *scores* de 0 a 5, sendo 0 - pelagem normal, manutenção do peso e atividade motora normal; 1 - pelo arrepiado; 2 - 10% de perda de peso; 3 - arqueamento postural, dificuldade motora e pelagem arrepiada e endurecida; 4 - relutância em se mover e 20% de perda de peso; 5 - morte. A gravidade destes sinais está associada com o número crescente desta classificação podendo ser considerados como leve (0 a 1), moderado (2 a 3) e grave (4 a 5). Analisando o critério morbidade, observamos que animais heterozigotos e selvagem apresentam sinais clínicos classificados como moderados, que se resolvem após a segunda ou terceira semana pós infecção. Já os animais deficientes, infectados com o *T. gondii*, apresentam sinais clínicos graves incluindo sintomas neurológicos que indicam acometimento cerebral. Além disso, a perda de peso destes animais é significativa quando comparado com os animais IRAK4<sup>+/-</sup> e 129 (**Figuras 6B e 6C**).

De acordo com os dados de morbidade e perda de peso, a mortalidade dos animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados foi detectada precocemente, a partir do décimo dia de infecção, chegando a 100% dos animais mortos ao trigésimo dia pós infecção (**Figura 6A**). Diferente

deste fenótipo, nenhuma morte foi observada nos outros dois grupos de animais, heterozigotos e selvagens avaliados nas mesmas condições **(Figura 6A)**.

Com o objetivo de analisar se os sinais clínicos da doença e a mortalidade observada nos camundongos IRAK4<sup>-/-</sup> foram decorrentes de uma falha no controle da replicação do parasito, nós avaliamos o parasitismo tecidual nos animais IRAK4<sup>-/-</sup>, IRAK4<sup>+/-</sup> e WT. Os animais foram infectados com 20 cistos da cepa ME49 via gavagem e avaliados através das técnicas de patologia e PCR em tempo real. Cérebros de animais infectados a 20 dias foram coletados e após serem seccionados, foram corados com HE para análise histopatológica e com Giemsa para a quantificação dos cistos, ambos por observação em microscopia ótica. Observamos que os cérebros dos camundongos IRAK4<sup>-/-</sup> infectados com *T. gondii* apresentaram um número significativo maior de cistos do parasito quando comparado com os controles heterozigoto e selvagem (IRAK4<sup>+/-</sup> e 129, respectivamente) **(Figuras 7A e 7B)**. Além disso, as análises histopatológicas dos cérebros dos animais deficientes revelaram numerosos focos de necrose tecidual, sempre associados aos cistos do parasito íntegros e/ou rotos. Animais controles, heterozigotos e WT, apresentaram raros focos de necrose não associados a presença do parasito **(Figura 7A)**.

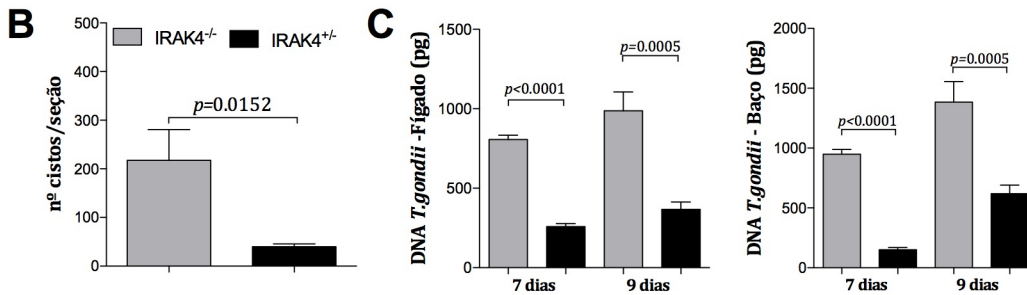
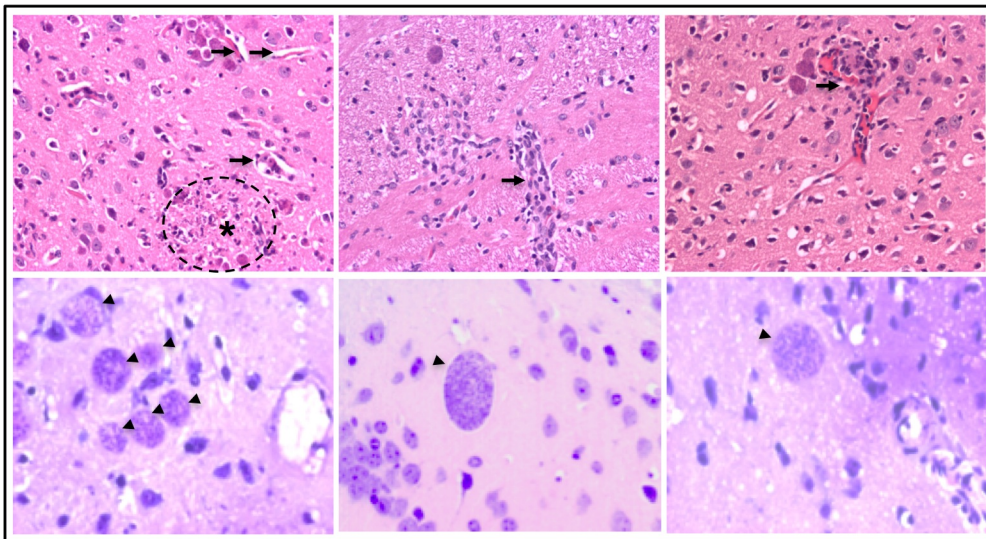


**Figura 6. Animais deficientes em IRAK4 são mais susceptíveis a infecção pelo *T. gondii*.** Animais IRAK4 $^{-/-}$ , IRAK4 $^{+/-}$  e 129/Ola foram infectados via gavagem com 20 cistos da cepa ME49. **(A)** Mortalidade, **(B)** morbidade e **(C)** perda de peso (letras diferentes indicam diferença estatística significativa,  $p < 0,0001$ ) foram avaliados por 30 dias após a infecção. Números dentro dos parênteses indicam o número de animais utilizados nos experimentos apresentados em **A** e **C**. Em **B** cada símbolo representa um animal e a classificação da morbidade seguiram os parâmetros descritos na tabela a direita seguiram a seguinte denominação: 0 - pelagem normal, manutenção do peso e atividade motora normal; 1 - pelo arrepiado; 2 - 10% de perda de peso; 3 - arqueamento postural, dificuldade motora e pelagem arrepiada e endurecida; 4 - relutância em se mover e 20% de perda de peso; 5 - morte. Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

Seguindo a interpretação histopatológica da doença cerebral, animais heterozigotos e WT apresentaram inúmeros focos de infiltrado inflamatório perivascular moderado que sugere uma efetiva resposta inflamatória contra a replicação parasitária em ambos os grupos de animais controles. O mesmo não foi observado em animais deficientes, o que nos leva a crer que a ausência de células inflamatórias, tanto mielóides quanto linfóides, estariam intimamente ligadas ao aumento do parasitismo, e que a necrose encontrada no tecido cerebral de animais deficientes estaria relacionada a presença do parasito no local e não a reações imunopatológicas (**Figura 7A**). Outros órgãos foram analisados quanto aos aspectos histopatológicos, sendo que para pulmão e fígado, não obtivemos amostras histológicas satisfatórias para análise. Já os dados referentes a análise das amostras de baço são descritos mais adiante no texto.

Além da visualização de cistos cerebrais como análise de parasitismo, nós também avaliamos a presença de DNA parasitário, da forma replicativa rápida, ou seja, taquizoítas, em baços e fígados. Os órgãos foram coletados 7 e 9 dias após infecção para avaliação pela técnica de PCR em tempo real. Observamos neste ensaio que, os níveis de DNA do parasito *T. gondii* eram significativamente maiores no baço e fígado dos animais deficientes em relação aos animais heterozigotos (**Figura 7C**).

**A**                      IRAK4<sup>-/-</sup>                      IRAK4<sup>+/-</sup>                      129

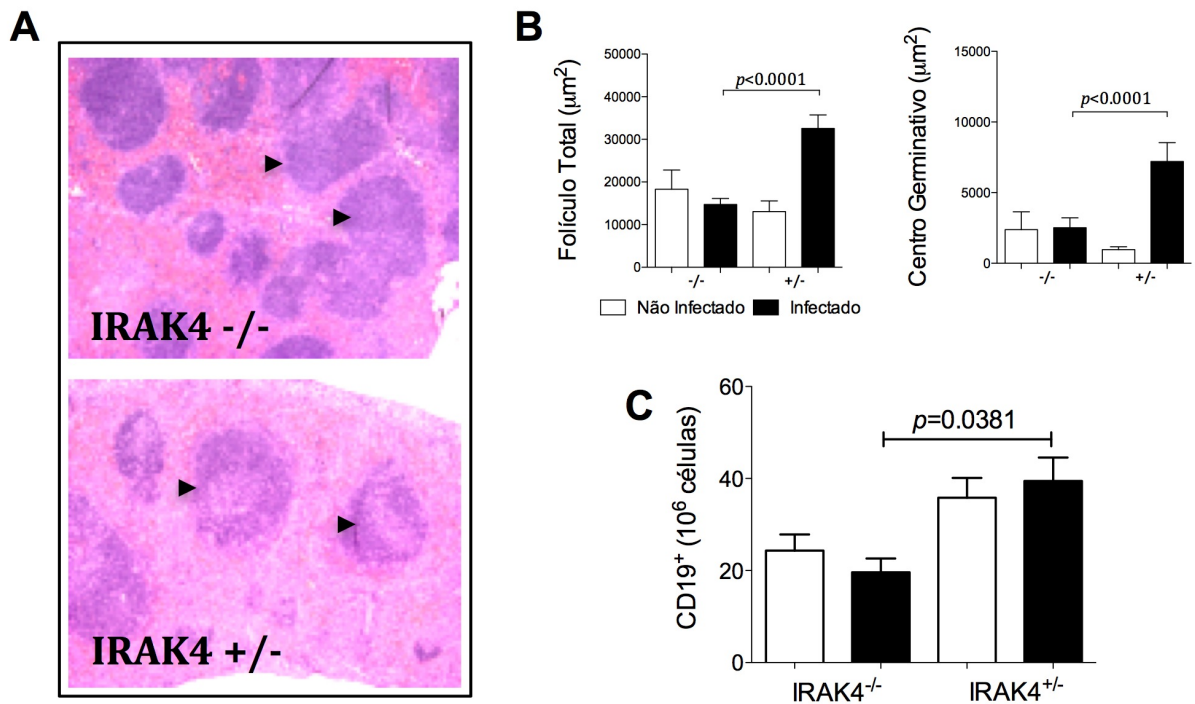


**Figura 7. O controle da parasitemia tecidual é dependente de IRAK4.** Animais foram infectados com 20 cistos da cepa ME49 e foram avaliados 7, 9 e 20 dias pós infecção. **A)** Painéis superiores mostram tecido cerebral corado com HE, onde as setas pretas indicam ausência e presença de infiltrado inflamatório perivascular em animais deficientes (esquerda) e controles (centro e direita). Área demarcada com pontilhado e asterisco indica moderada necrose associada a cistos íntegros e/ou rotos em animais IRAK4<sup>-/-</sup>. Painéis inferiores apresentam tecido cerebral contendo cistos parasitários corado com Giemsa. **B)** Quantificação do número de cistos por seção histológicas analisados por microscopia de luz em animais IRAK4<sup>-/-</sup> (barras cinzas) e IRAK4<sup>+/-</sup> (barras pretas). As barras representam médias ± SEM (n=5). **C)** Gráficos indicando a quantificação de DNA do parasito por PCR em tempo real no fígado (painel a esquerda) e no baço (painel a direita). As barras representam médias ± SEM (n=5). Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

#### 4.2 Avaliação do baço e de linfócitos B durante a infecção pelo *T. gondii*.

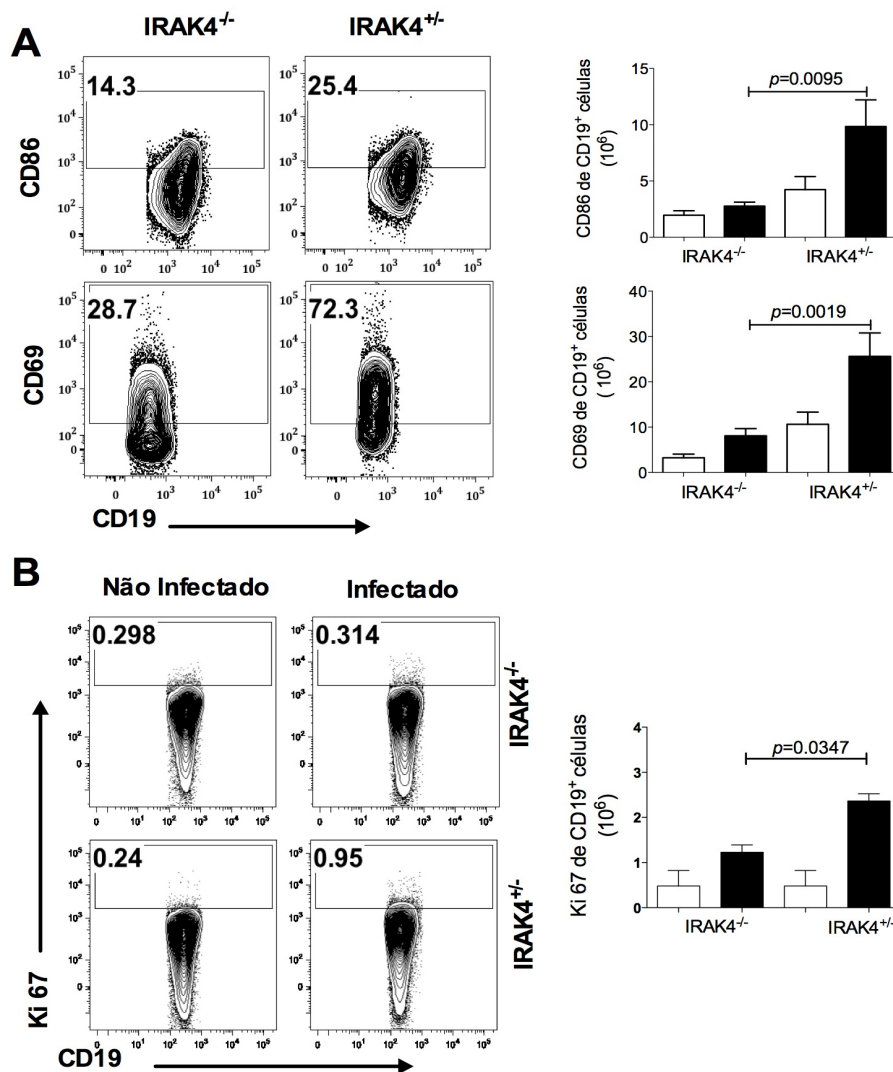
Camundongos infectados oralmente com 20 cistos da cepa ME49 foram sacrificados após 7 dias de infecção e deles coletados o baço para a avaliação histopatológica. Quando os baços dos camundongos IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> foram examinados em microscopia de luz, observamos que as estruturas foliculares e os centros germinativos apresentavam morfologia alterada nos animais deficientes. Pela avaliação morfométrica observamos que as áreas dos folículos e dos centros germinativos dos animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados eram quantitativamente menores do que os do animais IRAK4<sup>+/-</sup>. Além disso, os animais deficientes também apresentaram discreto infiltrado celular e halo linfocitário escasso, sugerindo que ambas as linhagens celulares mielóides e linfóides apresentavam pouca atividade neste órgão durante a infecção por *T. gondii* (**Figura 8A e 8B**).

Assim como na histopatologia, os ensaios de citometria de fluxo revelaram que os animais IRAK4<sup>-/-</sup> apresentavam número absoluto de células B significativamente menor quando comparada com animais heterozigotos (**Figura 8C**). Para melhor caracterizar o fenótipo das células B durante a infecção pelo *T. gondii*, na ausência de IRAK4, avaliamos também a frequência de células B ativadas através da expressão dos marcadores de ativação CD86 e CD69. Camundongos deficientes em IRAK4<sup>-/-</sup> apresentaram menores frequências de células CD19 expressando os marcadores de ativação descritos acima quando comparado com animais heterozigotos infectados com *T. gondii* (**Figura 9A**). Além dos parâmetros descritos acima, avaliamos também a capacidade proliferativa das células B esplênicas utilizando um marcador indireto e específico do ciclo celular, o Ki67, molécula expressa no momento em que a célula entra no estágio de intérfase. Células B de camundongos deficientes apresentaram uma menor capacidade proliferativa quando comparado a animais heterozigotos (**Figura 9B**).



**Figura 8. A deficiência de IRAK4 impacta na formação de centros germinativos durante a infecção pelo *T. gondii*.** Animais infectados com a cepa ME49 foram avaliados no sétimo dia após a infecção com *T. gondii*. **(A)** Baços de animais com 7 dias de infecção foram removidos e corados com HE para avaliação histopatológica. Cabeças de setas indicam centros germinativos ativos (IRAK4<sup>-/-</sup>) e não ativos (IRAK4<sup>+/-</sup>). **(B)** Quantificação da área dos folículos e centros germinativos em baço de animais IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> controles não infectados (barras brancas) ou infectados com *T. gondii* (barras pretas). **(C)** Número absoluto de células B (CD19<sup>+</sup>) quantificadas por experimento de citometria de fluxo. As barras representam medias  $\pm$  SEM (**A**, n=5; **B**, n=5; **C**, n=5). Os dados são representativos de três (**A e B**) e dois (**C**) experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

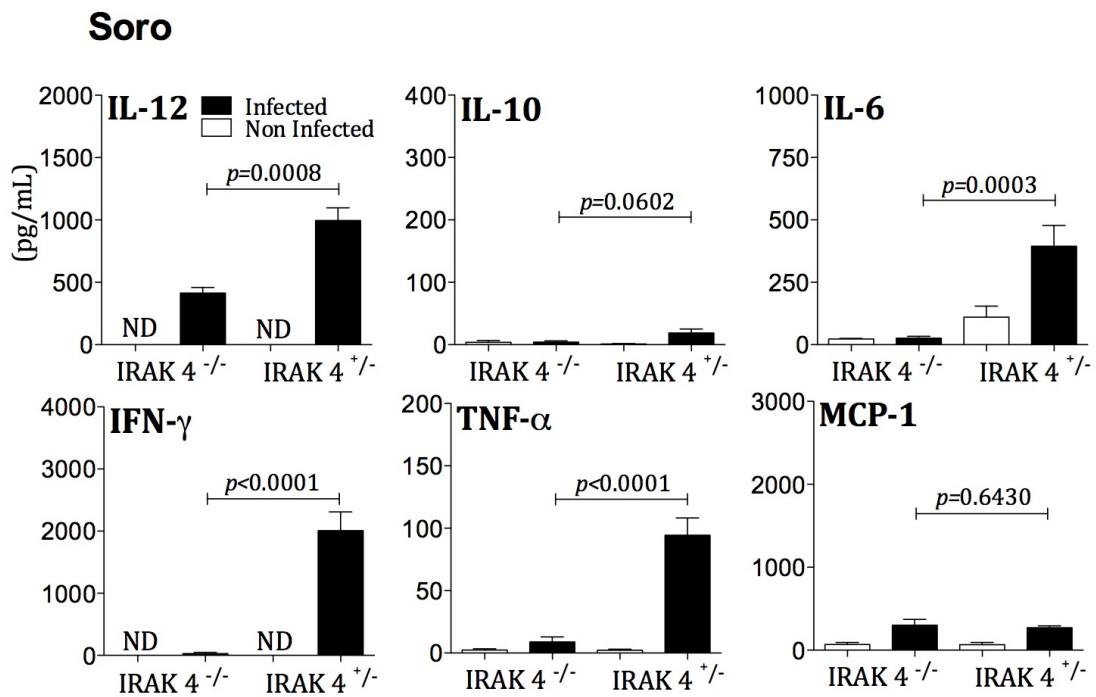




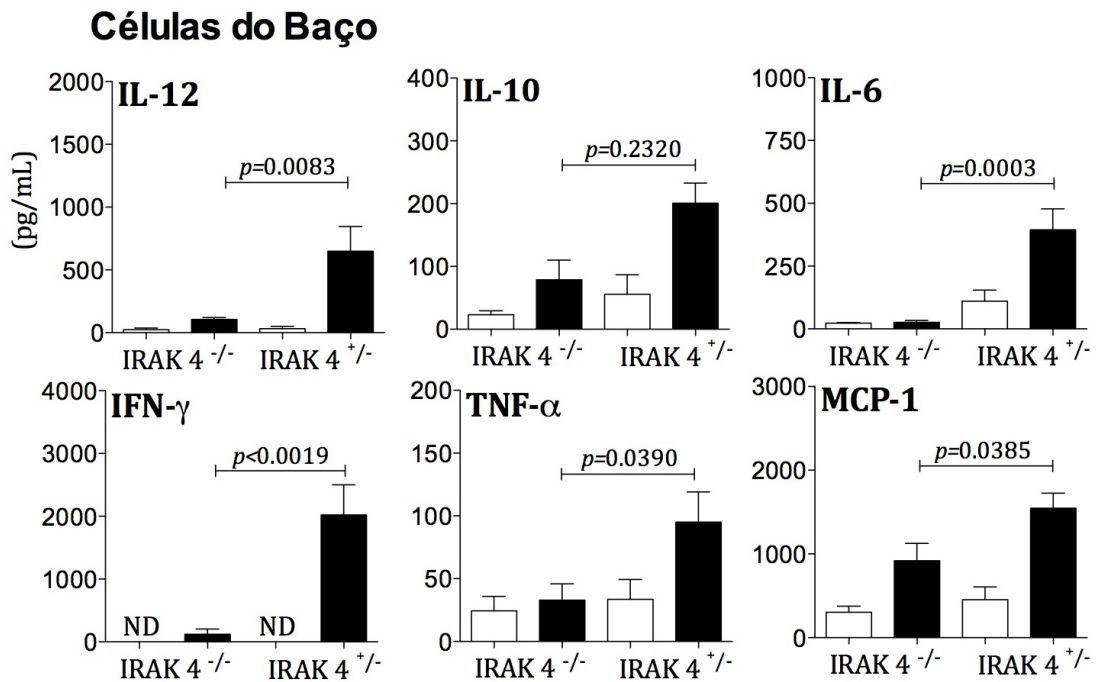
**Figura 9. Células B de animais deficientes em IRAK4 apresentam ativação prejudicada durante a infecção pelo *T. gondii*.** Animais infectados com 20 cistos da cepa ME-49 tiveram seus baços removidos 7 dias após infecção e suas células B analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Plots de citometria de fluxo representam as frequências de células B expressando os marcadores CD86 (gráficos superiores) e CD69 (gráficos inferiores). A direita, os gráficos em barra representam o número absoluto de células CD19 animais IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> controles não infectados (barras brancas) ou infectados com *T. gondii* (barras pretas). **(B)** Plots de citometria de fluxo demonstram a expressão do marcador de proliferação celular (Ki67) em células B de animais IRAK4<sup>-/-</sup> e IRAK4<sup>+/-</sup> infectados com *T. gondii* (barras pretas) e animais controles (barras brancas). As barras representam medias  $\pm$  SEM (**A**, n=5; **B**, n=5. Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares. Números dentro de cada retângulo representam as frequências de células dentro de cada janela de análise.

### 4.3 Defeito na produção de citocinas pró-inflamatórias em animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados com *T. gondii*.

Citocinas como IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  tem um papel importante na resistência do hospedeiro durante a infecção por *T. gondii*. Assim, nós avaliamos a produção destas citocinas pelos camundongos IRAK4<sup>-/-</sup> infectados oralmente com a cepa ME49 de *T. gondii*. Para uma avaliação sistêmica nós coletamos soro destes animais, via plexo orbital ou punção cardíaca, após 7 dias de infecção. Os baços também foram removidos no sétimo dia de infecção para a avaliação da capacidade dos esplenócitos produzirem estas mesmas citocinas após 48 horas de cultura sem estímulo. Os níveis de IL-12p70 (ELISA) e IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-6 e MCP-1 (CBA) foram avaliados no soro e no sobrenadante de cultura de células de animais deficientes em IRAK4 e heterozigotos. Animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados com *T. gondii* apresentaram falha na produção de IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Os baixos níveis de citocinas produzidos pelos camundongos deficientes foram observado tanto no soro (**Figura 10**) quanto no sobrenadante de cultura de esplenócitos (**Figura 11**). Os níveis de IL-10 e MCP-1 (CCL2) foram também significativamente menores no sobrenadante de cultura das células do baço derivadas de camundongos deficientes em IRAK4 infectados com *T. gondii*.



**Figura 10. IRAK4 deficientes apresentam falha na produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias.** Animais infectados com 20 cistos da cepa ME-49 tiveram seu soro coletado através do plexo orbital 7 dias após infecção. IL-12p70 foi quantificada por ELISA enquanto as demais citocinas avaliadas por CBA. As barras representam médias  $\pm$  SEM (n=5). Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares.



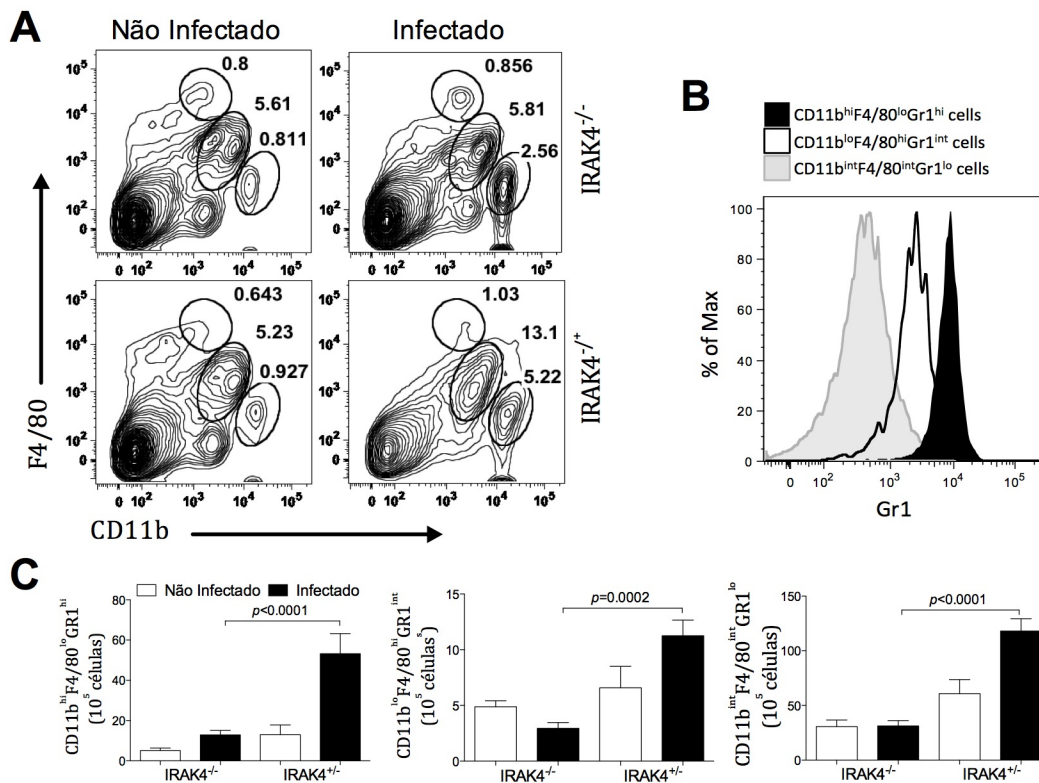
**Figura 11. Células do baço de animais IRAK4 deficientes apresentam falha na produção de citocinas pró-inflamatórias.** Animais infectados com 20 cistos da cepa ME-49 tiveram seus baços removidos 7 dias após infecção e suas células cultivadas na ausência de estímulo por 48h. Após coletado o sobrenadante celular avaliamos a citocina IL-12p70 por ELISA enquanto as demais citocinas foram quantificadas por CBA. As barras representam medias  $\pm$  SEM (n=5). Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

#### 4.4 Frequência e produção de citocinas por células mielóides de camundongos infectados com *T. gondii*.

Nosso próximo questionamento foi se a deficiência de IRAK4 estava associada com alterações no compartimento de células mielóides. Avaliamos assim as populações de células dendríticas e de monócitos/macrófagos nos baços de animais infectados pelo *T. gondii*. As subpopulações de monócitos/macrófagos foram definidas pela expressão de F4/80, que é um marcador específico para estas células, CD11b e também pela expressão de GR1 (Figura 12A e 12B).

Além disso, para certificarmos que não incluiríamos erroneamente neutrófilos em nossas análises avaliamos também a expressão de MHC de classe II. Assim, as células que não expressavam esta molécula foram excluídas das análises. Animais IRAK4<sup>-/-</sup> apresentaram uma menor frequência de células F4/80 quando comparado com animais IRAK4<sup>+/-</sup>. Os números absolutos das três subpopulações distintas de monócitos/macrófagos estudadas (F4/80<sup>hi</sup>CD11b<sup>lo</sup>Gr1<sup>lo</sup>, F4/80<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup>Gr1<sup>lo</sup>, F4/80<sup>lo</sup>CD11b<sup>hi</sup>Gr1<sup>hi</sup>) também foram menores em animais IRAK4<sup>-/-</sup> do que em animais IRAK4<sup>+/-</sup> infectados com *T. gondii* (**Figura 12C**).

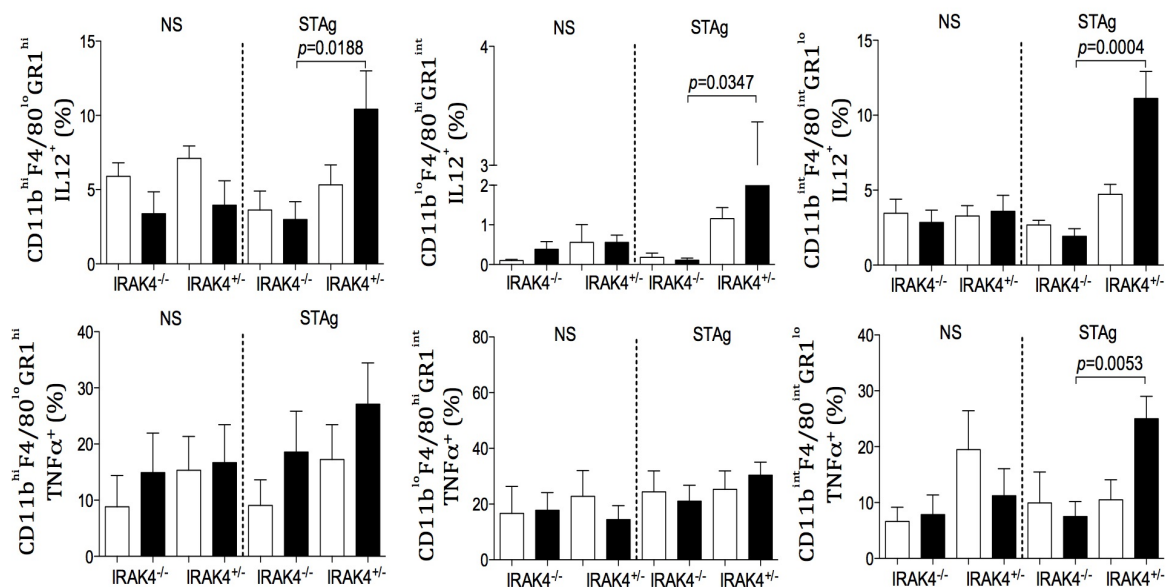
É importante mencionar que na ausência da infecção pelo *T. gondii*, não foram observadas diferenças nos números absolutos ou proporções das subpopulações de monócitos/macrófagos quando os camundongos deficientes e controles heterozigotos foram comparados (**Figura 12A e C**). Esta observação indica que na ausência de infecção, a deficiência de IRAK4 não interfere no recrutamento, migração e diferenciação destas células em tecidos periféricos.



**Figura 12. A deficiência de IRAK4 causa alterações na distribuição das populações de monócitos/macrófagos durante a infecção pelo *T. gondii*.** Monócitos/macrófagos de animais IRAK4<sup>+/-</sup> e IRAK4<sup>-/-</sup> foram analisados 7 dias após infecção com *T. gondii*. Plots de citometria de fluxo representativos (A) mostrando as freqüências das diferentes subpopulações de células mielóides esplênicas de animais IRAK4<sup>+/-</sup> e IRAK4<sup>-/-</sup>, baseado na expressão de F4/80 e CD11b. A expressão de Gr1 foi avaliada dentro de cada subpopulação (B). Gráficos de barras (C) mostram os números absolutos de cada subpopulação em camundongos controles (barras brancas) e infectados com *T. gondii* (barras pretas). As barras representam médias ± SEM (n=5). Os dados são representativos de três experimentos independentes que apresentaram resultados similares. Números do lado de cada círculo representam as freqüências de células dentro de cada janela de análise.

Avaliando as citocinas produzidas por estas subpopulações celulares -observamos que a frequência de monócitos/macrófagos produzindo IL-12 ou TNF $\alpha$  quando estimulados com STAg foi significativamente maior em animais heterozigotos do que em animais deficientes para a molécula IRAK4. Entre as subpopulações avaliadas, podemos observar a

maior produção de IL-12 pelo subtipos  $F4/80^{int}CD11b^{int}Gr1^{lo}$  e  $F4/80^{hi}CD11b^{lo}Gr1^{hi}$ , enquanto que a produção de  $TNF\alpha$  foi induzida somente no subtipo  $F4/80^{int}CD11b^{int}Gr1^{lo}$  em animais  $IRAK4^{+/-}$  comparados com animais controles não infectados (**Figura 13**).

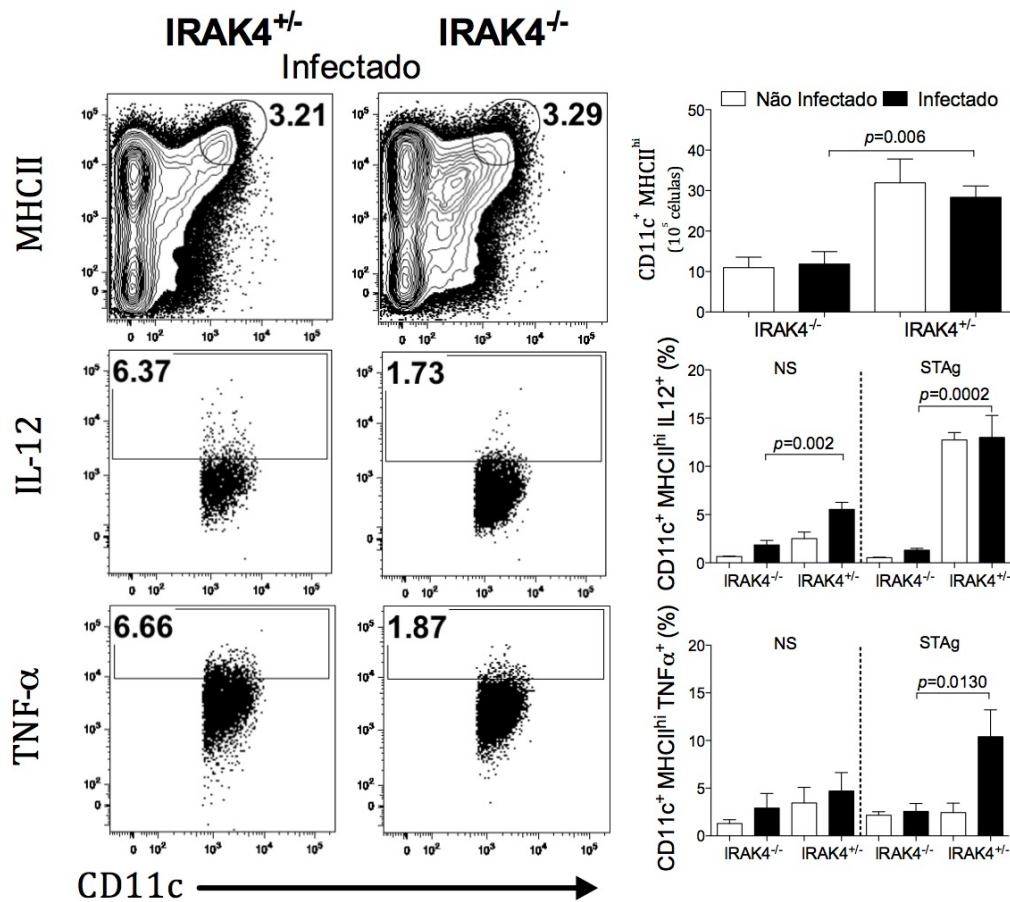


**Figura 13. Deficiência de IRAK4 leva a diminuição da produção de citocina inflamatória.** A produção de IL-12 e  $TNF\alpha$  por diferentes subpopulações de monócitos/macrófagos ( $CD11b^{hi}F4/80^{lo}Gr1^{hi}$  (gráficos a esquerda)  $CD11b^{lo}F4/80^{hi}Gr1^{int}$  (gráficos ao centro) e  $CD11b^{int}F4/80^{lo}Gr1^{lo}$  (gráficos a direita) de animais  $IRAK4^{+/-}$  e  $IRAK4^{-/-}$ , controles (barras brancas) ou infectados pelo *T. gondii* (barras pretas), foram analisados 7 dias após infecção com *T. gondii*, na ausência ou presença de STAg por 6 horas. As barras representam médias  $\pm$  SEM (n=5). Os dados são representativos de três experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

Analisando o papel de células dendríticas frente a infecção por *T. gondii*, verificamos que, apesar das proporções de célula dendríticas serem similares nos camundongos deficientes e heterozigotos, números absolutos mais altos de células  $CD11c^{+}MHCII^{hi}$  foram encontrados nos animais heterozigotos (**Figura 14**). Durante a infecção por *T. gondii* animais  $IRAK4^{-/-}$  apresentaram menor frequência de células dendríticas produtoras de IL-12

mesmo na ausência de estimulação com STAg. A produção de ambas as citocinas, IL-12 e TNF $\alpha$ , foi aumentada quando as células dendríticas foram submetidas a estimulação com STAg (**Figura 14**). Além disso, quando analisamos a expressão dos marcadores de ativação celular CD86 e CD40, animais IRAK4 deficientes apresentaram menor expressão de ambos os marcadores quando comparados com os animais heterozigotos (**Figura 15A**). Esses resultados indicam falha na ativação de células dendríticas de animais IRAK4 deficientes infectados com *T. gondii*.

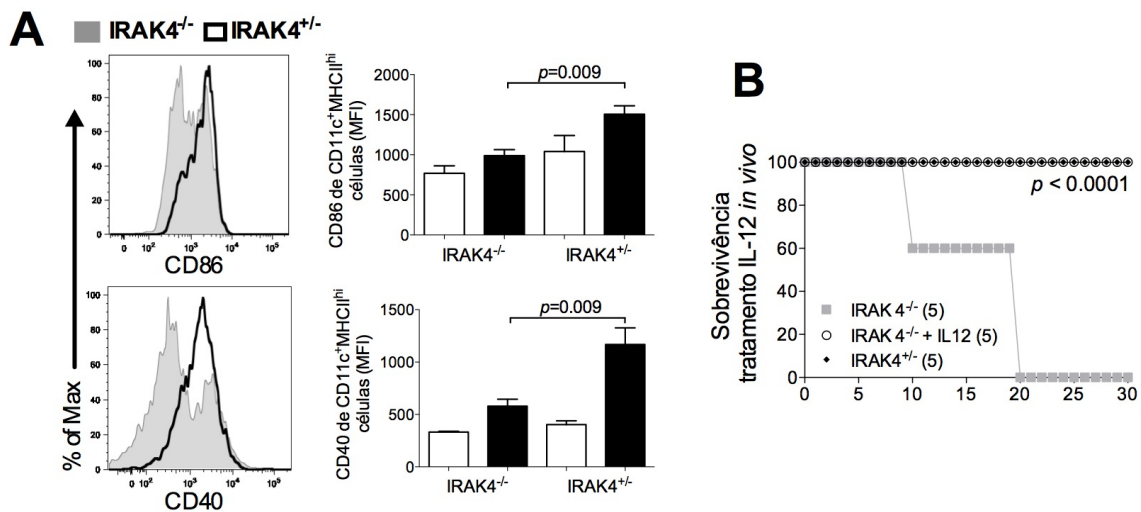




**Figura 14. Deficiência de IRAK4 altera a produção de citocinas inflamatórias desencadeada pela infecção pelo *T. gondii*.** Células dendríticas derivadas do baço foram analisadas 7 dias após infecção pelo *T. gondii*. À esquerda plots de citometria representam as frequências de células dendríticas (CD11<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup>) no baço de animais IRAK4<sup>+/-</sup> e IRAK4<sup>-/-</sup> (plots superiores) e as frequências da produção de IL-12 (plots centrais) e TNFα (plots inferiores) por células dendríticas de animais deficientes e heterozigotos infectados com o parasito. À direita gráficos de barra mostram o número absoluto de células dendríticas (gráfico superiores) e as frequências destas células produzindo IL-12 (gráfico central) e TNF-α (gráfico inferior). As barras representam médias ± SEM (n=5). Os dados são representativos de três experimentos independentes que apresentaram resultados similares. Números dentro de cada retângulo representam as frequências de células dentro de cada janela de análise.

Para avaliar a importância da falha na produção da citocina IL-12 pelas células dendríticas, animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados foram tratados diariamente com IL-12 recombinante iniciando o tratamento 1 dia após a infecção. Como esperado, animais IRAK4<sup>-/-</sup> tratados

apresentaram resistência a infecção semelhante aos animais heretozigotos (**Figura 15B**). Sob o efeito do tratamento com IL-12 recombinante, todos os animais analisados sobreviveram por 30 dias após a infecção oral com 20 cistos da cepa ME49, quando o experimento foi finalizado.

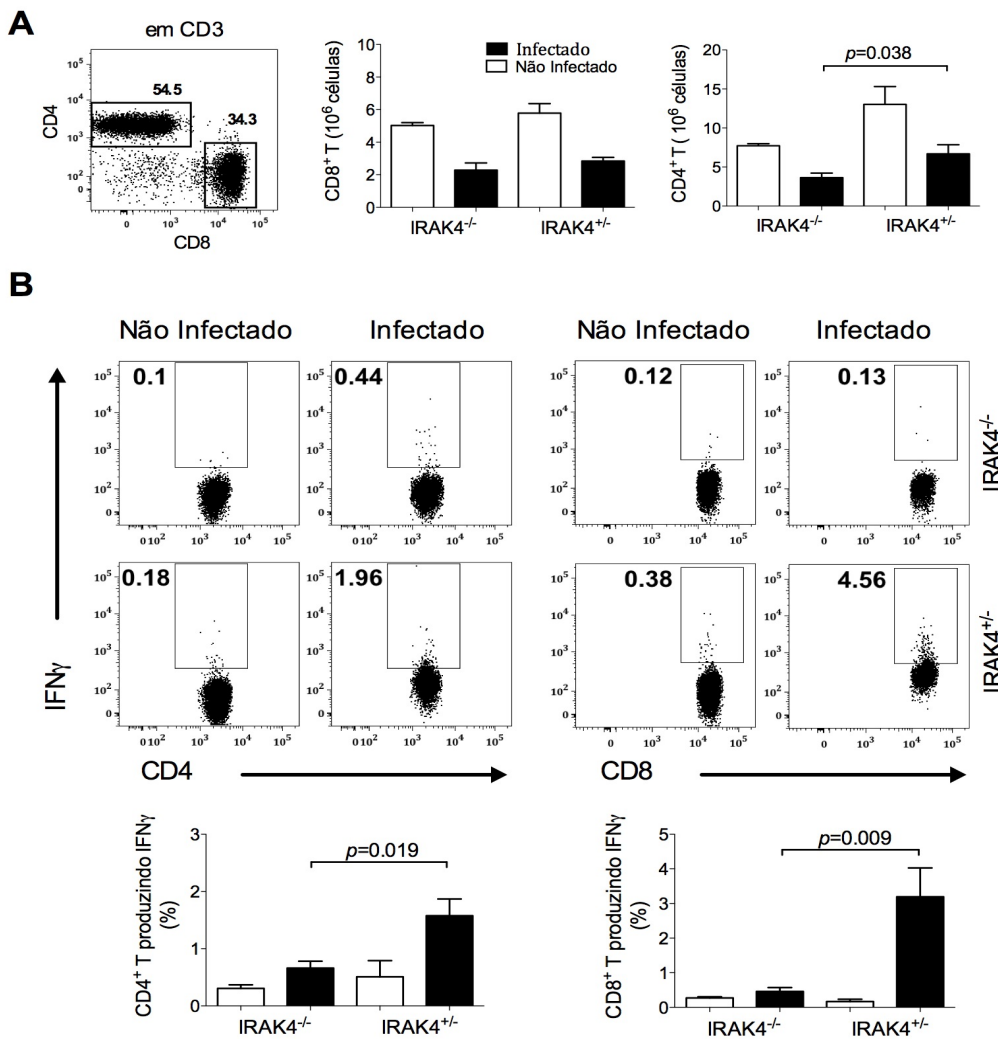


**Figura 15. A susceptibilidade dos animais IRAK4 deficientes é dependente da produção de IL-12.** Células dendríticas derivadas do baço foram analisadas 7 dias após a infecção com *T. gondii*. **(A)** Histogramas representativos e gráficos de barra apresentam a expressão de marcadores de ativação CD86 e CD40 (MFI) por células dendríticas de camundongos controles (barras brancas) e infectados pelo *T. gondii* (barras pretas). As barras representam medias  $\pm$  SEM (n=5). **(B)** Curva de sobrevivência de animais deficientes infectados pelo *T. gondii* e tratados com IL-12 recombinante ou PBS. O tratamento foi iniciado um dia após a infecção e teve duração de seis dias. Os dados são representativos de dois experimentos independentes que apresentaram resultados similares.

#### 4.5 Animais deficientes em IRAK4 apresentam resposta Th1 deficiente.

Tendo em vista a falha na ativação de células apresentadoras de antígenos em animais IRAK4 deficientes, nós avaliamos a resposta de célula T no modelo de infecção previamente proposto. Nossos resultados mostraram que o número total de células T CD4,

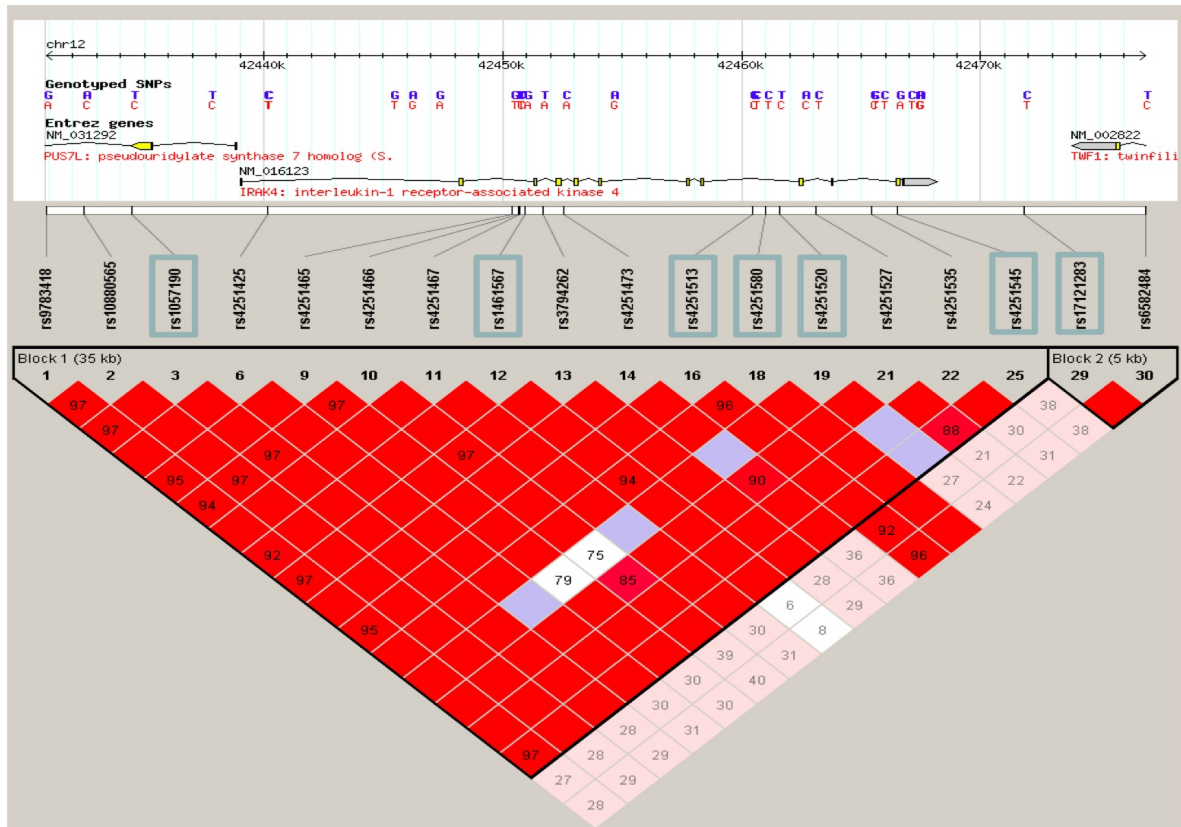
mas não o número total de células T CD8, foi significativamente menor em animais deficientes quando comparados com animais heterozigotos durante a infecção pelo *T. gondii*. (**Figura 16A**). Além disso, a frequência de células T produzindo IFN $\gamma$  foi menor tanto em células CD4 quanto CD8 de animais IRAK4<sup>-/-</sup> quando comparado com animais IRAK4<sup>+/-</sup> quando estimulados com STAg (**Figura 16B**). Assim, nossos resultados indicam que a falha da produção de IL-12 por monócitos/macrófagos e células dendríticas levam a uma consequente falha na produção de IFN $\gamma$  por células T, sendo o mecanismo primário responsável por aumentar a susceptibilidade dos animais IRAK4<sup>-/-</sup> durante a infecção por *T. gondii*.



**Figura 16. Deficiência de IRAK4 influencia na resposta de células T.** Linfócitos T retirados do baço foram analisados 7 dias após infecção pelo *T. gondii*. **(A)** À esquerda plot de citometria representa o modo como as células T ( $CD3^+CD4^+$  ou  $CD3^+CD8^+$ ) foram selecionadas para a análise de frequência e produção de citocinas por citometria. Logo, nos gráficos em barra podemos observar o número absoluto de células T  $CD8^+$  e  $CD4^+$  retiradas do baço de animais  $IRAK4^{+/-}$  e  $IRAK4^{-/-}$  após 7 dias de infecção. **(B)** Plots de citometria indicam a produção de  $IFN\gamma$  por células T de animais deficientes e heterozigotos infectados com o parasito. Os gráficos de barra indicam a frequência de células T  $CD4^+$  (à direita) e células T  $CD8^+$  (à esquerda) produzindo  $IFN\gamma$ . Barras pretas indicam animais infectados enquanto que barras brancas indicam animais controles. As barras representam médias  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). Os dados são representativos de três experimentos independentes que apresentaram resultados similares. Números dentro de cada retângulo representam as frequências de células dentro de cada janela de análise.

#### 4.6 SNPs de IRAK4 estão associados a susceptibilidade a doença ocular.

Em colaboração com a Dra. Rima McLeod da Universidade de Chicago, tivemos a oportunidade de avaliar indivíduos com toxoplasmose congênita e seus familiares pertencentes ao *National Collaborative Chicago-based Congenital Toxoplasmosis Study* (NCCCTS). Desde 1981, estes indivíduos e seus familiares tem participado de um estudo longitudinal. As crianças com toxoplasmose congênita foram reavaliadas com 1, 3,5, 5, 7,5, 10, 15 e 20 anos após o diagnóstico feito ao nascimento. Para o diagnóstico foram usados testes sorológicos seguidos de avaliações oftalmológicas (retinografia e tomografia computadorizada ocular - OCT), e neurológicas (tomografia computadorizada cerebral). Das 179 crianças infectadas, 124 (83%) apresentavam calcificações cerebrais com ou sem hidrocefalia e/ou lesões oculares ao nascimento. Foi extraído com sucesso, material genético de 149 crianças e seus pais (trios) para a genotipagem dos tag-SNPs mas somente 124 trios, aqueles com confirmação clínica da infecção, foram selecionados para o estudo de associação alélica. Dos 124 trios classificados como afetados (lesões ocular e/ou cérebro), 113 trios foram classificados como doença ocular (com ou sem doença cerebral) e 103 trios classificados como doença cerebral (com ou sem lesão ocular). Em humanos, a toxoplasmose congênita é uma das mais importantes manifestações da infecção *T. gondii*. Assim, nós avaliamos a associação desta manifestação com 7 diferentes tag-SNPs encontrados no gene *IRAK4*. Os sete SNPs avaliados foram rs4251545, rs1057190, rs4251580, rs4251513, rs1461567, rs4251520, rs17121283. Usando um  $r^2$  de 0.8 e um percentual maior que >90% na análise de desequilíbrio de ligação gênica apresentado pelo diagrama de Hardy-Weinberg nós fizemos a análise de associação.



**Figura 17. Análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene IRAK4.** O diagrama acima mostra a posição dos SNPs genotipados relativa a estrutura íntron/éxon do gene. Diagrama abaixo apresenta os gráficos de desequilíbrio de ligação (LD) gerados por Haploview usando os dados da genotipagem do gene IRAK4 na população selecionada para o estudo. Valores de LD ( $D' \times 100$ ) entre os SNPs indicam a intercessão de dois marcadores na matrix. Para SNPs associados com a susceptibilidade a toxoplasmose congênita, valores de LD entre os loci foram calculados utilizando Haploview. Quando existe alta confiança no valor de (LOD >2) tons de rosa e vermelho brilhantes foram usados. Se a confiança foi baixa (LOD < 2), tons de azul ( $D' = 1$ ) ou incolor ( $D' < 1$ ) foram utilizados. Os SNPs avaliados no estudo estão marcados com um retângulo.

A **figura 17** mostra a distribuição destes tag-SNPs ao longo do gene *IRAK4* e também o diagrama de Hardy-Weinberg onde podemos observar a correlação de herança entre os SNPs estudados. Entre os SNPs testados somente dois deles, rs1461567 e rs4251513, apresentaram associação significativa ( $p < 0.023$  and  $p < 0.045$ , respectivamente) com a toxoplasmose congênita.

## 5. DISCUSSÃO

O hospedeiro é protegido contra a invasão e instalação de patógenos por mecanismos da imunidade inata e adquirida. Enquanto a imunidade inata exibe uma resposta imediata ao patógeno pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), a imunidade adaptativa se utiliza de linfócitos efetores e de memória para reconhecer os agentes agressores e defender o hospedeiro através da produção de mediadores como citocinas e anticorpos. As primeiras evidências de que receptores da imunidade inata, especificamente os TLR, estavam envolvidos no reconhecimento de parasitos, foram documentadas em estudos com *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium berghei* (Adachi et al. 2001; Scanga et al. 2002).

Na imunidade inata, o reconhecimento dos PAMPs do *T. gondii* ocorre principalmente pelos TLR (Gazzinelli e Denkers 2006). Após o reconhecimento do antígeno do patógeno, as células do hospedeiro se tornam ativadas e produzem IL-12 e quimiocinas que atuam na ativação e recrutamento de células do sistema imune. Além da IL-12, o reconhecimento do parasito leva a produção de altos níveis de outra citocina pró-inflamatória, o IFN $\gamma$ , por células do sistema imune inato (Pifer e Yarovinsky 2011). A produção destas citocinas auxilia no desenvolvimento de uma resposta mediada por células T antígeno-específica extremamente eficiente (Denkers e Gazzinelli 1998). A ativação dos TLR, conta com a participação de várias proteínas, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Suzuki et al. 2002) mediadoras da imunidade inata e essenciais para o desenvolvimento da imunidade adquirida e resistência do hospedeiro a infecção.

Dentre as moléculas recrutadas durante a sinalização dos TLR, podemos citar as moléculas adaptadoras MyD88 e o adaptador contendo domínio TIR (TIRAP), as cinases IRAK1 e IRAK4, e ainda o fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ B (Akira 2006). Estudos

demonstraram que camundongos deficientes em MYD88, molécula essencial para a sinalização de quase todos os TLR e ainda para os receptores de IL-1 e IL-18, são altamente susceptíveis à toxoplasmose. A susceptibilidade destes animais, que apresentam maior parasitismo tecidual e mortalidade acelerada, decorre da falha na produção de IL-12 e IFN $\gamma$  (Chen et al. 2002; Scanga et al. 2002; Debierre-Grockiego et al. 2007; Sukhumavasi et al. 2008; Melo et al. 2010). Outros estudos ainda revelam que MyD88 é peça importante da imunidade inata em resposta a diferentes protozoários que incluem *Leishmania* spp (Hawn et al. 2002; De Trez et al. 2004) e *Trypanosoma cruzi* (Campos et al. 2004). Embora helmintos apresentem ligantes para os receptores Toll 3 e 4 (Aksoy et al. 2005; Goodridge et al. 2005) ainda não está claro, na maioria das infecções helmínticas, se estas interações refletem na resposta do hospedeiro contra a infecção ou em mecanismos envolvidos na evasão do patógeno ao sistema imune. Especificamente para o *Schistosoma mansoni*, foi demonstrado que o tegumento do esquistossômulo ativa células dendríticas a produzirem IL-12 e TNF $\alpha$ , além de aumentarem a produção das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86. Este estudo demonstra que este mecanismo é dependente de MyD88 e TLR4 (Duraes et al. 2009).

Assim, similar aos dados publicados utilizando animais MyD88<sup>-/-</sup>, nosso estudo com animais deficientes em IRAK4 apresentou um aumento significativo na quantidade de DNA do parasito no baço e no fígado, e no número de cistos parasitários no cérebro destes animais. A análise patológica do cérebro de animais deficientes apresentou necrose tecidual associada a cistos parasitários rotos e íntegros que provavelmente levaram ao desenvolvimento de sinais clínicos graves observados nestes mesmos camundongos durante a análise de morbidade e perda de peso. Apesar dos animais heterozigotos infectados apresentarem um aumento no infiltrado inflamatório perivascular no tecido



cerebral, nenhuma imunopatologia importante foi observada, contudo a presença destas células inibiram a migração ou permanência do parasito no tecido cerebral destes animais. Além disto, os animais IRAK4<sup>-/-</sup> morrem precocemente, estando esta mortalidade associada à falha na produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Este mesmo fenótipo foi observado em outro modelo de infecção com patógeno intracelular, a *Brucella abortus* (Oliveira et al. 2011).

Estudos do nosso grupo mostram que as âncoras de glicosilfosfatidilinositol presentes nas formas taquizoítas do parasito ativam os receptores Toll 2 e 4 (Debierre-Grockiego et al. 2007). Contudo, a deficiência dos receptores Toll 2 e 4 não demonstraram nenhum impacto importante na resistência de camundongos infectados com o parasito (Debierre-Grockiego et al. 2007). Por outro lado, o TLR11, receptor de profilina do parasito, presente somente em camundongos, mostrou-se envolvido na produção de IL-12 por células dendríticas, e a falta dele está associado ao aumento significativo da susceptibilidade do hospedeiro à infecção (Yarovinsky et al. 2005; Plattner et al. 2008). Outro estudo, mostra que TLR9, por sua vez, está envolvido na imunopatologia intestinal grave de animais infectados oralmente com *T. gondii*, uma vez que animais deficientes para este receptor não apresentam este fenótipo (Minns et al. 2006). Por outro lado, nosso grupo demonstrou que animais 3d apresentam extrema susceptibilidade a infecção com o parasito (Melo et al. 2010). Camundongos 3d carregam uma mutação no gene *UNC93B1*, que resulta em receptores do tipo Toll 3, 7, 9 e 11 não funcionais (Casrouge et al. 2006; Tabeta et al. 2006). Com a deficiência da sinalização via estes receptores, ocorre a diminuição da produção de IL-12, o que torna esses animais extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.

Após MyD88 ser recrutada pela ativação da maioria dos TLRs, cinases como IRAK4 são ativadas, dando continuidade a cascata de transdução de sinal destes receptores. Além de participar da ativação dos receptores do tipo Toll, IRAK4 também medeia a ativação dos receptores de IL-1 e IL-18. Contudo, a susceptibilidade a infecção por *T. gondii* não se mostrou alterada em animais deficientes para estes últimos (Hitziger et al. 2005).

Camundongos deficientes para a cinase IRAK4 são completamente resistentes ao choque séptico induzido por LPS e apresentam uma falha significativa na produção de citocinas inflamatórias (Suzuki et al. 2006). Recentemente, IRAK4 foi também descrito como essencial na produção de IFN do tipo I através da ativação dos receptores TLR7, 8 e 9 em resposta a ligantes virais, DNA e RNA (Honda et al. 2004). Estes resultados indicam que esta cinase, IRAK4, é um elemento chave na transdução de sinal mediada pelos receptores Toll apresentando um papel crucial na resposta imune inata.

Inúmeros estudos tem definido como principal objetivo decifrar qual tipo celular estaria envolvida na produção de IL-12, e muitos tem identificado que neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos e células dendríticas desempenham papel essencial na produção desta citocina (Bliss et al. 1999; Bliss et al. 2000; Scanga et al. 2002; Mordue e Sibley 2003). No nosso modelo de estudo, avaliamos não só a produção de IL-12 mas também outras citocinas pró-inflamatórias no soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais deficientes em IRAK4 e controles, ambos infectados. Dentre as citocinas avaliadas, observamos que a produção de IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  estavam significativamente diminuídas no soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos em animais IRAK4<sup>-/-</sup>, enquanto que as citocinas IL-6 e MCP-1 estavam diminuídas somente quando a avaliação foi feita no sobrenadante de cultura. Adicionalmente, no intuito de elucidar quais células e quais os fatores estariam envolvidos na falha na produção das

citocinas IL-12 e TNF $\alpha$  durante a infecção por *T. gondii*, nós avaliamos o compartimento mielóide de camundongos deficientes e controles infectados com o parasito. Dentre as células estudadas, as células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>hi</sup>) apresentaram número absoluto reduzido em animais IRAK4 deficientes infectados, além de apresentarem, proporcionalmente, produção significante menor das citocinas IL-12 e TNF $\alpha$  do que animais heterozigotos. Nos estudos com animais deficientes em MyD88, a falha na produção de IL-12 também foi associada às células dendríticas (Liu et al. 2006). A ativação de células dendríticas através de TLR induz não somente a secreção de citocinas como também aumenta a capacidade destas células em ativar células T antígeno-específicas, promovendo aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, que são importantes para o desenvolvimento da resposta imune Th1 durante a infecção pelo protozoário (Gazzinelli e Denkers 2006; Takeuchi e Akira 2010). Seguindo este raciocínio nós também avaliamos marcadores de ativação em DCs de animais heterozigotos e deficientes para IRAK4. Nossos resultados demonstraram que a cinase IRAK4 está envolvida também na expressão das moléculas coestimulatórias CD86 e CD40, já que camundongos deficientes para esta cinase apresentam expressão significativamente diminuída destas moléculas durante a infecção pelo *T. gondii*. Em acordo com nossos dados, outros estudos também citam a importância de moléculas como CD40 e TNF $\alpha$  como mecanismos de controle a infecção e resistência durante a fase crônica da toxoplasmose (Deckert-Schluter et al. 1998; Yap et al. 1998; Reichmann et al. 2000; Schluter et al. 2003). Nossos resultados *in vivo* contrastam com os resultados obtidos por Aosai e colaboradores (Aosai et al. 2006) que reportaram que a maturação de células dendríticas induzida pela proteína HSP70 do parasito mediada por TLR4 seria independente de MyD88. O defeito de células dendríticas em animais IRAK4<sup>-/-</sup> é de especial interesse para nosso estudo, uma vez que foi anteriormente descrito que a falha

na produção de IL-12 por estas células resulta em diminuição da produção de IFN $\gamma$  pelas células T, aumentando assim a susceptibilidade durante a infecção pelo parasito (Suzuki et al. 1988; Gazzinelli et al. 1994; Scanga et al. 2002; Liu et al. 2006; Wilson et al. 2010; Mashayekhi et al. 2011). Assim, no nosso modelo, confirmamos o papel essencial de IL-12 quando realizamos o tratamento de animais deficientes para IRAK4 com IL-12 recombinante. Estes animais apresentaram o reestabelecimento da resistência a infecção com o *T. gondii*.

Além da deficiência na função das células dendríticas, observamos que a frequência de monócitos/macrófagos está também diminuída no baço de animais deficientes em IRAK4 infectados pelo *T. gondii*, quando comparado com os controles heterozigotos. Observamos também que todas as subpopulações de monócitos/macrófagos, classificadas como F4/80<sup>hi</sup>CD11b<sup>lo</sup>Gr1<sup>lo</sup>, F4/80<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup>Gr1<sup>lo</sup>, F4/80<sup>lo</sup>CD11b<sup>hi</sup>Gr1<sup>hi</sup> (Goncalves et al. 2011), mostraram capacidade prejudicada quanto a produção de IL-12 na ausência de IRAK4. No entanto, apenas o subtipo F4/80<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup>Gr1<sup>lo</sup> de animais deficientes em IRAK4 mostrou-se significativamente diferente em relação a produção de TNF $\alpha$  quando comparado com o mesmo subtipo de animais controles. Uma explicação para a falha na resposta de monócitos/macrófagos deficientes em IRAK4 seria a ativação ineficiente dos TLR quando expostos a componentes do parasito *T. gondii*. Esta hipótese foi parcialmente abordada por Mun e colaboradores, 2005, que demonstram que monócitos/macrófagos deficientes em TLR4 falham em liberar radicais intermediários de oxigênio quando entram em contato com a HSP70 do parasito (Mun et al. 2005). A contribuição na produção de IL-12 por monócitos inflamatórios é de extrema importância já que estas células efetoras são essenciais para o controle da replicação do parasito *in vivo* (Dunay et al. 2010). A diminuição observada na frequência de monócitos/macrófagos em animais IRAK4<sup>-/-</sup> infectados com *T. gondii* pode ser

explicada com base na baixa produção de MCP-1 (CCL2) pelas células do baço destes animais, já que estudos demonstram que o recrutamento de monócitos inflamatórios é dependente da produção desta quimiocina, e que animais *CCR2<sup>-/-</sup>*, receptor ligante de MCP-1, apresentam alta susceptibilidade a infecção por vários microorganismos, como por exemplo o *T. gondii* e *Mycobacterium tuberculosis* (Robben et al. 2005; Benevides et al. 2008; Dunay et al. 2008; Antonelli et al. 2010; Dunay et al. 2010).

A importância da resposta imune adaptativa para a resistência ao *T. gondii* durante a infecção em humanos é demonstrada pelo aumento da susceptibilidade de pacientes com deficiência primária ou adquirida em células T. Camundongos deficientes em células B, T CD4 e T CD8 sobrevivem ao estágio agudo da infecção, mas apresentam aumento na susceptibilidade ao parasito na fase crônica (Denkers et al. 1997; Kang et al. 2000; Johnson e Sayles 2002). Avaliando células linfóides, B e T, nossos resultados demonstraram que a deficiência de IRAK4 prejudica o desenvolvimento da resposta adquirida contra a infecção pelo parasito, uma vez que não só o número absoluto de células T CD8 e células B está diminuído em animais deficientes, mas também a produção de IFN $\gamma$  por ambos os subtipos de células T está comprometida. Outros estudos, também em modelo experimental, demonstram que a deficiência de IRAK4 esta associada com a função alterada de linfócitos T e B (Picard et al. 2003; Isnardi et al. 2008), corroborando assim os dados apresentados no nosso estudo. Em um trabalho anteriormente publicado, foi demonstrado que MyD88 está envolvido somente durante a fase aguda da infecção pelo *T. gondii*, e sua deficiência não altera o desenvolvimento da resposta adquirida contra o parasito (Sukhumavasi et al. 2008). Uma hipótese gerada pelos nossos resultados é que a diminuição da população de células T antígeno-específicas poderia estar relacionada com a baixa expressão de moléculas coestimulatórias e também com a produção deficiente de IL-12 por células mielóides de

animais deficientes, influenciando também no comprometimento da ativação e diferenciação de linfócitos T CD4.

Em nosso estudo nós também observamos uma falha importante na expansão de linfócitos B. A área dos folículos e centros germinativos observada no baço de animais deficientes foi dramaticamente diminuída quando comparadas com animais heterozigotos. Além disso, associamos a diminuição significativa no número de células B ativadas que expressaram CD86 e CD40 com a dificuldade da ativação de folículos e centros germinativos apresentada por animais deficientes. A ativação via TLR está diretamente envolvida na ativação de células T (Hwang et al. 2009) e células dendríticas foliculares (Garin et al. 2010), que são células críticas na expansão e ativação de centros germinativos. A falha na ativação e expansão de linfócitos B, poderia também ser explicado pela falha na resposta de células T CD4 em animais deficientes em IRAK4.

Outro dado importante que mostra a importância de IRAK4 no controle de patógenos é que falhas na expressão da proteína IRAK4 em humanos levam a infecções piogênicas recorrentes (Medvedev et al. 2003; Cardenes et al. 2006; Melo et al. 2010). Mutações encontradas no gene *IRAK4* estão associadas a falhas no desenvolvimento de mecanismos das respostas imune inata e adquirida contra microrganismos de grande importância clínica que possuem ligantes para TLR. (Picard et al. 2003; Davidson et al. 2006; Isnardi et al. 2008). Estudos recentes associam genes na imunidade inata com achados clínicos como por exemplo o desenvolvimento da coriorretinite congênita ou adquirida em indivíduos com toxoplasmose. Assim, nós investigamos polimorfismos de base única (SNPs) do gene *IRAK4* que estariam associados à achados clínicos durante a infecção congênita em humanos, uma vez que as patologias associadas a toxoplasmose congênita podem ser graves de acordo com o trimestre da gestação (Wallon et al. 1999). Após a avaliação

oftalmológica e cerebral e diagnóstico sorológico de todos os indivíduos incluídos no nosso estudo, podemos afirmar que as patologias encontradas estavam associadas a toxoplasmose. Após seleção dos SNPs e a genotipagem dos mesmos, de fato, encontramos evidências significativas da associação de dois SNPs avaliados, distribuídos ao longo do gene *IRAK4*, com alterações cerebrais e oculares associadas a toxoplasmose congênita. Assim como nosso grupo, outros pesquisadores também encontraram associações da doença ocular congênita e adquirida com o TLR9 e NOD2, respectivamente (Peixoto-Rangel et al. 2009; Dutra et al. 2012). Estes grupos corroboram a hipótese de que os receptores Toll e as moléculas associadas na sua via de sinalização, como a cinase IRAK4, tem um papel fundamental em mediar a resistência a infecção pelo *T. gondii* em humanos.

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que a molécula IRAK4 é essencial para o hospedeiro na resistência à infecção por *Toxoplasma gondii*. Nossos experimentos mostraram que a ausência desta cinase acarreta sinais clínicos graves e mortalidade acelerada. Essa mortalidade se mostra associada com a falha no controle do parasitismo tecidual e este parâmetro intimamente relacionado a alterações no desenvolvimento da resposta imune desenvolvida contra o parasito. Nossos resultados revelam que a função de IRAK4 não está somente relacionada a fase precoce da resposta imune, como anteriormente descrito para a deficiência de MyD88, mas também necessária para uma integração efetiva entre respostas imunes inata e adquirida.

Concluimos que no modelo experimental a molécula IRAK4 está envolvida no recrutamento e ativação de células de origem mielóide (células dendríticas e monócitos/macrófagos) no baço, além de estar relacionada com produção de IL-12 e TNF $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias essenciais durante a infecção pelo *T. gondii*. Observamos também que alterações no compartimento linfóide como: frequência celular, expressão de marcadores de ativação, falha na proliferação e produção de citocinas; impactam na resistência do hospedeiro à toxoplasmose, uma vez que mecanismos de combate a replicação do parasito estejam relacionados intimamente com estes mecanismos.

Ainda neste estudo, concluimos que a susceptibilidade de humanos à toxoplasmose congênita, que desenvolvem doença ocular e/ou cerebral, está relacionada a polimorfismos encontrados no gene *IRAK4*.



## REFERÊNCIAS

- Adachi, K., H. Tsutsui, S. Kashiwamura, E. Seki, H. Nakano, O. Takeuchi, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, H. Okamura, S. Akira and K. Nakanishi (2001). "Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism." J Immunol **167**(10): 5928-5934.
- Akira, S. (2006). "TLR signaling." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 1-16.
- Aksoy, E., C. S. Zouain, F. Vanhoutte, J. Fontaine, N. Pavelka, N. Thieblemont, F. Willems, P. Ricciardi-Castagnoli, M. Goldman, M. Capron, B. Ryffel and F. Trottein (2005). "Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells." J Biol Chem **280**(1): 277-283.
- Albuquerque, M. C., A. L. Aleixo, E. I. Benchimol, A. C. Leandro, L. B. das Neves, R. T. Vicente, G. Bonecini-Almeida Mda and M. R. Amendoeira (2009). "The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(3): 451-455.
- Aliberti, J. (2005). "Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*." Nat Rev Immunol **5**(2): 162-170.
- Aliberti, J., J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, C. Reis e Sousa, A. Fairlamb, J. M. Ribeiro and A. Sher (2003). "Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells." Nat Immunol **4**(5): 485-490.
- Antonelli, L. R., A. Gigliotti Rothfuchs, R. Goncalves, E. Roffe, A. W. Cheever, A. Bafica, A. M. Salazar, C. G. Feng and A. Sher (2010). "Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population." J Clin Invest **120**(5): 1674-1682.
- Aosai, F., M. S. Rodriguez Pena, H. S. Mun, H. Fang, T. Mitsunaga, K. Norose, H. K. Kang, Y. S. Bae and A. Yano (2006). "Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4." Cell Stress Chaperones **11**(1): 13-22.
- Ashburn, D., A. W. Joss, T. H. Pennington and D. O. Ho-Yen (1998). "Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy?" J Clin Pathol **51**(4): 312-315.
- Bahia-Oliveira, L. M., J. L. Jones, J. Azevedo-Silva, C. C. Alves, F. Orefice and D. G. Addiss (2003). "Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil." Emerg Infect Dis **9**(1): 55-62.
- Bale, J. F., Jr. (2002). "Congenital infections." Neurol Clin **20**(4): 1039-1060, vii.
- Barragan, A. and L. D. Sibley (2002). "Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence." J Exp Med **195**(12): 1625-1633.

Benevides, L., C. M. Milanezi, L. M. Yamauchi, C. F. Benjamim, J. S. Silva and N. M. Silva (2008). "CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system." Am J Pathol **173**(3): 741-751.

Berger, F., V. Goulet, Y. Le Strat and J. C. Desenclos (2009). "Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003." Rev Epidemiol Sante Publique **57**(4): 241-248.

Bliss, S. K., B. A. Butcher and E. Y. Denkers (2000). "Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection." J Immunol **165**(8): 4515-4521.

Bliss, S. K., A. J. Marshall, Y. Zhang and E. Y. Denkers (1999). "Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens." J Immunol **162**(12): 7369-7375.

Bowie, W. R., A. S. King, D. H. Werker, J. L. Isaac-Renton, A. Bell, S. B. Eng and S. A. Marion (1997). "Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team." Lancet **350**(9072): 173-177.

Burnett, A. J., S. G. Shortt, J. Isaac-Renton, A. King, D. Werker and W. R. Bowie (1998). "Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak." Ophthalmology **105**(6): 1032-1037.

Campos, M. A., M. Closel, E. P. Valente, J. E. Cardoso, S. Akira, J. I. Alvarez-Leite, C. Ropert and R. T. Gazzinelli (2004). "Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88." J Immunol **172**(3): 1711-1718.

Cao, Z., W. J. Henzel and X. Gao (1996). "IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor." Science **271**(5252): 1128-1131.

Cardenes, M., H. von Bernuth, A. Garcia-Saavedra, E. Santiago, A. Puel, C. L. Ku, J. F. Emile, C. Picard, J. L. Casanova, E. Colino, A. Bordes, A. Garfia and C. Rodriguez-Gallego (2006). "Autosomal recessive interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency in fourth-degree relatives." J Pediatr **148**(4): 549-551.

Casrouge, A., S. Y. Zhang, C. Eidenschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A. Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, N. Nicolas, L. Lorenzo, S. Plancoulaine, B. Senechal, F. Geissmann, K. Tabeta, K. Hoebe, X. Du, R. L. Miller, B. Heron, C. Mignot, T. B. de Villemeur, P. Lebon, O. Dulac, F. Rozenberg, B. Beutler, M. Tardieu, L. Abel and J. L. Casanova (2006). "Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency." Science **314**(5797): 308-312.

Chen, M., F. Aosai, K. Norose, H. S. Mun, O. Takeuchi, S. Akira and A. Yano (2002). "Involvement of MyD88 in host defense and the down-regulation of anti-heat shock protein 70 autoantibody formation by MyD88 in *Toxoplasma gondii*-infected mice." J Parasitol **88**(5): 1017-1019.

Coelho, R. A., M. Kobayashi and L. B. Carvalho, Jr. (2003). "Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **45**(4): 229-231.

Contreras, M., H. Schenone, P. Salinas, L. Sandoval, A. Rojas, F. Villarroel and F. Solis (1996). "Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **38**(6): 431-435.

Coutinho, S. G., R. Lobo and G. Dutra (1982). "Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil." J Parasitol **68**(5): 866-868.

Davidson, D. J., A. J. Currie, D. M. Bowdish, K. L. Brown, C. M. Rosenberger, R. C. Ma, J. Bylund, P. A. Campsall, A. Puel, C. Picard, J. L. Casanova, S. E. Turvey, R. E. Hancock, R. S. Devon and D. P. Speert (2006). "IRAK-4 mutation (Q293X): rapid detection and characterization of defective post-transcriptional TLR/IL-1R responses in human myeloid and non-myeloid cells." J Immunol **177**(11): 8202-8211.

de Oliveira, T. C., D. A. Silva, C. Rostkowska, S. R. Bela, E. A. Ferro, P. M. Magalhaes and J. R. Mineo (2009). "*Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo." Exp Parasitol **122**(3): 233-241.

De Trez, C., M. Brait, O. Leo, T. Aebischer, F. A. Torrentera, Y. Carlier and E. Muraille (2004). "Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species." Infect Immun **72**(2): 824-832.

Debierre-Grockiego, F., M. A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, M. G. Resende, D. S. Mansur, R. Weingart, R. R. Schmidt, D. T. Golenbock, R. T. Gazzinelli and R. T. Schwarz (2007). "Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*." J Immunol **179**(2): 1129-1137.

Deckert-Schluter, M., H. Bluethmann, A. Rang, H. Hof and D. Schluter (1998). "Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis." J Immunol **160**(7): 3427-3436.

Denkers, E. Y. and R. T. Gazzinelli (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-588.

Denkers, E. Y., G. Yap, T. Scharton-Kersten, H. Charest, B. A. Butcher, P. Caspar, S. Heiny and A. Sher (1997). "Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*." J Immunol **159**(4): 1903-1908.

Dubey, J. P. (1974). "Effect of freezing on the infectivity of toxoplasma cysts to cats." J Am Vet Med Assoc **165**(6): 534-536.

Dubey, J. P. (2009). "History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **39**(8): 877-882.

Dubey, J. P., D. S. Lindsay and C. A. Speer (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-299.

Dunay, I. R., R. A. Damatta, B. Fux, R. Presti, S. Greco, M. Colonna and L. D. Sibley (2008). "Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*." Immunity **29**(2): 306-317.

Dunay, I. R., A. Fuchs and L. D. Sibley (2010). "Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice." Infect Immun **78**(4): 1564-1570.

Dunn, D., M. Wallon, F. Peyron, E. Petersen, C. Peckham and R. Gilbert (1999). "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling." Lancet **353**(9167): 1829-1833.

Duraes, F. V., N. B. Carvalho, T. T. Melo, S. C. Oliveira and C. T. Fonseca (2009). "IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent." Immunol Lett **125**(1): 72-77.

Dutra, M. S., S. R. Béla, A. L. Peixoto-Rangel, A. K. G. Cruz, A. Gazzinelli, H. F. Qutes, L. M. Bahia-Oliveira, W. F. Campos, A. C. Higino-Rocha, E. N. Miller, M. Fakiola, J. M. Blackwell, L. R. Antonelli and R. T. Gazzinelli (2012). "Association of a NOD2 gene polymorphism and Th17 lymphocytes with presumed ocular toxoplasmosis." J Infect Dis In press.

Edelhofer, R. and H. Prossinger (2010). "Infection with *Toxoplasma gondii* during pregnancy: seroepidemiological studies in Austria." Zoonoses Public Health **57**(1): 18-26.

Ferguson, D. (1988). "An immune-electron microscopic study of tissue cyst of *Toxoplasma gondii* in mouse brain. ." Inst Phys Conf Ser **3**: 207-208.

Fernandes, G. C., R. S. Azevedo, M. Amaku, A. L. Yu and E. Massad (2009). "Seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in a metropolitan region of Brazil." Epidemiol Infect **137**(12): 1809-1815.

Ferreira Ade, M., R. W. Vitor, R. T. Gazzinelli and M. N. Melo (2006). "Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP." Infect Genet Evol **6**(1): 22-31.

Ferreira, M. U., R. M. Hiramoto, D. P. Aureliano, M. da Silva-Nunes, N. S. da Silva, R. S. Malafrente and P. T. Muniz (2009). "A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors." Am J Trop Med Hyg **81**(1): 171-176.

Flannery, S. and A. G. Bowie (2010). "The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling." Biochem Pharmacol **80**(12): 1981-1991.

Frenkel, J. K. and B. B. Parker (1996). "An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of xenosmophilia." Ann N Y Acad Sci **791**: 402-407.

- Frenkel, J. K., A. Ruiz and M. Chinchilla (1975). "Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica." Am J Trop Med Hyg **24**(3): 439-443.
- Garin, A., M. Meyer-Hermann, M. Contie, M. T. Figge, V. Buatois, M. Gunzer, K. M. Toellner, G. Elson and M. H. Kosco-Vilbois (2010). "Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation." Immunity **33**(1): 84-95.
- Gavinet, M. F., F. Robert, G. Firtion, E. Delouvrier, C. Hennequin, J. R. Maurin, C. Tourte-Schaefer and J. Dupouy-Camet (1997). "Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy." J Clin Microbiol **35**(5): 1276-1277.
- Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever and A. Sher (1992). "Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*." J Immunol **149**(1): 175-180.
- Gazzinelli, R. T. and E. Y. Denkers (2006). "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism." Nat Rev Immunol **6**(12): 895-906.
- Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, S. Hieny, G. M. Shearer and A. Sher (1991). "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine." J Immunol **146**(1): 286-292.
- Gazzinelli, R. T., S. Hayashi, M. Wysocka, L. Carrera, R. Kuhn, W. Muller, F. Roberge, G. Trinchieri and A. Sher (1994). "Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 9S.
- Gazzinelli, R. T., A. Sher, A. Cheever, S. Gerstberger, M. A. Martin and P. Dickie (1996). "Infection of human immunodeficiency virus 1 transgenic mice with *Toxoplasma gondii* stimulates proviral transcription in macrophages in vivo." J Exp Med **183**(4): 1645-1655.
- Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri and A. Sher (1994). "Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*." J Immunol **153**(6): 2533-2543.
- Goncalves, R., X. Zhang, H. Cohen, A. Debrabant and D. M. Mosser (2011). "Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection." J Exp Med **208**(6): 1253-1265.
- Goodridge, H. S., F. A. Marshall, K. J. Else, K. M. Houston, C. Egan, L. Al-Riyami, F. Y. Liew, W. Harnett and M. M. Harnett (2005). "Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62." J Immunol **174**(1): 284-293.
- Hawn, T. R., A. Ozinsky, D. M. Underhill, F. S. Buckner, S. Akira and A. Aderem (2002). "*Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway." Microbes Infect **4**(8): 763-771.

Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-1103.

Hegab, S. M. and S. A. Al-Mutawa (2003). "Immunopathogenesis of toxoplasmosis." Clin Exp Med **3**(2): 84-105.

Hill, D. and J. P. Dubey (2002). "Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention." Clin Microbiol Infect **8**(10): 634-640.

Hitziger, N., I. Dellacasa, B. Albiger and A. Barragan (2005). "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 **7**(6): 837-848.

Hofhuis, A., W. van Pelt, Y. T. van Duynhoven, C. D. Nijhuis, L. Mollema, F. R. van der Klis, A. H. Havelaar and L. M. Kortbeek (2011). "Decreased prevalence and age-specific risk factors for Toxoplasma gondii IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007." Epidemiol Infect **139**(4): 530-538.

Hohlfeld, P., F. Daffos, J. M. Costa, P. Thulliez, F. Forestier and M. Vidaud (1994). "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid." N Engl J Med **331**(11): 695-699.

Holland, G. N. (1999). "Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis." Am J Ophthalmol **128**(4): 502-505.

Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh and T. Taniguchi (2004). "Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15416-15421.

Hwang, I. Y., C. Park, K. Harrison and J. H. Kehrl (2009). "TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones." J Exp Med **206**(12): 2641-2657.

Isnardi, I., Y. S. Ng, I. Srdanovic, R. Motaghedi, S. Rudchenko, H. von Bernuth, S. Y. Zhang, A. Puel, E. Jouanguy, C. Picard, B. Z. Garty, Y. Camcioglu, R. Doffinger, D. Kumararatne, G. Davies, J. I. Gallin, S. Haraguchi, N. K. Day, J. L. Casanova and E. Meffre (2008). "IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans." Immunity **29**(5): 746-757.

Jadin, J., Creemers, J (1968). "Ultrastructure et biologie des toxoplasmes. III Observations de toxoplasmes intraerythrocytaires chez un mammifere. ." Acta Trop **25**: 267-270.

Jamieson, S. E., A. L. Peixoto-Rangel, A. C. Hargrave, L. A. Roubaix, E. J. Mui, N. R. Boulter, E. N. Miller, S. J. Fuller, J. S. Wiley, L. Castellucci, K. Boyer, R. G. Peixe, M. J. Kirisits, S. Elias Lde, J. J. Coyne, R. Correa-Oliveira, M. Sautter, N. C. Smith, M. P. Lees, C. N. Swisher, P. Heydemann, A. G. Noble, D. Patel, D. Bardo, D. Burrowes, D. McLone, N. Roizen, S. Withers, L. M. Bahia-Oliveira, R. McLeod and J. M. Blackwell (2010). "Evidence for associations

between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis." Genes Immun **11**(5): 374-383.

Johnson, L. L. and P. C. Sayles (2002). "Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice." Infect Immun **70**(1): 185-191.

Jones, J. L., D. Kruszon-Moran, M. Wilson, G. McQuillan, T. Navin and J. B. McAuley (2001). "Toxoplasma gondii infection in the United States: seroprevalence and risk factors." Am J Epidemiol **154**(4): 357-365.

Kang, H., J. S. Remington and Y. Suzuki (2000). "Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase." J Immunol **164**(5): 2629-2634.

Kawai, T. and S. Akira (2005). "Pathogen recognition with Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **17**(4): 338-344.

Kijlstra, A. and E. Jongert (2009). "Toxoplasma-safe meat: close to reality?" Trends Parasitol **25**(1): 18-22.

Kim, K. and L. M. Weiss (2004). "Toxoplasma gondii: the model apicomplexan." Int J Parasitol **34**(3): 423-432.

Kravetz, J. D. and D. G. Federman (2005). "Toxoplasmosis in pregnancy." Am J Med **118**(3): 212-216.

Lainson, R. (1958). "Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. ." Trans R Soc Trop Med Hyg **52**: 369-407.

Lees, M. P., S. J. Fuller, R. McLeod, N. R. Boulter, C. M. Miller, A. M. Zakrzewski, E. J. Mui, W. H. Witola, J. J. Coyne, A. C. Hargrave, S. E. Jamieson, J. M. Blackwell, J. S. Wiley and N. C. Smith (2010). "P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, by human and murine macrophages." J Immunol **184**(12): 7040-7046.

Li, S., A. Strelow, E. J. Fontana and H. Wesche (2002). "IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5567-5572.

Liu, C. H., Y. T. Fan, A. Dias, L. Esper, R. A. Corn, A. Bafica, F. S. Machado and J. Aliberti (2006). "Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice." J Immunol **177**(1): 31-35.

Luft, B. J., R. Hafner, A. H. Korzun, C. Leport, D. Antoniskis, E. M. Bosler, D. D. Bourland, 3rd, R. Uttamchandani, J. Fuhrer, J. Jacobson and et al. (1993). "Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team." N Engl J Med **329**(14): 995-1000.

Lyons, R. E., R. McLeod and C. W. Roberts (2002). "Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion." Trends Parasitol **18**(5): 198-201.

Mashayekhi, M., M. M. Sandau, I. R. Dunay, E. M. Frickel, A. Khan, R. S. Goldszmid, A. Sher, H. L. Ploegh, T. L. Murphy, L. D. Sibley and K. M. Murphy (2011). "CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites." Immunity **35**(2): 249-259.

Medvedev, A. E., A. Lentschat, D. B. Kuhns, J. C. Blanco, C. Salkowski, S. Zhang, M. Ardit, J. I. Gallin and S. N. Vogel (2003). "Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections." J Exp Med **198**(4): 521-531.

Melo, M. B., P. Kasperkovitz, A. Cerny, S. Konen-Waisman, E. A. Kurt-Jones, E. Lien, B. Beutler, J. C. Howard, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2010). "UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*." PLoS Pathog **6**(8): e1001071.

Miller, N. F., JK; Dubey, JP (1972). "Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. ." J Parasitol **58**: 928–937.

Minkoff, H., J. S. Remington, S. Holman, R. Ramirez, S. Goodwin and S. Landesman (1997). "Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women." Am J Obstet Gynecol **176**(3): 555-559.

Minns, L. A., L. C. Menard, D. M. Foureau, S. Darche, C. Ronet, D. W. Mielcarz, D. Buzoni-Gatel and L. H. Kasper (2006). "TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **176**(12): 7589-7597.

Mombro, M., C. Perathoner, A. Leone, V. Buttafuoco, C. Zotti, M. A. Lievre and C. Fabris (2003). "Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection." Eur J Pediatr **162**(10): 703-706.

Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-1976.

Montoya, J. G. and J. S. Remington (1996). "Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis." Clin Infect Dis **23**(2): 277-282.

Mordue, D. G. and L. D. Sibley (2003). "A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis." J Leukoc Biol **74**(6): 1015-1025.

Mun, H. S., F. Aosai, K. Norose, L. X. Piao, H. Fang, S. Akira and A. Yano (2005). "Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70." Infect Immun **73**(8): 4634-4642.

Muzzio, I. A., A. C. Talk and L. D. Matzel (1997). "Incremental redistribution of protein kinase C underlies the acquisition curve during in vitro associative conditioning in *Hermissenda*." Behav Neurosci **111**(4): 739-753.

Nicolle, C. M., L. (1908). "Sur une infection à corps de *Leishman* (ou organismes voisins) du *gondi*." C. R. Hebd Séances Academy Sciences **v. 147**: p. 763-766.



Nicolle, C. M., L. (1909 ). "Sur un protozoaire nouveau de Gondi. ." Toxoplasma Arch Inst Pasteur **2**: 97–103.

O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-364.

Oliveira, F. S., N. B. Carvalho, A. P. Brandao, M. T. Gomes, L. A. de Almeida and S. C. Oliveira (2011). "Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of *Brucella abortus* infection." Infect Immun **79**(11): 4688-4695.

Pappas, G., N. Roussos and M. E. Falagas (2009). "Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis." Int J Parasitol **39**(12): 1385-1394.

Peixoto-Rangel, A. L., E. N. Miller, L. Castellucci, S. E. Jamieson, R. G. Peixe, S. Elias Lde, R. Correa-Oliveira, L. M. Bahia-Oliveira and J. M. Blackwell (2009). "Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9)." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(8): 1187-1190.

Picard, C., A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al-Ghoniaim, H. Al-Rayes, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, I. Z. Al-Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidallo, A. Ozinsky and J. L. Casanova (2003). "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." Science **299**(5615): 2076-2079.

Pifer, R., A. Benson, C. R. Sturge and F. Yarovinsky (2011). "UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **286**(5): 3307-3314.

Pifer, R. and F. Yarovinsky (2011). "Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans." Trends Parasitol **27**(9): 388-393.

Plattner, F., F. Yarovinsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher and D. Soldati-Favre (2008). "Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response." Cell Host Microbe **3**(2): 77-87.

Porter, S. B. and M. A. Sande (1992). "Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome." N Engl J Med **327**(23): 1643-1648.

Prigione, I., S. Chiesa, P. Taverna, R. Ceccarelli, R. Frulio, F. Morandi, P. Bocca, M. F. Cesbron-Delauw and V. Pistoia (2006). "T cell mediated immune responses to *Toxoplasma gondii* in pregnant women with primary toxoplasmosis." Microbes Infect **8**(2): 552-560.

Prigione, I., P. Facchetti, L. Lecordier, D. Deslee, S. Chiesa, M. F. Cesbron-Delauw and V. Pistoia (2000). "T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development." J Immunol **164**(7): 3741-3748.

Reichmann, G., W. Walker, E. N. Villegas, L. Craig, G. Cai, J. Alexander and C. A. Hunter (2000). "The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis." Infect Immun **68**(3): 1312-1318.

Remington, J. S., P. Thulliez and J. G. Montoya (2004). "Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis." J Clin Microbiol **42**(3): 941-945.

Ribeiro, A. C., M. S. Mutis and O. Fernandes (2008). "Association of the presence of residual anti-Toxoplasma gondii IgM in pregnant women and their respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(6): 591-594.

Robben, P. M., M. LaRegina, W. A. Kuziel and L. D. Sibley (2005). "Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis." J Exp Med **201**(11): 1761-1769.

Rogers, N. M., C. A. Peh, R. Faull, M. Pannell, J. Cooper and G. R. Russ (2008). "Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor." Transpl Infect Dis **10**(1): 71-74.

Rosati, O. and M. U. Martin (2002). "Identification and characterization of murine IRAK-M." Biochem Biophys Res Commun **293**(5): 1472-1477.

Saavedra, R., F. de Meuter, J. L. Decourt and P. Herion (1991). "Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of Toxoplasma gondii cloned and expressed in Escherichia coli." J Immunol **147**(6): 1975-1982.

Sadak, A. T., Z; Fortier, B; Dubremetz, JF (1988). "Characterization of a family of rhopty proteins of Toxoplasma gondii. ." Mol Biochem Parasitol **3**: 207-208.

Saeij, J. P., J. P. Boyle and J. C. Boothroyd (2005). "Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host." Trends Parasitol **21**(10): 476-481.

Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov and A. Sher (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.

Schares, G., N. Pantchev, D. Barutzki, A. O. Heydorn, C. Bauer and F. J. Conraths (2005). "Oocysts of Neospora caninum, Hammondia heydorni, Toxoplasma gondii and Hammondia hammondi in faeces collected from dogs in Germany." Int J Parasitol **35**(14): 1525-1537.

Schluter, D., L. Y. Kwok, S. Lutjen, S. Soltek, S. Hoffmann, H. Korner and M. Deckert (2003). "Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of Toxoplasma gondii in the central nervous system." J Immunol **170**(12): 6172-6182.

Scott, P., E. Pearce, P. Natovitz and A. Sher (1987). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract." J Immunol **139**(9): 3118-3125.

Sibley, L. D., A. Khan, J. W. Ajioka and B. M. Rosenthal (2009). "Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1530): 2749-2761.

Speer, C. A., J. P. Dubey, M. M. McAllister and J. A. Blixt (1999). "Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **29**(10): 1509-1519.

Splendore, A. (1908). "Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. ." Revista da Sociedade de Ciências de São Paulo v. **3**: 109-112, 1908.

Stone, W. B. and R. D. Manwell (1969). "Toxoplasmosis in cold-blooded hosts." J Protozool **16**(1): 99-102.

Su, C., D. Evans, R. H. Cole, J. C. Kissinger, J. W. Ajioka and L. D. Sibley (2003). "Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission." Science **299**(5605): 414-416.

Sukhumavasi, W., C. E. Egan, A. L. Warren, G. A. Taylor, B. A. Fox, D. J. Bzik and E. Y. Denkers (2008). "TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite." J Immunol **181**(5): 3464-3473.

Sukthana, Y. (2006). "Toxoplasmosis: beyond animals to humans." Trends Parasitol **22**(3): 137-142.

Sumyuen, M. H., Y. J. Garin and F. Derouin (1995). "Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain." J Parasitol **81**(2): 327-329.

Suzuki, N., S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak and W. C. Yeh (2002). "Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4." Nature **416**(6882): 750-756.

Suzuki, N., S. Suzuki, D. G. Millar, M. Unno, H. Hara, T. Calzascia, S. Yamasaki, T. Yokosuka, N. J. Chen, A. R. Elford, J. Suzuki, A. Takeuchi, C. Mirtsos, D. Bouchard, P. S. Ohashi, W. C. Yeh and T. Saito (2006). "A critical role for the innate immune signaling molecule IRAK-4 in T cell activation." Science **311**(5769): 1927-1932.

Suzuki, N., S. Suzuki and W. C. Yeh (2002). "IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity." Trends Immunol **23**(10): 503-506.

Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." Science **240**(4851): 516-518.

Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L. E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang and E. Gufwoli (2000). "IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in

both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*." J Immunol **164**(10): 5375-5382.

Suzuki, Y., X. Wang, B. S. Jortner, L. Payne, Y. Ni, S. A. Michie, B. Xu, T. Kudo and S. Perkins (2010). "Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells." Am J Pathol **176**(4): 1607-1613.

Swisher, C. N., K. Boyer and R. McLeod (1994). "Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group." Semin Pediatr Neurol **1**(1): 4-25.

Switaj, K., A. Master, M. Skrzypczak and P. Zaborowski (2005). "Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections." Clin Microbiol Infect **11**(3): 170-176.

Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein and B. Beutler (2006). "The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9." Nat Immunol **7**(2): 156-164.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-451.

Tenter, A. M., A. R. Heckeroth and L. M. Weiss (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-1258.

Trees, A. J. and D. J. Williams (2005). "Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*." Trends Parasitol **21**(12): 558-561.

Vaz, R. S., V. Thomaz-Soccol, E. Sumikawa and A. T. Guimaraes (2010). "Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil." Parasitol Res **106**(3): 661-665.

Villegas, E. N., U. Wille, L. Craig, P. S. Linsley, D. M. Rennick, R. Peach and C. A. Hunter (2000). "Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **68**(5): 2837-2844.

Vogel, N., M. Kirisits, E. Michael, H. Bach, M. Hostetter, K. Boyer, R. Simpson, E. Holfels, J. Hopkins, D. Mack, M. B. Mets, C. N. Swisher, D. Patel, N. Roizen, L. Stein, M. Stein, S. Withers, E. Mui, C. Egwuagu, J. Remington, R. Dorfman and R. McLeod (1996). "Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception." Clin Infect Dis **23**(5): 1055-1060.

Wallon, M., C. Liou, P. Garner and F. Peyron (1999). "Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy." BMJ **318**(7197): 1511-1514.

Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark and Z. Cao (1999). "IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family." J Biol Chem **274**(27): 19403-19410.

Wille, U., E. N. Villegas, L. Craig, R. Peach and C. A. Hunter (2002). "Contribution of interleukin-12 (IL-12) and the CD28/B7 and CD40/CD40 ligand pathways to the development of a pathological T-cell response in IL-10-deficient mice." Infect Immun **70**(12): 6940-6947.

Wilson, D. C., G. M. Grotenbreg, K. Liu, Y. Zhao, E. M. Frickel, M. J. Gubbels, H. L. Ploegh and G. S. Yap (2010). "Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells." PLoS Pathog **6**(3): e1000815.

Witola, W. H., E. Mui, A. Hargrave, S. Liu, M. Hypolite, A. Montpetit, P. Cavailles, C. Bisanz, M. F. Cesbron-Delauw, G. J. Fournie and R. McLeod (2011). "NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells." Infect Immun **79**(2): 756-766.

Yap, G. S., T. Schariton-Kersten, H. Charest and A. Sher (1998). "Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo." J Immunol **160**(3): 1340-1345.

Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh and A. Sher (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-1629.

## TRABALHOS PUBLICADOS

**Impaired innate immunity in IRAK4 deficient mice leads to defective Type 1 T cell responses, B cell expansion and enhanced susceptibility to infection with *Toxoplasma gondii*.** Béla SR, Dutra MS, Mui E, Montpetit A, Oliveira FS, Oliveira SC, Arantes RM, Antonelli LR, McLeod R, Gazzinelli RT. *Infect Immun*. 2012 Oct 1. [Epub ahead of print]

**Association of a NOD2 gene polymorphism and Th17 lymphocytes with presumed ocular toxoplasmosis.** Dutra MS, Béla SR, Peixoto-Rangel AL, Fakiola M, Cruz AG, Gazzinelli A, Quites HF, Bahia-Oliveira LM, Peixe RG, Campos WR, Higino-Rocha AC, Miller NE, Blackwell JM, Antonelli LR, Gazzinelli RT. *J Infect Dis*. 2012 Oct 24. [Epub ahead of print]

**Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection.** Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, Dias MF, das Graças Almeida Silva M, Béla SR, do Valle Antonelli LR, Arantes RM, Gazzinelli RT, Báfica A, Kroon EG, Campos MA. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2433-45. Epub 2010 Sep 23.