

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

MÍRIAM SANTOS DUTRA

**Análise genética e funcional
da resposta imune na toxoplasmose
ocular humana**

Belo Horizonte

2012

MÍRIAM SANTOS DUTRA

**Análise genética e funcional
da resposta imune na toxoplasmose
ocular humana**

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

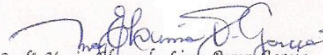
Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte

2012



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MIRIAM SANTOS DUTRA.
Aos quatro dias do mês de outubro de 2012, às 13:00 horas reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise genética e funcional da resposta imune na toxoplasmose ocular humana", requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Imunologia*. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Karina Ramalho Bortoluci da Universidade Federal de São Paulo, aprovada; Dr. Edécio Cunha-Neto da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aprovada; Dra. Gláucia Queiroz Andrade da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, orientadora, do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-MG, aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 4 de outubro de 2012.

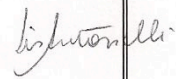

Prof. Maria Helena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Dra. Karina Ramalho Bortoluci - UNIFESP 

Dr. Edécio Cunha-Neto - USP 

Dra. Gláucia Queiroz Andrade - UFMG 

Dr. Helton da Costa Santiago - UFMG 

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - orientadora - CPqRR - Fiocruz - MG 

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - orientador - UFMG 

Aos meus familiares e amigos, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para o andamento e finalização deste trabalho. Durante esses quatro anos, muitos passaram pelo meu caminho e vários tiveram contribuição importante neste trabalho. Vale ressaltar os seguintes, aos quais eu presto meus sinceros agradecimentos:

Meu orientador, Dr. Ricardo Gazzinelli, que me guiou durante o andamento deste trabalho. Gostaria de agradecer a oportunidade de trabalhar em seus laboratórios durante tantos anos e sempre poder contar com a melhor infraestrutura disponível. Também gostaria de agradecer as tantas oportunidades internacionais que tive sob sua orientação e a oportunidade de conhecer muitos pesquisadores importantes na minha área. Obrigada pelos elogios a este trabalho e pelos puxões de orelha quando precisei! E, finalmente, agradeço a confiança em mim depositada. A realização desse projeto não foi fácil! Obrigada por tudo.

Minha orientadora Dra. Lis Antonelli, primeiramente pela paciência, porque sei que minha memória às vezes falha. Gostaria de agradecer também a forma carinhosa de me tratar, principalmente nos momentos difíceis que enfrentei ao longo desse trabalho. E, por último, mas não menos importante, obrigada por sua contribuição e orientação nesse trabalho. Além de outras coisas, o pouco que sei hoje de citometria, eu devo a você! Obrigada.

Minha colaboradora no exterior, Profa. Dra. Jenefer Blackwell por me receber em seu laboratório e disponibilizar pessoas altamente treinadas, Dra. Nancy Miller (*in memoriam*) e Dra. Michaela Fakiola que me ensinaram as técnicas de genotipagem realizadas nesse trabalho. Agradeço também o carinho com o qual todo o grupo do laboratório me recebeu durante os seis meses que fiquei na Inglaterra, a chance de fazer amigos de todas as partes do mundo e de conviver com culturas tão diferentes. Isso foi muito importante para o meu crescimento intelectual e pessoal. Sem sombra de dúvidas, essa oportunidade mudou meu caminho de forma definitiva! Obrigada.

Todos os professores que tive ao longo da minha vida, que, direta ou indiretamente, me deram subsídios para conseguir escrever essa tese. Esse trabalho é fruto dos ensinamentos que cada um deles me transmitiu ao longo da vida. Muito obrigada.

O departamento de Bioquímica e Imunologia desta universidade, por me oferecer a melhor formação que eu poderia ter no estado de Minas Gerais e pela oportunidade de realizar a minha tese de doutorado. Obrigada.

As agências financiadoras desse projeto: National Institutes of Health – NIH, Conselho Nacional de desenvolvimento em Pesquisa – CNPq, pelo financiamento, pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche a mim concedidas.

A equipe médica que fez parte da avaliação dos pacientes examinados nesse trabalho, coordenada pelo Prof. Dr. Wesley Campos: Dr. Fernando Oréfice, Dr. Juliana Oréfice, Dr. Mário Alves, Dr. Sidney Lemos, Dr. Gustavo Hering, Dra. Anna Christina Higino e Sra. Bernadete obrigada pela disponibilidade de irem a campo, pela paciência em me ensinar um pouquinho sobre o olho humano e pelo excelente trabalho realizado.

Todos os voluntários participantes desse trabalho. Obrigada à população de estudo, pela paciência, por me receberem de portas abertas em suas casas e pela infinita vontade de colaborar e participar desse trabalho. Muito obrigada!

As meninas do administrativo: Clécia, Lorena, Iara, Marina e Carla por deixarem sempre o ambiente organizado para nosso trabalho e por me deixarem, na última horinha, acrescentar à lista de importação, aquele reagente indispensável! Obrigada.

As colegas de laboratório Samantha Béla e Adriana Mello e os colegas Humberto Qites e Leonardo Matoso, ambos alunos da Profa. Dra. Andreia Gazzinelli e os motoristas André e Luiz, pelo árduo esforço realizado na organização dos trabalhos de campo, coleta e organização das amostras de sangue. Gostaria de agradecer à colega Samantha também pela realização dos testes sorológicos de todos os pacientes. Obrigada!

Meus colegas de laboratório, em especial às amigas Daninha e Bráulia, com quem iniciei minhas primeiras práticas científicas na imunologia. Nunca vou esquecer os primeiros

ensinamentos! Também gostaria de acrescentar as alunas Ari e Jana pela ajuda na bancada. Obrigada pela dedicação, meninas! Obrigada aos muitos colegas de laboratório: Caroline, Alexandre, Barbara, Paula, Humberto, Guilherme, Léo, Isabella, Marco, Bruno, Luara, Fabiana e Polidoro, pela ótima convivência. Obrigada à Clécinha e à Fabi que fizeram inúmeras coletas de sangue para mim e a todos do laboratório que doaram sangue para as minhas padronizações e titulações de anticorpos. Nesse quesito, um obrigado especial para a Luara, minha “camundonga” preferida e ao chefe, meus controles positivos! E obrigada por deixarem o ambiente de trabalho tão engraçado! Foi divertido trabalhar com vocês.

Meus familiares que sempre entenderam a minha ausência nas datas importantes, meus momentos de desespero e mau humor. Obrigada também por se alegrarem com minhas felicidade e conquistas. Gostaria de agradecer em especial a meus pais pelo esforço de me fornecerem a melhor educação que puderam. Aquele curso de inglês, que tanto insisti em fazer, deu bons frutos! Minha tia Andréia, pelo exemplo de seguir os caminhos da pesquisa. Sem vocês, essa tese não existiria. Obrigada.

Meus melhores amigos e pessoas que moram no meu coração: Marcelo, Bia, Carol, Ari, Prika, Armando, Ferdy, Arthur, Clarinha, Juliano e Julien. Obrigada por segurarem as pontas quando precisei, por rirem comigo nos momentos de felicidade e por estarem sempre presentes, longe ou perto. Obrigada por confiarem em mim, quando confiança me faltava e por fazerem pequenos os problemas, quando eles pareciam maiores do que eu. Vocês são indispensáveis para mim. Obrigada.

*Humanity's deepest desire for knowledge is justification enough for our continuing quest.
And our goal is nothing less than a complete description of the universe we live in.*

Stephen Hawking - Físico Britânico (1942 - presente)

*We are in the ordinary position of scientists of having to be content with piecemeal
improvements: we can make several things clearer, but we cannot make anything clear.*

Frank Plumpton Ramsay - Matemático Britânico (1903-1930)

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho foi realizado no departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e no Cambridge Institute for Medical Research (CIMR) da Universidade de Cambridge, Inglaterra. Para a realização desse trabalho, contou-se com a orientação do professor Dr. Ricardo Tostes Gazzineli, do departamento de Bioquímica e Imunologia deste Instituto e da pesquisadora Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, do CPqRR-FIOCRUZ. Esse trabalho também contou com a colaboração da Dra. Jenefer Blackwell, professora e pesquisadora do CIMR, Dra. Andrea Gazzinelli, professora e pesquisadora da Escola de Enfermagem, da UFMG, do Dr. Wesley Campos, coordenador do Centro de Uveítes, do Hospital São Geraldo, em Belo Horizonte, Minas Gerais e da aluna de doutorado do departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG, Samantha Ribeiro Béla.

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção parasitária que tem como o agente etiológico o protozoário *Toxoplasma gondii*. A retinocoroidite (RC) é a manifestação mais comum da toxoplasmose em pacientes imunocompetentes infectados por esse parasito. Nesse estudo foi analisada a soroprevalência da toxoplasmose em moradores do Vale do Jequitinhonha. Nessa região a soroprevalência é de 43,0%. Os moradores também foram submetidos à exame oftalmológico para identificação de RC causada por *T. gondii*. Foram identificados 68 casos de toxoplasmose ocular (TO) crônica (COT) o que indica manifestação de TO em 14,4% dos casos de toxoplasmose. Baseando-se no pedigree construído nas três vilas, os casos de TO foram separados em trios para a análise de associação alélica baseada em família (FBAT), que avaliou a possível associação de 43 polimorfismos distribuídos em 14 genes candidatos. Entre esses genes, estão IL-10, IFN- γ , TLR2, 4, 5 e 9, TIRAP, MyD88, IRAK4, UNC93B1, NOD2, P2XR7, COL2A1 e ABCA4. Foram encontradas evidências de associação genética dos genes COL2A1, ABCA4, P2XR7, TLR9 e NOD2 com o desenvolvimento de TO. Analisou-se então, se os polimorfismos rs187084 e rs3135499, presentes nos genes de TLR9 e NOD2 e associados ao desenvolvimento de TO ($p=0,042$ e $p=0,039$, respectivamente) interfeririam na resposta imune frente ao parasito. Para tanto, foi avaliada a produção de citocinas e a imunidade de células T de pacientes com COT ou com TO ativa (AOT) e controles. Não foram encontradas diferenças na produção de citocinas Th1, Th2 ou Th17 em pacientes carregando os diferentes genótipos do polimorfismo em TLR9. Também não foram encontradas diferenças nos níveis de citocinas produzidas por células Th1 (IFN- γ e IL-2) quando comparados pacientes com COT ou com TO ativa (AOT) com indivíduos assintomáticos. No entanto, foi encontrada produção aumentada de IL-17 por PBMCs de pacientes com COT ou AOT. A produção aumentada também foi associada ao genótipo heterozigoto para o polimorfismo de NOD2 (rs3135499). A IL-17 nesses indivíduos é produzida principalmente por células T CD4⁺/T-bet/IFN- γ , linfócitos Th17, que estão presentes em maior frequência em indivíduos com COT ou AOT. Em conjunto, esses resultados sugerem que NOD2 influencia a produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺, que, por sua vez, medeiam processos inflamatórios que podem contribuir para o desenvolvimento de lesões oculares em pacientes infectados por *T. gondii*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic infection that has the protozoan *Toxoplasma gondii* as its aetiological agent. Retinochoroiditis (RC) is the most common manifestation of toxoplasmosis in immunocompetent patients infected with the parasite. In this study, we analyze the seroprevalence of toxoplasmosis in the inhabitants of Vale do Jequitinhonha. In the area, the seroprevalence of toxoplasmosis was of 43,0%. The villagers were also submitted to ophthalmological examination for the identification of toxoplasmic RC. A total of 68 cases of chronic ocular toxoplasmosis (COT) which indicates 14,4% of manifestation of ocular toxoplasmosis (TO). Based on the construction of pedigrees for the three villages, the TO multicases families were split into trios that were analysed using a family based allelic association test (FBAT) to evaluate potential associations with 43 polymorphisms distributed in 14 candidate genes. Among these genes, are: IL-10, IFN- γ and IL-12, TLR2, 4, 5 and 9, MyD88, UNC93B1, TIRAP, NOD2, P2XR7, COL2A1 and ABCA4. We found evidence of genetic association of the genes COL2A1, ABCA4, P2XR7, TLR9 and NOD2 with the development of TO. We then studied if the polymorphisms rs187084 and rs3135499, in the TLR9 and NOD2 genes and which were associated with the development of TO ($p=0,042$ e $p=0,039$, respectively) would play a role in the immune response to the parasite. Therefore, we characterized the production of cytokines and the T cell response in cases of COT and four cases of active TO (AOT) and controls. We found no differences in the production of Th1, Th2 or Th17 cytokines in patients bearing any of the possible genotypes for the rs178084 polymorphism in TLR9 gene. We also found no difference in cytokines (IFN- γ and IL-2) when comparing patients with AOT or COT to asymptomatic individuals. However, we found an increased production of IL-17 by PBMCs from patients with either stage of TO. The increased production of IL-17 was also associated with the heterozygous genotype on NOD2 polymorphism (rs3135499). The main source of IL-17 was shown to be CD4⁺/T-bet-/IFN- γ , Th17 lymphocytes, which were present in higher frequency in patients with scarred or active lesions of ocular toxoplasmosis. Altogether, our results suggest that NOD2 influences the production of IL-17 by CD4⁺ T helper lymphocytes, which in turn mediates the inflammatory process and might contribute to the development of ocular lesions in patients infected with *T. gondii*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO MUNDO DE ACORDO COM ESTUDOS REALIZADOS ENTRE 1992 E 2009..	21
FIGURA 2: CICLO DE VIDA DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i> MOSTRANDO OS ESTÁGIOS DE VIDA E MODOS DE TRANSMISSÃO DO PARASITO..	24
FIGURA 3: ESQUEMA ANATÔMICO DO GLOBO OCULAR HUMANO E RETINOGRAFIA MOSTRANDO A RC CAUSADA POR <i>T. GONDII</i> ..	28
FIGURA 4: SINALIZAÇÃO E TRÁFEGO DOS TLR..	33
FIGURA 5: A VIA DE SINALIZAÇÃO CRUZADA DOS NLR E OUTRAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE..	35
FIGURA 6: RESUMO DO MECANISMO PROPOSTO PARA O CONTROLE DOS REGULADORES TRANSCRICIONAIS EXERCIDO POR P2RX7..	38
FIGURA 7: RETINOGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS TRÊS CLASSES DE LESÕES ENCONTRADAS NOS INDIVÍDUOS PROVENIENTES DAS TRÊS VILAS DO VALE DO JEQUITINHONHA.....	63
FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO GRÁFICA DOS PICOS DE GENOTIPAGEM PARA O MICROSSATÉLITE D2S2382 DENTRO DE UMA FAMÍLIA, OBTIDOS NO PROGRAMA FRAGMENT PROFILER..	66
FIGURA 9: ILUSTRAÇÃO GRÁFICA DO AGRUPAMENTO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS NA GENOTIPAGEM PELA REAÇÃO DE TAQMAN™, PARA O SNPS TLR9/ <i>RS187084</i> NO TOTAL DE 301 AMOSTRAS, USANDO O SOFTWARE SDS.....	71
FIGURA 10: DISTRIBUIÇÃO DAS TAXAS DE PREVALÊNCIA NAS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS NOS INDIVÍDUOS PROVENIENTES DAS TRÊS VILAS DO VALE DO JEQUITINHONHA.....	79
FIGURA 11: MANIFESTAÇÃO DA TO DE ACORDO COM AS FAIXAS ETÁRIAS DOS INDIVÍDUOS DO VALE DO JEQUITINHONHA.....	80
FIGURA 12: NÚMERO DE LESÕES POR PACIENTE DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA..	82
FIGURA 13: TAMANHO DAS LESÕES POR PACIENTE DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA..	83
FIGURA 14: DESENHO DOS PEDIGREES REDUZIDOS PARA AS ÁREAS DE CAJU (1, 2) E SPJ (3, 4 E 5), UTILIZANDO O PROGRAMA MADELINE.....	85
FIGURA 15: FREQUÊNCIA E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T CD4+HLA-DR+ EM PACIENTES SOROPOSITIVOS COM E SEM TO.....	99
FIGURA 16: FREQUÊNCIA E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T CD8+HLA-DR+ EM PACIENTES SOROPOSITIVOS COM E SEM TO.....	100
FIGURA 17: PRODUÇÃO DE CITOCINAS DO TIPO TH1 E TH2 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMCS DE INDIVÍDUOS COM E SEM TO.....	101
FIGURA 18: RESPOSTA DE CÉLULAS TH1 MULTIFUNCIONAIS EM INDIVÍDUOS COM E SEM TO.....	102
FIGURA 19: PRODUÇÃO DE IL17-A EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMCS DE INDIVÍDUOS COM E SEM TO.....	103
FIGURA 20: FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T CD4+ PRODUTORAS DE IL-17A E IFN- γ EM INDIVÍDUOS COM E SEM TO.....	104
FIGURA 21: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS T CD4+ PRODUTORAS DE IL-17A NOS PACIENTES COM LESÃO OCULAR.....	105
FIGURA 22: DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH1, IMUNOMODULATÓRIA E TH17 NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DE INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS COM OU SEM TO, PARA O SNP <i>RS187084</i> , EM TLR9.....	106
FIGURA 23: ANÁLISES DO HAPLOVIEW PARA OS PARES DE MEDIDAS R2 DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD) ENTRE OS SNPS DE NOD2 EM FUNDADORES NÃO RELACIONADOS NAS FAMÍLIAS BRASILEIRAS.....	108
FIGURA 24: DISTRIBUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH1, IMUNOMODULATÓRIA E TH17 NOS DIFERENTES GENÓTIPOS DE INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS COM OU SEM TO, PARA OS TRÊS SNPS AVALIADOS.....	109
FIGURA 25: PRODUÇÃO DE IL17-A, IFN γ E TNF- α EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE PBMCS DE INDIVÍDUOS COM E SEM AOT.....	112
FIGURA 26: PERFIL DA RESPOSTA DE CÉLULAS T CD4+CD45RO+ PRODUTORAS DE IL-17A, TNF- α E IFN γ , NOS INDIVÍDUOS COM AOT.....	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO BRASIL DE ACORDO COM 21 ESTUDOS REALIZADOS EM 17 ESTADOS DO BRASIL, PUBLICADOS ENTRE 1998 A 2010	22
TABELA 2: GENES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE TOXOPLASMOSE OCULAR REPORTADOS POR ESTUDOS PUBLICADOS ENTRE 2008 E FEVEREIRO DE 2012 (CONTINUA).....	51
TABELA 3: NÚMERO DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A PUNÇÃO VENOSA, SEPARADOS POR FAIXA ETÁRIA E GÊNERO E PERCENTUAL DE INDIVÍDUOS PUNÇIONADOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE INDIVÍDUOS PROVENIENTES DAS VILAS DE SPJ, CAJU E VDG NO VALE DO JEQUITINHONHA, MG ..	57
TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE COT DE ACORDO COM (A) FAMÍLIAS PROVENIENTES DO VALE DO JEQUITINHONHA, MG, E (B) TRIOS DE PAIS/FILHOS OU CASO/IRMÃOS PROVENIENTES DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.....	58
TABELA 5: INDIVÍDUOS DO VALE DO JEQUITINHONHA E BELO HORIZONTE SELECIONADOS PARA OS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS.....	59
TABELA 6: NÚMERO DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS AO EXAME OFTALMOLÓGICO, SEPARADOS POR FAIXA ETÁRIA E GÊNERO E PERCENTUAL DE INDIVÍDUOS EXAMINADOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE INDIVÍDUOS PUNÇIONADOS DAS VILAS DE SPJ, CAJU E VDG NO VALE DO JEQUITINHONHA	62
TABELA 7: INFORMAÇÕES SOBRE OS MARCADORES MICROSSATÉLITES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE GENOTIPAGEM.....	64
TABELA 8: CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS SNPS GENOTIPADOS PELA TÉCNICA DE TAQMAN™ EM 301 AMOSTRAS DE DNA (CONTINUA)	69
TABELA 9: PAINÉIS DE ANTICORPOS UTILIZADOS NA CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO O FACSCALIBUR™ EQUIPADO COM 2 LASERS (AZUL E VERMELHO), CAPAZ DE DISCERNIR QUATRO FLUOROCROMOS.....	75
TABELA 10: PAINEL DE ANTICORPOS UTILIZADOS NA CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO O SISTEMA LSR FORTRESSA™ EQUIPADO COM 3 LASERS (AZUL, VIOLETA E VERMELHO), CAPAZ DE DISCERNIR ATÉ QUATORZE FLUOROCROMOS.....	77
TABELA 11: SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE DE ACORDO COM A IDADE E GÊNERO DOS INDIVÍDUOS NAS TRÊS VILAS DO VALE DO JEQUITINHONHA.....	78
TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LESÕES OCULARES EM RELAÇÃO À SOROLOGIA ANTI-T. GONDII NOS INDIVÍDUOS DO VALE DO JEQUITINHONHA.....	80
TABELA 13: CARACTERIZAÇÃO DOS ACHADOS OFTALMOLÓGICOS NOS INDIVÍDUOS COM TOXOPLASMOSE OCULAR, PROVENIENTES DO VALE DO JEQUITINHONHA EM MINAS GERAIS.....	81
TABELA 14: SUMÁRIO DOS PEDIGREES ESTENDIDOS IDENTIFICADOS NAS VILAS DE SÃO PEDRO DO JEQUITINHONHA, CAJU E VIRGEM DAS GRAÇAS, NO VALE DO JEQUITINHONHA	83
TABELA 15: FREQUÊNCIA DE ALELOS COMUNS E VALORES DE P PARA HWE PARA OS TAG-SNPS DOS GENES CANDIDATOS GENOTIPADOS NAS AMOSTRAS DO VALE DO JEQUITINHONHA E CAMPOS DOS GOYTACAZES ANALISADAS EM CONJUNTO	87
TABELA 16: ESTIMATIVAS DO PODER AMOSTRAL PELO MÉTODO PROPOSTO POR KNAPP PARA OS TRIOS DE CAMPOS DOS GOYTACAZES RJ, VALE DO JEQUITINHONHA MG E AMBAS AS POPULAÇÕES, BRASIL.....	90
TABELA 17: RESULTADOS DO TESTE DE ASSOCIAÇÃO ALÉLICA ENTRE 32 MARCADORES E A TOXOPLASMOSE OCULAR.....	92
TABELA 18: RESULTADOS DO TESTE DE ASSOCIAÇÃO ALÉLICA ENTRE 32 MARCADORES E A TOXOPLASMOSE OCULAR.....	96
TABELA 19: ACHADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR ATIVA (AOT) EXAMINADOS NO HOSPITAL SÃO GERALDO EM BELO HORIZONTE, MG.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
APC	Alofococianina
ATP	Adenosina trifosfato
AOT	Toxoplasmose ocular ativa
BSA	Albumina sérica bovina
CCL5	Ligante de quimiocina de motivo C-C número 5
CCR5	Receptor de quimiocina de motivo C-C número 5
CD	Domínio clonal
COEP	Conselho de Ética em Pesquisa do CPqRR - FIOCRUZ
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CEPH	População de residentes de Utah com ancestralidade Norte e Oeste europeia.
CFSE	Succinidil éster de carboxi-flouresceína
CIMR	Centro de Pesquisas Médicas, Cambridge, Reino Unido
COT	Toxoplasmose ocular crônica
CpG	Repetições de citosina e guanina com esqueleto fosfodiéster
Cr	Cromossomo
DC	Células dendríticas
dd	Medida de tamanho das lesões em diâmetro de disco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	Índice ELISA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
ELISA	Ensaio imunoenzimático
F	Feminino

FACs	Citometria de Fluxo
Fas	Domínio de morte
FasL	Ligante de Fas, também chamado de CD95
FBAT	Teste de associação alélica baseado em família
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosina trifosfato
GPI	Glicofosfatidilinositol
HLA-	Antígeno de leucócito humano do complexo MHC II
HIGM	Síndrome de hiper IgM
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ID	Identificação
IFAT	Teste de imunofluorescência de anticorpo
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IgG	Imunoglobulina G
IKKs	Quinases inibidoras da quinase kappa
IL-	Interleucina
IRAKs	Quinase associadas ao receptor de interleucina 1
IRG	GTPases relacionadas à imunidade
LD ₁₀₀	Dose letal para 100% dos animais
LMS	“Linkage Mapping Set”
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Masculino
MAF	Frequência do alelo menos frequente
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDP	Muramil dipeptídeo
MIP-1a	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal

MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
NCCCTS	“National Collaborative Chicago-based Congenital Toxoplasmosis Study”
NF- κ B	Fator nuclear contendo a cadeia leve kappa, estimulador de células B ativadas
NK	Matadoras naturais (células)
NL	Indivíduos assintomáticos para toxoplasmose ocular
NLR	Receptor com domínio de ligação a nucleotídeo contendo repetições ricas em leucina
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de ligação a nucleotídeo
NOS	Óxido nítrico sintase
OR	“Odds Ratio”
P2	Receptor purinérgico 2
P2Y	Receptor purinérgico 2 metabotrópico
P2RX7	Receptor purinérgico 2 Ionotrópico 7
PAMP	Padrões de moléculas associados a patógenos
pb	Pares de base
PBMC s	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
Pam3Cys	Lipopeptídeo Pam-3 Cys-Ser
PerCP	Proteína A peridina clorofila
Poly(I:C) LC	Ácido poliinosina-policitidílico estabilizado com polilisina e carboximetilcelulose
R-848	Resequimod
R10 (20)	Meio RPMI suplementado com 10% (ou 20%) de soro fetal bovino
RC	Retinocoroidite

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	“Sequence detection sistem”
SFB	Soro fetal bovino
SN	Soronegativos
SNP	Polimorfismo de base única
STAg	Antígeno total de <i>Toxoplasma gondii</i>
SPJ	Vila de São Pedro do Jequitinhonha, no Vale do Jequitinhonha
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
tag-SNPs	Polimorfismos de base única marcadores de haplótipos
TE	Solução de Tris-EDTA
TCR	Receptor de células T
Th	Célula T auxiliar
TIR	Domínio “Toll/interleucin receptor”
TIRAP	Adaptador contendo domínio TIR
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral
TO	Toxoplasmose ocular
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TLR	Receptores do tipo Toll
TRIF	Adaptador contendo o domínio TIR indutor de IFN- β
UNC93B1	Homólogo B1 de UNC-93
UV	Ultravioleta
VdG	Região de Virgem das Graças no Vale do Jequitinhonha
YRI	População humana de Yoruba em Ibadan, Nigéria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE	20
1.1.1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA TOXOPLASMOSE	20
1.1.2	O AGENTE ETIOLÓGICO E SEU CICLO DE VIDA	23
1.1.2.1	Genética do parasito	25
1.1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	27
1.2	A RESPOSTA IMUNE NA TOXOPLASMOSE	30
1.2.1	O PAPEL DA RESPOSTA IMUNE INATA NO MODELO MURINO DA INFECÇÃO POR <i>T. GONDII</i>	30
1.2.1.1	A via dos receptores do tipo Toll	31
1.2.1.2	A via dos receptores do tipo NOD	34
1.2.1.3	Receptores ionotrópicos de ATP	36
1.2.2	A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA NO MODELO MURINO DA INFECÇÃO POR <i>T. GONDII</i>	39
1.2.3	A RESPOSTA IMUNE EM HUMANOS: O COMPORTAMENTO DA TOXOPLASMOSE EM INDIVÍDUOS IMUNOSSUPRIMIDOS	42
1.3	ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE OCULAR	44
1.3.1	A TOXOPLASMOSE OCULAR NO MUNDO E NO BRASIL	44
1.3.2	MANIFESTAÇÕES DA TOXOPLASMOSE OCULAR	45
1.4	A RESPOSTA IMUNE NA TOXOPLASMOSE OCULAR	47
1.4.1	O MODELO ANIMAL	47
1.4.2	A RESPOSTA IMUNE EM HUMANOS	49
1.4.3	SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA EM HUMANOS	50
2	HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E PACIENTES	56
3.1.1	POPULAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE DA SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE, PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE OCULAR E GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES PARA CONSTRUÇÃO DOS PEDIGREES	57
3.1.2	AMOSTRAS UTILIZADAS NA GENOTIPAGEM E ANÁLISE GENÉTICA DOS TAG-SNPs	57
3.1.3	AMOSTRAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	58
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DE IGG ANTI- <i>T. GONDII</i> POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	59
3.3	DOSAGEM DE DNA POR MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA	60
3.4	EXAME OFTALMOLÓGICO	61
3.4.1	CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES	62
3.5	GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES	64
3.6	ANÁLISE DO PEDIGREE	66
3.6.1	COLETA DE DADOS DO PEDIGREE	66
3.6.2	IDENTIFICAÇÃO DOS PEDIGREES	67
3.6.3	DETECÇÃO DE ERROS	67
3.6.4	DESENHO DOS PEDIGREES	67
3.6.5	INCLUSÃO DOS DADOS NO BANCO DE DADOS	68
3.7	ANÁLISE DOS SNPs	68
3.7.1	ESCOLHA DOS GENES CANDIDATOS	68
3.7.2	ESCOLHA DOS TAG-SNPs	68
3.7.3	GENOTIPAGEM DOS TAG-SNPs PELO MÉTODO TAQMAN™	70
3.8	ANÁLISE DOS DADOS GENÉTICOS	72
3.8.1	CÁLCULO DO PODER AMOSTRAL	72
3.8.2	CÁLCULO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	72

3.8.3	TESTE DE ASSOCIAÇÃO BASEADO EM FAMÍLIA (FBAT)	72
3.9	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	73
3.9.1	PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)	73
3.9.2	ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS COM ANTÍGENO TOTAL DE <i>T. GONDII</i>	73
3.9.3	MARCAÇÃO DAS CÉLULAS PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	74
3.9.4	ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	74
3.9.5	MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE	75
3.9.6	MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS	76
3.9.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS	77
3.9.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
4	RESULTADOS	78
4.1	A SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO VALE DO JEQUITINHONHA	78
4.2	A TOXOPLASMOSE OCULAR NO VALE DO JEQUITINHONHA	79
4.3	DESCRIÇÃO DOS PEDIGREES	83
4.4	ANÁLISE DOS DADOS GENÉTICOS	86
4.4.1	FREQUÊNCIA DOS ALELOS NA POPULAÇÃO E CÁLCULO DE HWE	86
4.4.2	CÁLCULO DO PODER AMOSTRAL	88
4.4.3	TESTE DE ASSOCIAÇÃO ALÉLICA BASEADO EM FAMÍLIA (FBAT)	89
4.5	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	98
4.5.1	A RESPOSTA DE CÉLULAS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ : ATIVAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	98
4.5.2	PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH1 E TH2 NOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES	100
4.5.3	A RESPOSTA DE CÉLULAS TH1	101
4.5.4	A RESPOSTA DE CÉLULAS TH17	103
4.5.5	A PRODUÇÃO DE CITOCINAS DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DOS SNPs NOS RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA, ASSOCIADOS À TOXOPLASMOSE OCULAR	106
4.5.5.1	Polimorfismos no gene de TLR9 e sua interação com a resposta anti- <i>T. gondii</i>	106
4.5.5.2	Polimorfismos no gene de NOD2 e sua interação com a resposta imune anti- <i>T. gondii</i>	107
4.5.6	A RESPOSTA IMUNE CELULAR EM INDIVÍDUOS COM LESÃO ATIVA	110
5	DISCUSSÃO	114
5.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
6	CONCLUSÕES	130
7	TRABALHOS DESENVOLVIDOS E PUBLICADOS	131
7.1	ARTIGOS PUBLICADOS	131
7.2	ARTIGOS EM PREPARAÇÃO	132
	REFERÊNCIAS	133
	ANEXOS	154
	ADENDOS	165

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma parasitose, de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A descrição do agente etiológico da toxoplasmose foi feita de forma independente por Nicolle e Manceaux, na Tunísia e Splendore, no Brasil, e data do ano de 1908 (Dubey, 2009). Durante alguns anos após a descoberta do parasito, seu estudo não foi alvo de muitas pesquisas. Apenas na década de 70, com o conhecimento de sua ampla distribuição geográfica, é que seu estudo foi aprofundado. Nas subseções seguintes, será feita uma breve descrição de aspectos gerais da toxoplasmose, tais como: distribuição geográfica, ciclo de vida do *T. gondii*, manifestações clínicas, transmissão, prevenção e formas de tratamento.

1.1.1 Distribuição geográfica da toxoplasmose

De ampla distribuição, estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *T. gondii* (Ribeiro; Mutis *et al.*, 2008). O parasito pode ser encontrado em diversas partes do mundo, tendo sido isolado em países de regiões tropicais, temperadas e até mesmo glaciais, como norte do Canadá, Alasca e Groenlândia (Lebech; Larsen *et al.*, 1993; Messier; Levesque *et al.*, 2009). Apesar da ubiquidade do *T. gondii*, as taxas de prevalência da toxoplasmose, nas diferentes regiões geográficas, variam de acordo com uma série de fatores, tais quais: a exposição da população aos fatores de risco à infecção; a prevalência da toxoplasmose nos hospedeiros definitivos e intermediários; e fatores climáticos que favorecem o desenvolvimento e manutenção da viabilidade dos oocistos, uma das formas infectantes do parasito (Hill e Dubey, 2002).

A Figura 1 mostra o mapa de distribuição da toxoplasmose no mundo e as taxas de prevalência reportadas em diversos países (Pappas; Roussos *et al.*, 2009). Na Europa continental, a taxa de prevalência varia de 10 a 60% e pode-se observar um aumento gradativo no sentido oeste-leste. Apesar de relativamente altas, as taxas de

soroprevalência seguem tendência decrescente em vários países, como Áustria (Edelhofer e Prossinger, 2010), França (Berger; Goulet *et al.*, 2009; Villena; Ancelle *et al.*, 2010) e Holanda (Hofhuis; van Pelt *et al.*, 2011).

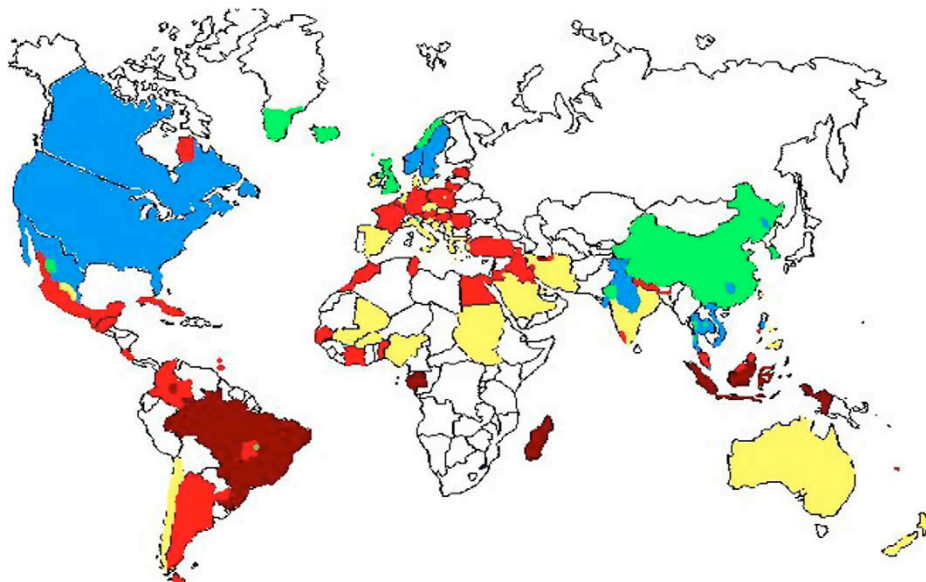


Figura 1: Mapa de distribuição da soroprevalência da toxoplasmose no mundo de acordo com estudos realizados entre 1992 e 2009. Os países coloridos em marrom apresentam prevalência acima de 60%, em vermelho, prevalência entre 40 e 60%, em amarelo, de 20 a 40%, em azul, 10 a 20% e em verde <10%. A cor branca indica falta de dados (Pappas; Roussos *et al.*, 2009).

Na América do Norte a prevalência é baixa, entre 10 a 20%. Nos Estados Unidos, a taxa de soroprevalência também segue tendência de diminuição (Jones; Kruszon-Moran *et al.*, 2007). O México apresenta distribuição heterogênea, uma vez que a prevalência aumenta em direção ao sul do país (Velasco-Castrejon; Salvatierra-Izaba *et al.*, 1992). Nos demais países da América Latina, a prevalência é superior a 40%, com exceção do Chile, que apresenta prevalência de 36.9% (Contreras; Schenone *et al.*, 1996).

As demais regiões do mundo apresentam taxas que variam de 10% a níveis superiores a 60%. Em especial, há um foco de alta prevalência em países do oriente médio, incluindo Turquia, Irã, Iraque, e Kuwait. Nas ilhas da Indonésia e na ilha de Madagascar, na África as prevalências chegam a ser superiores a 60% (Pappas; Roussos *et al.*, 2009).

No Brasil, observam-se as maiores taxas de prevalência do continente americano. A Tabela 1, sumariza os dados de 21 estudos publicados entre 1998 e 2010, realizados em 17 estados do Brasil para determinação da soroprevalência da toxoplasmose em

amostras da população brasileira. Estudos realizados no país indicam soroprevalência de 50 a 80%. A taxa é maior em indígenas, como mostram os estudos realizados nos estados do Mato Grosso e Rondônia (Sobral CA, 2005, Boia 2008). Em Belo Horizonte, a prevalência encontrada por Carellos em 2008 foi de 56.3%, similar à de Uberlândia em 2004, de 51.6% (Segundo; Silva *et al.*, 2004a).

Tabela 1: Soroprevalência da toxoplasmose no Brasil de acordo com 21 estudos realizados em 17 estados do Brasil, publicados entre 1998 a 2010

Referência	Estado	Tamanho amostral	Prevalência ¹
(Goncalves; Matos Cde <i>et al.</i> , 2010)	São Paulo	574 grávidas	62.0%
(Sroka; Bartelheimer <i>et al.</i> , 2010)	Ceará	963 grávidas	68.6%
(Vaz; Thomaz-Soccol <i>et al.</i> , 2010)	Paraná	20389 grávidas	53.0%
(Inagaki; Oliveira <i>et al.</i> , 2009)	Sergipe	9550 grávidas	69.3%
(Lago; Conrado <i>et al.</i> , 2009)	Rio Grande do Sul	2421 grávidas	67.0%
(Barbosa; de Carvalho Xavier Holanda <i>et al.</i> , 2009)	Rio Grande do Norte	190 grávidas	66.3%
(Porto; Amorim <i>et al.</i> , 2008)	Pernambuco	503 grávidas	74.7%
(Carellos; Andrade <i>et al.</i> , 2008)	Minas Gerais	420 grávidas	56.3%
(do Amaral; de Saidneuy <i>et al.</i> , 2008)	Santa Catarina	233 doadores de órgãos	66.7%
(Boia; Carvalho-Costa <i>et al.</i> , 2008)	Amazonas	260 índios	73.5%
(Cavalcante; Aguilar <i>et al.</i> , 2006)	Rondônia	266 indivíduos	73.3%
(Spalding; Amendoeira <i>et al.</i> , 2005)	Rio Grande do Sul	2126 grávidas	74.5%
(Sobral; Amendoeira <i>et al.</i> , 2005)	Mato Grosso	148 índios Enawenê-Nawê	80.4%
	Pará	568 índios Tiriyo	55.6%
	Amapá	302 índios Waiãpi	59.6%
(Avelino; Campos <i>et al.</i> , 2004)	Goiás	2242 idade fértil	51.2%
(Olbrich Neto e Meira, 2004)	São Paulo	913 grávidas	53.7%
(Segundo; Silva <i>et al.</i> , 2004b)	Minas Gerais	805 grávidas	51.6%
(Coelho; Kobayashi <i>et al.</i> , 2003)	Pernambuco	160 doadores de sangue	75.0%
(Varella; Wagner <i>et al.</i> , 2003)	Rio Grande do Sul	1261 indivíduos	59.8%
(Bahia-Oliveira; Jones <i>et al.</i> , 2003)	Rio de Janeiro	1436 indivíduos	53.0%
(Reiche; Morimoto <i>et al.</i> , 2000)	Paraná	1559 grávidas	67.0%
(Cerqueira; Kawarabayashi <i>et al.</i> , 1998)	Bahia	132 indivíduos	25.8%

¹ Soroprevalência total reportada nos estudos, de acordo com os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, obtidos através dos testes de ELISA e ensaio de imunofluorescência de anticorpo IFAT.

Os dados resumidos nessa sessão demonstram que as taxas de prevalência reportadas nos estados brasileiros estão entre as maiores do mundo. Os fatores que contribuem para a maior prevalência da toxoplasmose no Brasil são vários e incluem: i) baixa renda

per capita (Avelino; Campos *et al.*, 2004; Lopes, F M; Mitsuka-Bregano *et al.*, 2009); ii) baixo nível de escolaridade (Bahia-Oliveira; Jones *et al.*, 2003; Varella; Wagner *et al.*, 2003); iii) fatores climáticos como umidade e altas temperaturas, que favorecem a sobrevivência dos oocistos no ambiente (Buffolano, 2008); iv) hábitos alimentares, como consumo de carne crua ou mal cozida; v) altos índices de prevalência em rebanhos suínos e ovinos (Avelino; Campos *et al.*, 2004; Bezerra; Carvalho *et al.*, 2011; Lopes, F M; Mitsuka-Bregano *et al.*, 2009; Lopes, W D; Santos *et al.*, 2010); e vi) condições sanitárias, em especial, falta de saneamento básico (Bahia-Oliveira; Jones *et al.*, 2003).

1.1.2 O agente etiológico e seu ciclo de vida

O *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, classificado como esporozoário, membro do filo Apicomplexa, o qual também contém os agentes etiológicos da malária (Dubey, 1977). O ciclo de vida do parasito é complexo e está esquematizado de forma simplificada na Figura 2.

O *T. gondii* apresenta duas formas infectantes: oocistos e cistos teciduais, ambas haplóides (Figura 2c). Oocistos ainda diplóides (Figura 2a), resultantes da reprodução sexuada, são eliminados nas fezes de animais das espécies da família Felidae, os únicos hospedeiros definitivos conhecidos. No ambiente, os oocistos se tornam infectivos após passarem por um processo chamado de esporogonia. Como resultado, cada oocisto passa a conter oito esporocistos haplóides no seu interior (Dubey, 2009). Já os cistos teciduais, contêm inúmeros bradizoítos haplóides, forma menos ativa do *T. gondii*. Estes se desenvolvem nos tecidos cerebrais e musculares dos hospedeiros intermediários, em geral, animais de sangue quente como diversas espécies de aves e mamíferos (Miller, N L; Frenkel *et al.*, 1972).

Os oocistos estão presentes no ambiente e podem ser ingeridos acidentalmente; já os cistos teciduais estão presentes nos tecidos das presas e são ingeridos pelos predadores durante a alimentação (Tenter, 2009; Tenter; Heckeroth *et al.*, 2000). Quando atingem o intestino, ambas as formas infectantes penetram os enterócitos, onde se transformam em taquizoítos. Estes são então capazes de se disseminar pelo hospedeiro e penetrar qualquer célula nucleada do organismo. Uma vez dentro das células, os taquizoítos se multiplicam rapidamente, podendo gerar novos taquizoítos ou se transformar em

bradizoítos, que constituirão os cistos teciduais. Uma vez nessa forma, o *T. gondii* permanece viável e infeccioso, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (Innes, 2010).

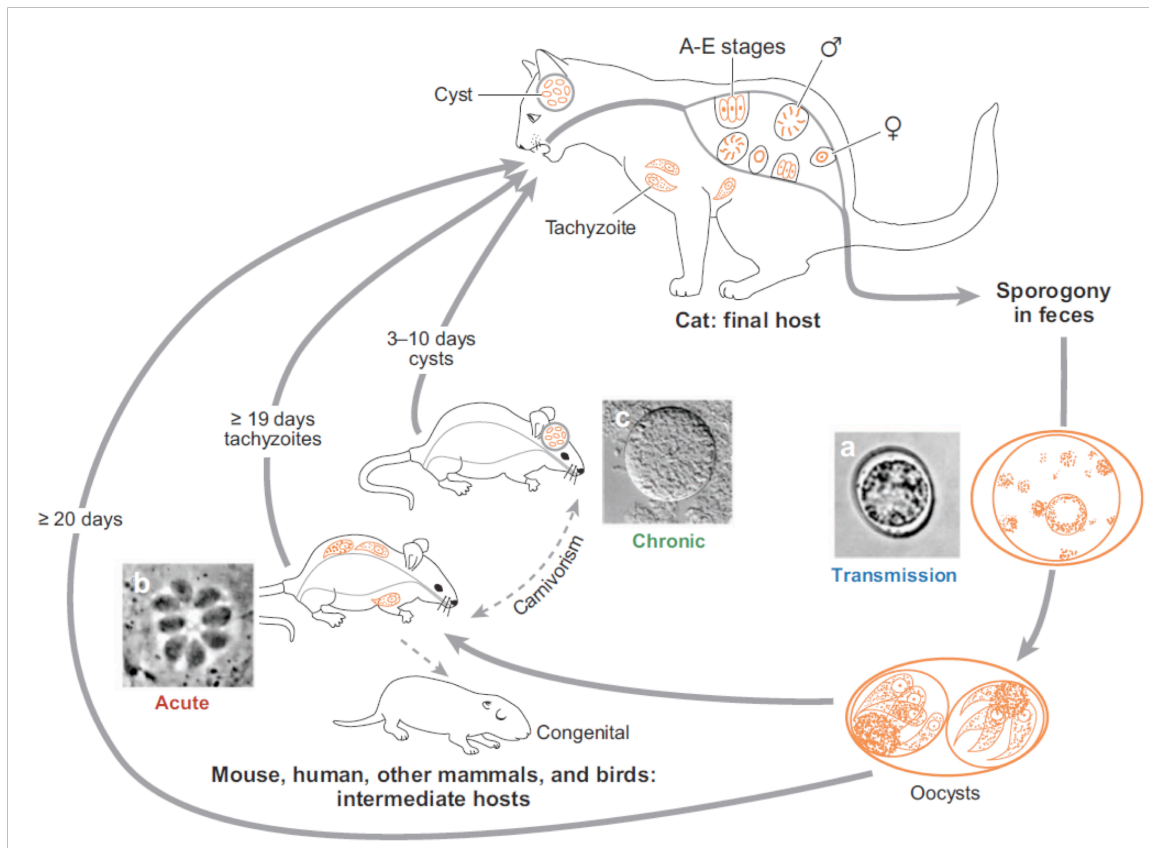


Figura 2: Ciclo de vida do *T. gondii* mostrando os estágios de vida e modos de transmissão do parasito. Os felinos, hospedeiros definitivos, infectam-se pela ingestão de presas portadoras de cistos teciduais contendo bradizoítos; ou pela ingestão de oocistos presentes no ambiente. A replicação sexual ocorre no intestino delgado de felídeos. Dentro dos enterócitos, micro e macrogametas são formados em decorrência de ciclos mitóticos de replicação (A-E). A fusão dos gametas, origina o esporo resistente (oocisto), eliminado nas fezes. Por esporogonia, os oocistos diplóides (a) se desenvolvem em oito esporozoítos haplóides que permanecem dentro dos oocistos, agora maduros. A transmissão ocorre quando os oocistos contaminam os alimentos ou fontes de água, ingeridos por animais de sangue quente. Após a infecção, a fase aguda é caracterizada por rápida multiplicação e liberação dos tachizoítos (b) capazes de infectar quaisquer células nucleadas do hospedeiro. Cistos teciduais contendo bradizoítos (c) são resultado da fase crônica e são transmitidos através da carnivorina e saprofia (Sibley e Ajioka, 2008).

É interessante observar que o ciclo heteroxênico do parasito é facultativo. Na ausência da reprodução sexual, o *T. gondii* se dissemina na forma de cistos teciduais, através da cadeia alimentar, sem necessariamente infectar um felino. Essa característica tem consequências importantes na variabilidade genética do parasito, assunto que será tratado em detalhes na próxima sessão.

No ciclo de vida do *T. gondii*, o homem é considerado hospedeiro acidental e pode se infectar por quatro rotas de transmissão: i) ingestão de carne crua ou mal cozida, proveniente principalmente de rebanhos ovinos, caprinos e suínos contendo cistos teciduais (Kijlstra e Jongert, 2009); ii) ingestão de água, alimentos contaminados ou contato com solo contendo oocistos (Bahia-Oliveira; Jones *et al.*, 2003); iii) transplante de órgãos e tecidos contendo cistos ou taquizoítos (Batista; Pierrotti *et al.*, 2011); e iv) através da placenta, pela via congênita (Rogers; Peh *et al.*, 2008).

1.1.2.1 Genética do parasito

A estrutura populacional do *T. gondii* é singular e varia de acordo com a localização geográfica do parasito. Nos últimos anos, novos conhecimentos importantes sobre esse assunto têm sido revelados. Inicialmente, acreditava-se que na Europa e América do Norte, havia apenas 3 linhagens clonais circulantes. De fato, cerca de 95% das cepas de *T. gondii* provenientes dessas regiões, genotipadas até 2003, foram classificadas em uma dessas três linhagens, denominadas simplesmente de I, II e III (Grigg e Suzuki, 2003). Esse fenômeno era explicado principalmente por duas características do parasito. A primeira é a não obrigatoriedade do ciclo sexual para a disseminação do parasito. Nesses locais, na grande maioria das vezes, o parasito se reproduz de maneira clonal, dentro dos hospedeiros intermediários, disseminando-se através da cadeia alimentar, com as raras ocorrências de reprodução sexuada. O segundo aspecto que pode contribuir para essa estrutura populacional singular é o fato do parasito ser haplóide. Assim, o gato infectado com apenas uma cepa produz oocistos contendo a progênie geneticamente idêntica à cepa infectante original (Boothroyd e Grigg, 2002).

Até 2003, a maioria dos dados de genotipagem eram provenientes de isolados da Europa e América do Norte, onde a maioria das cepas de *T. gondii* pode ser facilmente classificada em uma das três linhagens clonais predominantes. Poucos isolados que apresentavam genótipo misto, eram chamados, até então de “recombinantes” já que eram resultantes de recombinação entre duas das cepas majoritárias. Isolados ainda mais incomuns nessas localidades, apresentando genótipos extremamente polimórficos, foram chamados de cepas “exóticas”, já que continham polimorfismos atípicos, não encontrados nas linhagens clonais (Sibley, 2003).

Dados provenientes de isolados brasileiros a partir de 2006, revolucionaram o conhecimento em relação à estrutura da população do *T. gondii* (Ferreira; Oliveira *et al.*, 2006). No Brasil, a variedade de cepas contrasta enormemente com a dicotomia presente na Europa e América do Norte. Nesse país, há um predomínio de cepas extremamente diversas, apresentando polimorfismos adicionais ausentes nas linhagens clonais (Belfort-Neto; Nussenblatt *et al.*, 2007).

Inicialmente, acreditava-se que as cepas circulantes no Brasil eram meras combinações das cepas canônicas I e III com ausência de isolados similares às cepas do tipo II. Dessa forma, os isolados foram classificados como recombinantes e exóticos, de acordo com a denominação proposta por Sibley em 2003 (Ferreira Ade; Vitor *et al.*, 2004; Ferreira; Oliveira *et al.*, 2006). Contudo, reconstruções filogenéticas recentes, baseadas em sequenciamento de regiões intrônicas, agruparam o *T. gondii* em 11 haplogrupos distintos que representam a grande maioria das linhagens circulantes no mundo identificadas até então (Khan, A; Fux *et al.*, 2007; Khan, A; Jordan *et al.*, 2006; Lehmann; Marcet *et al.*, 2006; Pena; Gennari *et al.*, 2008). Desses 11 haplogrupos, três correspondem às linhagens clonais previamente reconhecidas na América do Norte e Europa. Dos novos grupos identificados, quatro são exclusivamente encontrados na América do Sul (Khan, A; Fux *et al.*, 2007). Dados ainda mais recentes mostram a identificação de uma quarta linhagem clonal circulante na América do Norte (Khan, A; Dubey *et al.*, 2011).

As diferenças na genética do parasito podem acarretar variações na virulência do parasito. A infecção de camundongos de laboratório é um sistema conveniente para avaliar a virulência e patogenicidade durante a toxoplasmose aguda e crônica induzida por cepas recém isoladas. Nesses modelos, as cepas do tipo I são extremamente virulentas e exibem uma dose letal para 100% dos animais (LD_{100}) de um único parasito viável, em comparação às cepas do tipo II e III, com LD_{100} maior que 10^3 (Grigg; Bonnefoy *et al.*, 2001; Grigg e Boothroyd, 2001; Howe; Summers *et al.*, 1996; Sibley e Boothroyd, 1992). Em contraste à virulência polarizada encontrada nas linhagens clonais, as cepas então chamadas de recombinantes apresentam virulência gradual que vai desde avirulenta a extremamente virulenta. É importante dizer, contudo, que a

virulência descrita em camundongos, pode não se assemelhar àquela encontrada em outros hospedeiros, como os membros da espécie humana.

Em humanos, o isolamento das cepas é realizado principalmente de amostras provenientes de três grupos de indivíduos: i) imunossuprimidos, ii) casos de toxoplasmose congênita e, iii) imunocompetentes com manifestações graves da TO. Esse último grupo de indivíduos é fonte importante de informação para embasar a hipótese de que diferentes cepas estão associadas a diferentes manifestações clínicas da toxoplasmose. Nesse grupo, foi encontrado predomínio de cepas do tipo I ou recombinantes, em isolados provenientes dos Estados Unidos e Europa, onde essas cepas circulam com menor frequência (Grigg e Boothroyd, 2001; Howe; Honore *et al.*, 1997). A identificação das linhagens presentes em indivíduos imunocompetentes assintomáticos seria importante para se ter uma real noção do papel de cepas específicas e as diferentes manifestações da toxoplasmose em humanos.

1.1.3 Manifestações clínicas

As diferentes manifestações clínicas da toxoplasmose são influenciadas por fatores do hospedeiro e do parasito. No que tange ao hospedeiro, são importantes: seu estado imunológico, idade e susceptibilidade genética. Quanto ao parasito, são importantes: o inóculo, o tipo de cepa e, aparentemente, a forma infectante (Saeij; Boyle *et al.*, 2005).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* é, na maioria dos casos, assintomática ou pode causar sintomas não patognomônicos, como febre, cansaço e linfadenopatia (Pergola; Cascone *et al.*, 2010). No entanto, quando há manifestações graves ou sequela, a forma mais comum é a inflamação dos tecidos da retina e coróide (Figura 3a), chamada de uveíte ou, mais especificamente, retinocoroidite (RC) (Figura 3b).

De fato, a infecção por *T. gondii* é uma das causas mais comuns de uveíte infecciosa em todo o mundo (Couvreux e Thulliez, 1996; Gilbert e Stanford, 2000; Lum; Jones *et al.*, 2005). Durante a inflamação, o indivíduo afetado se queixa de perda ou turvação da visão e visualização de partículas flutuantes (Roberts; Mets *et al.*, 2001) (Figura 3b, seta preta). Após o processo inflamatório inicial, o tecido afetado cicatriza, resultando em

uma lesão (Figura 3b, seta branca) (Commodaro; Belfort *et al.*, 2009). As consequências para a visão do indivíduo afetado dependem da localização onde as lesões se desenvolvem e da extensão do tecido danificado. A RC pode acarretar perda de visão parcial ou total, quando afeta a região macular ou até não ter consequência permanente, quando afeta as demais regiões do globo ocular (Holland, 2004).

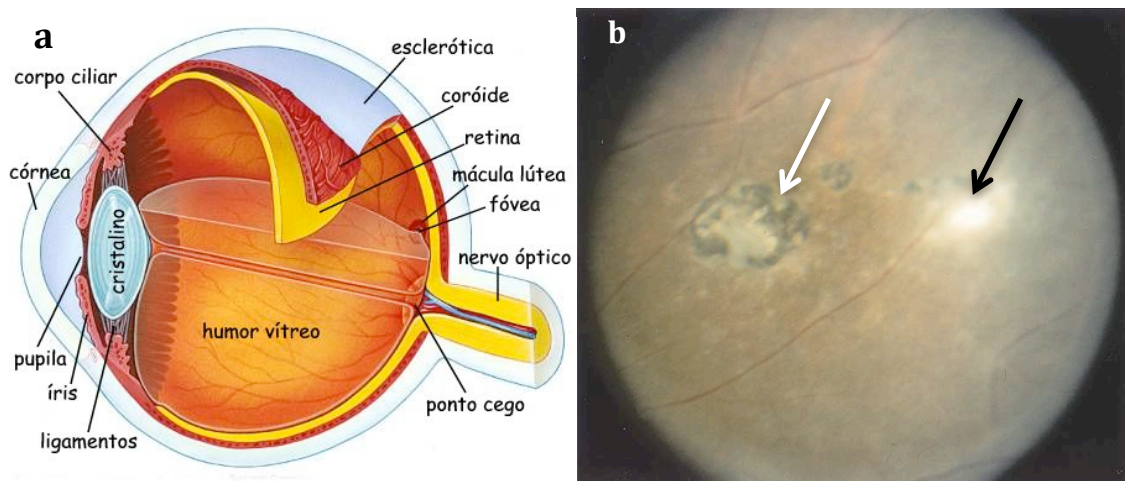


Figura 3: Esquema anatômico do globo ocular humano e retinografia mostrando a RC causada por *T. gondii* a) Esquema anatômico do globo ocular humano. As camadas diretamente afetadas durante a toxoplasmose ocular (TO) são, principalmente, retina e coróide. Na fóvea, há a formação da imagem, a região próxima a esse ponto é chamada de região macular. b) Retinografia de um indivíduo adulto imunocompetente mostrando lesões cicatrizadas típicas, causadas por *T. gondii* (seta branca) e uma lesão ativa localizada à direita (seta preta) (Commodaro; Belfort *et al.*, 2009).

Além da RC, há raros relatos de manifestação da toxoplasmose de forma aguda em indivíduos imunocompetentes. Nos casos relatados, a infecção pelo *T. gondii* comprometeu o funcionamento de órgãos internos, causando pneumonia, encefalite e pericardite (Carme; Bissuel *et al.*, 2002; Taila; Hingwe *et al.*, 2011).

Em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou pacientes tratados com imunossupressores, a infecção por *T. gondii* pode se agravar. Em estágios avançados da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os indivíduos podem apresentar taquizoítos livres e cistos cerebrais. Os sintomas desse quadro constituem uma encefalite aguda que pode evoluir a óbito (Chimelli, 2011; Pereira-Chiocola; Vidal *et al.*, 2009). Com o tratamento específico anti-retroviral, os pacientes têm seus níveis de linfócitos circulantes reconstituídos e a infecção por *T. gondii* tende a ser controlada com eficiência (Lejeune; Miro *et al.*, 2011).

Apesar da existência de casos raros em indivíduos imunocompetentes e dos casos em indivíduos imunossuprimidos, as consequências de maior gravidade da toxoplasmose ocorrem nos casos de transmissão congênita, quando o indivíduo é infectado ainda na barriga da mãe. Esses casos ocorrem, quase que exclusivamente, quando as mães têm a primo-infecção durante a gravidez, apesar de já terem sido descritos raros casos de transmissão do *T. gondii* para o feto em mães infectadas 20 anos antes (Silveira; Ferreira *et al.*, 2003).

O espectro de manifestações clínicas nos recém-nascidos é grande e inclui: mal formação do sistema nervoso central, hidrocefalia, calcificações intracranianas, retardo do desenvolvimento mental, epilepsia, RC, estrabismo, microftalmia, cegueira e até óbito (Kaye, 2011; Soares; Nasser *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a probabilidade de dano clínico ao bebê diminui de acordo com o trimestre do período gestacional em que a mãe se infecta, passando de 80% no primeiro trimestre para 10% no terceiro (Russo, 1994; Wallon; Gaucherand *et al.*, 2002).

A prevenção e controle da toxoplasmose agem no sentido de impedir as vias de transmissão do parasito. Dessa forma, deve-se evitar o consumo de carnes cruas ou mal cozidas, principalmente as de origem suína, ovina e caprina. O congelamento das carnes por vários dias, a temperaturas inferiores a -20°C antes de seu cozimento, também é prática recomendada, uma vez que os cistos teciduais, que podem estar presentes nesses alimentos, não resistem a tais condições. Consumir vegetais e frutas sempre cozidos ou, quando crus, descascá-los previamente. Evitar a ingestão de água não tratada (Tenter, 2009). Apesar do contato com felinos não ser um fator de risco por si só, devem-se usar luvas ao entrar em contato com solo e caixas ou bancos de areia que possam ser usados por felinos como local de defecação (Dabritz e Conrad, 2010).

Na grande maioria dos casos, os indivíduos imunocompetentes se recuperam dos sintomas sem necessidade de tratamento. Contudo, quando não há resolução dos sintomas, o tratamento é feito com pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico. Este também é recomendado para mulheres grávidas e recém nascidos. No entanto, o tratamento não elimina completamente o parasito.

1.2 A RESPOSTA IMUNE NA TOXOPLASMOSE

O estudo da toxoplasmose em modelo murino é a melhor ferramenta disponível de identificação de fatores regulatórios e determinantes da resistência do hospedeiro ao parasito. Ao longo de anos o estudo da infecção em modelo murino identificou, em linhas gerais, que a imunidade protetora na infecção por *T. gondii* envolve a ativação de receptores da imunidade inata presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC). Esse processo desencadeia a produção de IL-12, que por sua vez, leva à produção de IFN- γ . Este, por sua vez, induz uma série de mecanismos efetores no combate ao parasito (Gazzinelli, R T; Hieny *et al.*, 1993). Assim, nessa seção será descrito o sistema de reconhecimento do *T. gondii* no modelo murino que levam à ativação de sinais, que culminam com a geração da resposta protetora e dos mecanismos efetores finais de controle do parasita pelo hospedeiro.

1.2.1 O papel da resposta imune inata no modelo murino da infecção por *T. gondii*

O reconhecimento inicial de antígenos do parasito é feito por células APC, como DC e macrófagos (Hou; Benson *et al.*, 2011). Essas células expressam receptores que se ligam a moléculas estruturais conservadas presentes em micróbios, também chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Janeway, 1989). Existem inúmeras famílias de receptores de PAMPs. De especial interesse nesse trabalho, podem-se citar: i) receptores do tipo Toll (TLR) dependentes de MyD88; ii) receptores com domínio de ligação a nucleotídeo NOD (NLR) e; iii) receptores ionotrópicos de ATP extracelular, P2XR. Após o reconhecimento do antígeno, as APC se tornam ativadas e produzem IL-12 e quimiocinas que atuarão na ativação e recrutamento de células do sistema imune.

Na toxoplasmose murina, as DC são as principais produtoras de IL-12 e essa produção ocorre através da ativação de duas vias de sinalização (Liu; Fan *et al.*, 2006). A principal delas é dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a secundária envolve o receptor de quimiocina Cisteína-Cisteína (C-C) 5 (CCR5), através da transdução de sinal via proteína G (Aliberti, 2005; Aliberti; Jankovic *et al.*, 2004; Khan, I A; Thomas *et al.*, 2006).

Uma vez secretada, a IL-12 estimula a imunidade celular e induz, na imunidade inata, as células matadoras naturais (NK) a atuarem como fonte primária de IFN- γ durante a infecção (Korbel; Finney *et al.*, 2004). Este, por sua vez, induz uma série de mecanismos efetores nas células alvo incluindo a produção de óxido nítrico (NO), por macrófagos (Gazzinelli, R T; Hayashi *et al.*, 1994; Gazzinelli, R T; Wysocka *et al.*, 1994) espécies reativas de oxigênio (ROS) (Arsenijevic; Bilbao *et al.*, 2001) e a transcrição de membros da família das GTPases relacionadas à imunidade (IRG) nas diversas células do camundongo (Steinfeldt; Konen-Waisman *et al.*, 2010). As subseções seguintes tratarão das diferentes vias de ativação que participam da geração da resposta imune inicial à infecção pelo *T. gondii*.

1.2.1.1 A via dos receptores do tipo Toll

A família dos TLR constitui receptores transmembrana, que atuam tanto na superfície celular, como internamente, na superfície de endossomos. Até o momento, foram identificados 13 TLR em humanos e camundongos, identificados simplesmente de TLR1 a 13. No entanto, nem todos os TLR são expressos em ambas as espécies. É o caso dos TLR11, 12 e 13, inexistentes em humanos e presentes em camundongos, ou o TLR10, expresso em humanos, mas não em camundongos (Roach; Glusman *et al.*, 2005).

Os membros da família dos TLR são capazes de reconhecer PAMPs de natureza bioquímica ampla. Na toxoplasmose, os TLR2, TLR4 e TLR11 têm papel importante no reconhecimento de moléculas do parasito em camundongos. O TLR11 é localizado no endossomo e atua como o principal receptor da resposta imune inata contra o *T. gondii* e reconhece a profilina, uma pequena proteína ligadora de actina (Yarovinsky; Zhang *et al.*, 2005). Já os TLR2 e TLR4 reconhecem âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), isoladas da superfície celular do parasito (Debierre-Grockiego; Campos *et al.*, 2007).

Enquanto que o reconhecimento da profilina promove a produção de IL-12 de forma exclusivamente dependente de TLR11 e MyD88 (Plattner; Yarovinsky *et al.*, 2008), a ativação do TLR2 parece induzir, não a produção de IL-12, mas de TNF- α e NO. O papel da ativação do TLR4 na produção de citocinas durante a infecção ainda não está esclarecido (Debierre-Grockiego; Azzouz *et al.*, 2003; Mun; Aosai *et al.*, 2003).

Como ilustrado na Figura 4, a via de sinalização dos TLR conta com a participação de inúmeras proteínas e leva à produção de citocinas inflamatórias. De maneira geral, uma vez ativadas, os TLR recrutam as moléculas adaptadoras, como MyD88 e o adaptador contendo domínio TIR (TIRAP). Esses, por sua vez, ativam o fator nuclear - kappa B (NF- κ B) através da formação de complexos de diferentes quinases como: i) membros da família da quinase associada ao receptor de IL-1, (IRAKs); ii) fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF-) (TRAF6) e; iii) quinases inibidoras da quinase kappa B (IKKs) (Kawai e Akira, 2011). Uma vez ativado, o NF- κ B migra do citoplasma para o núcleo, onde induz: a transcrição de genes de moléculas coestimulatórias (e.g. CD40 e CD80); a produção de citocinas inflamatórias (e.g. IL-12, IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)) e; a produção de quimiocinas (e.g. CCL5 e proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1a)), todos importantes no controle da infecção por *T. gondii* (Aviles; Stiles *et al.*, 2008; Kawai e Akira, 2010).

Apesar de animais deficientes em TLR individuais não apresentarem aumento expressivo na susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii* (Debierre-Grockiego; Campos *et al.*, 2007), animais deficientes em MyD88, molécula que participa das vias de sinalização de todos os TLR à exceção do TLR3, são extremamente susceptíveis (Scanga; Aliberti *et al.*, 2002). Esses animais sucumbem dez dias após a infecção pela ausência de IL-12 e IFN- γ , essenciais na contenção da multiplicação do parasito (Scanga; Aliberti *et al.*, 2002).

Além de seu papel na via dos TLR, o MyD88 também age na via de sinalização dos receptores de IL-1 e IL-18 que, dessa forma, poderiam ter papel na resposta imune ao parasito. Contudo, estudos em animais deficientes nesses receptores mostraram que essas vias não participam na indução de resistência ao *T. gondii* (LaRosa; Stumhofer *et al.*, 2008). Isso indica, portanto, que os vários TLR devem atuar em conjunto no reconhecimento do parasito e indução da resposta efetora ante a infecção.

Em 2006 a proteína unc-93 homólogo B1 (UNC93B1) foi incluída na via dos TLR. Essa molécula é uma proteína transmembrana, presente no retículo endoplasmático (RE), que interage com os TLR3, 7 e 9 e regula o transporte desses receptores do RE, onde são produzidos, até os compartimentos endossômicos, onde exercem sua função (Figura 4)

(Brinkmann; Spooner *et al.*, 2007; Kim; Brinkmann *et al.*, 2008). Mutações no gene de UNC93B1, interrompem a produção de citocinas e a expressão de moléculas coestimulatórias induzidas em resposta à ativação dos TLR3, 7 e 9 (Tabeta; Hoebe *et al.*, 2006).

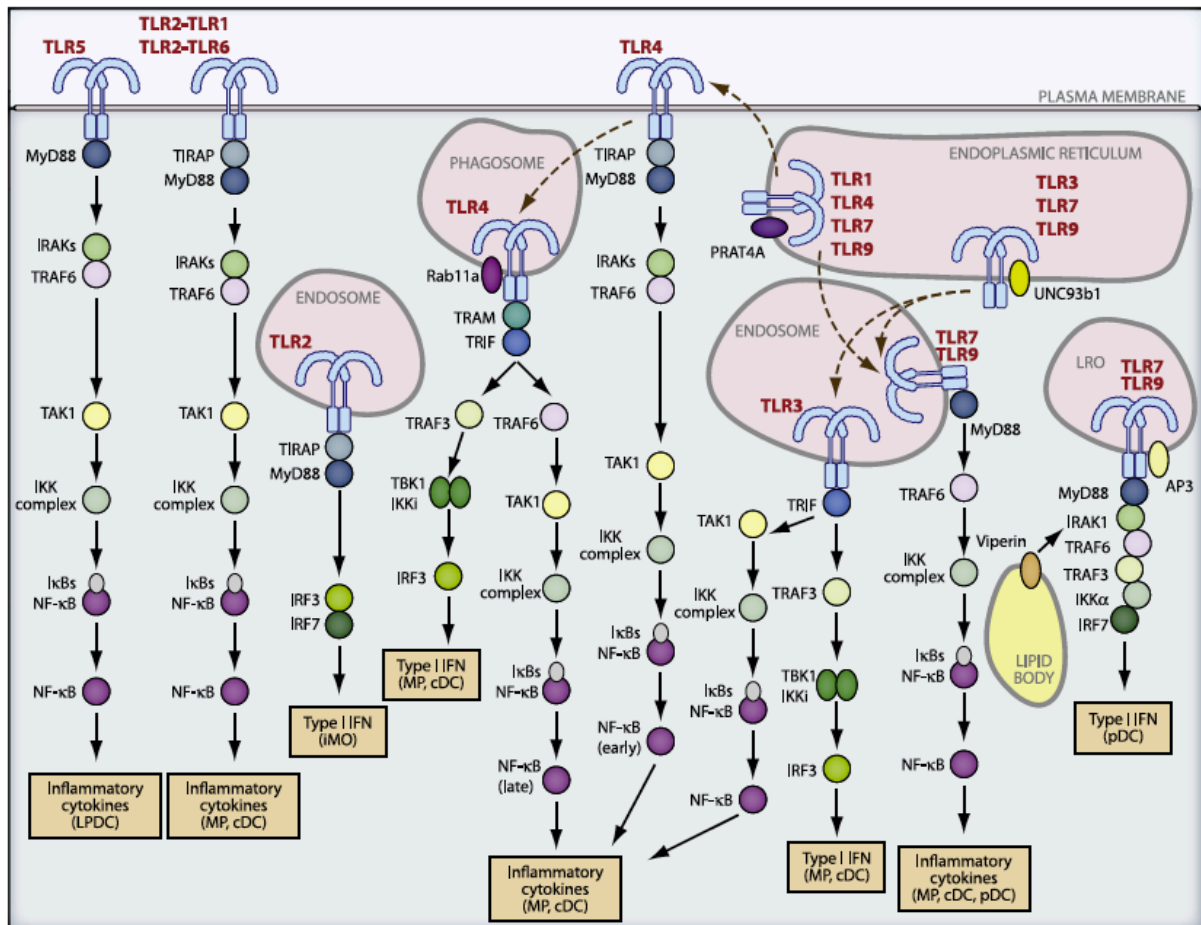


Figura 4: Sinalização e tráfego dos TLR. Os TLR são encontrados em vários tipos celulares, como macrófagos, DC e monócitos inflamatórios. A interação dos PAMPs com seus receptores, induz mudanças conformacionais nos TLR que proporcionam o recrutamento de proteínas adaptadoras como MyD88 e TIRAP. O TLR5 usa o MyD88 e ativa NF-κB através de complexos de quinases, o que resulta na indução de citocinas inflamatórias. Heterodímeros de TLR1/2 ou TLR2/6 também são expressos na superfície celular e induzem a ativação de NF-κB através do recrutamento de TIRAP e MyD88 em macrófagos e DC convencionais. O TLR4, expresso na superfície celular, transmite sinais para a fase inicial de ativação do NF-κB pelo recrutamento de TIRAP e MyD88. O TLR4 é então transportado para os fagossomos que apresentam bactérias em seu interior. Os TLR3, TLR7 e TLR9 estão localizados no RE e são transportados para o compartimento endossômico onde reconhecem seus ligantes. A molécula UNC93B1, interage com esses TLR no RE e medeia seu transporte. O TLR3 ativa a via dependente do adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN-β (TRIF) e induz IFN- tipo I e citocinas inflamatórias em macrófagos e DC (Kawai e Akira, 2011).

Em animais deficientes em UNC93B1, o funcionamento dos TLR3, 7 e 9 fica impedido. Como resultado, há diminuição da produção de IL-12, o que torna esses animais extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii* (Melo; Kasperkovitz *et al.*, 2010). Somado a isso, o transporte de TLR11 para os endossomos também é realizado pela proteína UNC93B1. Isso também contribuiria para o fenótipo de susceptibilidade apresentado pelos animais deficientes dessa proteína transportadora (Pifer; Benson *et al.*, 2011).

1.2.1.2 A via dos receptores do tipo NOD

Os receptores do tipo NOD (NLR) constituem um grande grupo de sensores intracitoplasmáticos, cujas funções envolvem a regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, a ativação o complexo do inflamassomo (receptores NLRP1, 3 e NLRC4), a ativação da via do NF κ B (receptores NOD1 e 2) e a indução de morte celular por apoptose ou piroptose. A família dos NLR é caracterizada pela presença de três domínios essenciais. O domínio C-terminal rico em leucina, uma porção central que apresenta um domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo (o domínio NOD) e um domínio N-terminal que pode ser de três tipos: i) de recrutamento e ativação de caspases (CARD), ii) domínio pirina ou iii) “baculovirus inhibitor-of-apoptosis repeats”. Apesar de sua localização intracelular, eles estão envolvidos no reconhecimento de antígenos provenientes de parasitos intra e extracelulares (Elinav; Strowig *et al.*, 2011).

São de especial interesse no estudo da toxoplasmose as subfamílias dos NOD (NOD2) e dos NLRP (NALP1) (Martinon; Burns *et al.*, 2002). Enquanto que os diversos membros da subfamília dos NLRP se aglomeram para formar complexos multiprotéicos chamados inflamassomos, os membros da subfamília NOD não participam da formação desses complexos (Meylan; Tschopp *et al.*, 2006).

O receptor NOD2 é expresso em várias células, entre elas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e DC, linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes e células epiteliais (Cooney; Baker *et al.*, 2010; Ekman e Cardell, 2010; Kobayashi; Chamaillard *et al.*, 2005; Marischen; Wesch *et al.*, 2011; Uehara; Fujimoto *et al.*, 2007). Ele reconhece a molécula de muramil dipeptídeo (MDP), encontrado em peptídeoglicanos de paredes celulares bacterianas.

Além desse agonista clássico, o receptor também se liga a moléculas de RNA de fita simples, provenientes de infecções virais (Figura 5) (Sabbah; Chang *et al.*, 2009).

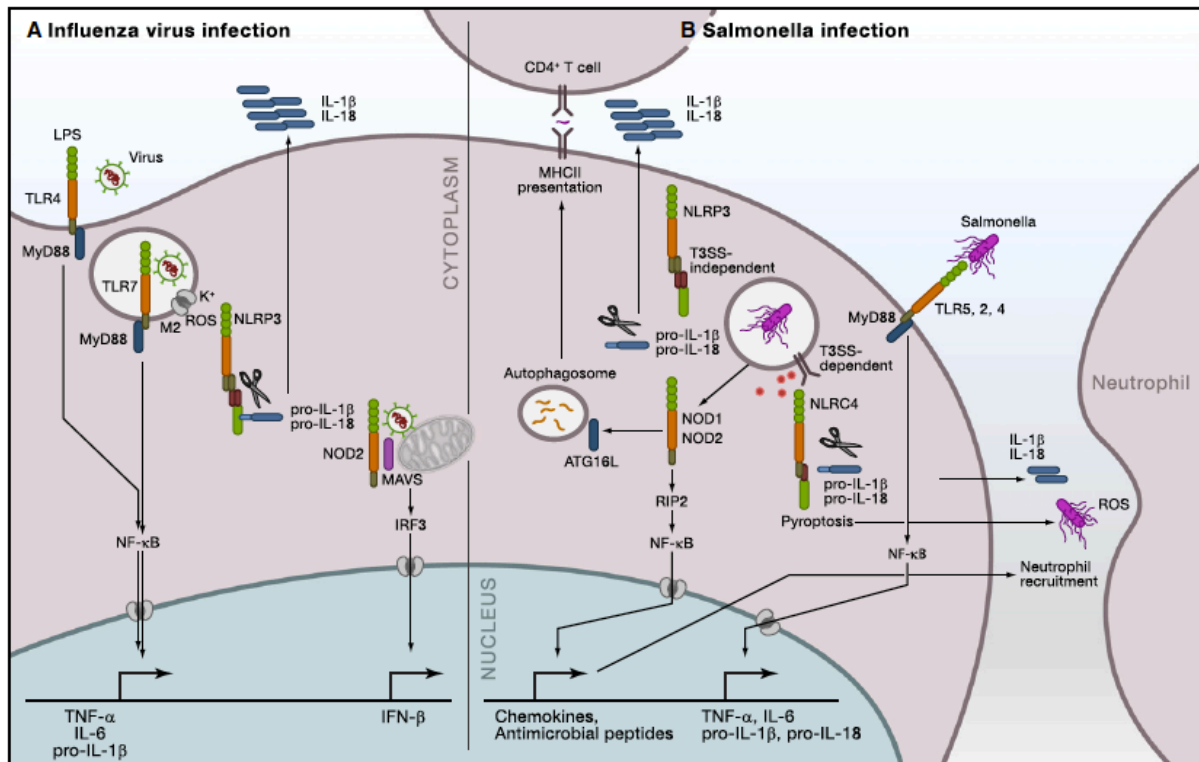


Figura 5: A via de sinalização cruzada dos NLR e outras vias de sinalização do sistema imune. (A) Infecção por vírus influenza. TLR4 reconhece produtos microbianos, enquanto que o vírus influenza é reconhecido pelo TLR7. Isso leva à ativação da transcrição de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, como pró-IL-1β, pró-IL-18, TNF-α e IL-6, de forma dependente de NF-κB (sinal I). A proteína M2 do vírus influenza ativa a formação de inflamasomos pelo NLRP3 que leva ao processamento de pró-IL-1β e pró-IL-18 (sinal II). NOD2 reconhece RNA fita simples viral estimulando IFN- tipo I. (B) Infecção por *Salmonella*. Os TLR2, TLR4 e TLR5 reconhecem moléculas provenientes da *Salmonella*, o que resulta na transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (pró-IL-1β, pró-IL-18, TNF-α e IL-6). A *Salmonella* intracelular ativa o NLRP3 e NLR4 que leva ao processamento de pró-IL-1β e pró-IL-18 às suas formas ativas. A ativação de NOD1 e NOD2 pela *Salmonella*, leva à secreção de quimiocina e recrutamento de neutrófilos (Elinav; Strowig *et al.*, 2011).

O papel do NOD2 na infecção por *T. gondii* ainda é controverso. Inicialmente, foi descrita a participação desse receptor na diferenciação de células T CD4⁺ em célula T auxiliares (Th) do tipo 1 (Shaw; Reimer *et al.*, 2009). O NOD2, dessa forma, estaria participando da ativação das células da resposta imune adquirida. Nos experimentos realizados por Shaw e colaboradores em 2009, os animais deficientes em NOD2, apresentam susceptibilidade à infecção, relacionada à diminuição da produção de IFN-γ por células T. No entanto, esse fenótipo não foi confirmado em estudo posterior realizado por nosso grupo (Caetano; Biswas *et al.*, 2011).

Já o receptor NALP1, quando ativado forma os inflamassomos que se constituem de aglomerados multiproteicos, compostos por, além de outras proteínas, vários tipos de caspases, enzimas proteolíticas que clivam e ativam as citocinas IL-1 β e IL-18 (Martinon; Burns *et al.*, 2002; Meylan; Tschopp *et al.*, 2006). O NALP1 é expresso em diversos tipos celulares, como células T e B, neurônios, monócitos e DC (Franchi; Warner *et al.*, 2009).

Assim como NOD2, NALP1 é capaz de reconhecer moléculas de MDP (Faustin; Lartigue *et al.*, 2007). Dessa forma, esses dois receptores podem agir conjuntamente na elaboração de uma resposta induzida por MDP. Enquanto a ativação de NOD2 leva à transcrição de pró-IL-1 β , de maneira dependente de NF- κ B, a interação de NALP1 com MDP regula a ativação da caspase 1, que por sua vez, promove a lise e ativação da pró-IL-1 β em IL-1 β (Hsu; Ali *et al.*, 2008).

É interessante notar que vários estudos mostram a interação da via de sinalização dos NLR com outras vias que levam à ativação de NF- κ B, incluindo a via dos TLR (Lee e Kim, 2007). Dependendo do tipo celular, agonistas de NOD podem modular a magnitude da produção de citocinas induzidas pelo reconhecimento de ligantes pelos TLR. Em DC, esses receptores atuam em sinergia, já que a estimulação de NOD leva a maior produção de citocinas em resultado do reconhecimento de ligantes pelos TLR (Fritz e Girardin, 2005). Em esplenócitos, no entanto, a estimulação de NOD leva a uma hiporesponsividade e diminuída estimulação da via induzida por NF- κ B (Watanabe; Kitani *et al.*, 2004).

Por ser um parasito intracelular obrigatório, acredita-se que o *T. gondii* possua moléculas que poderiam ser reconhecidas pelos NLR, como NOD2 e NALP1. No entanto, ainda não há dados experimentais que demonstrem a susceptibilidade à infecção pelo parasito em animais deficientes em NALP1. Porém, polimorfismos de base única (SNP) presentes nesse receptor foram associados à TO congênita em humanos (Witola; Mui *et al.*, 2011), assunto que será tratado pormenorizadamente mais adiante nessa tese.

1.2.1.3 Receptores ionotrópicos de ATP

Nucleotídeos extracelulares participam como sinais iniciais das vias de sinalização em uma variedade de processos biológicos, incluindo inflamação, reparação tecidual e

apoptose (Lenertz; Gavala et al., 2011). Os nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) são armazenados em grandes concentrações nas vesículas de células da resposta imune inata, como basófilos e mastócitos. Eles podem ser liberados no espaço extracelular mediante degranulação ou lise celular resultante de infecção, inflamação e dano tecidual (Lister; Sharkey *et al.*, 2007). Essas moléculas podem ser reconhecidas pela família de receptores purinérgicos (P2R) desencadeando uma variedade de eventos posteriores, inclusive a resposta inflamatória.

Essa família se divide em dois subgrupos: os receptores metabotrópicos P2RY e ionotrópicos P2RX. Enquanto os receptores P2RY apresentam 7 domínios transmembrana acoplados à proteína G, os P2RX são canais de cálcio íon dependente (North, 2002). De especial interesse na toxoplasmose, pode-se citar o receptor P2RX7, expresso por uma variedade de células, incluindo: monócitos, macrófagos, micróglia, entre outras (Aga; Johnson *et al.*, 2002; Bianco; Colombo *et al.*, 2009). A ativação de P2RX7 pela ligação ao ATP liberado nos sítios de infecção, estimula vários processos de sinalização, entre eles, o efluxo de K⁺ e influxo de Ca²⁺ e Na⁺, a via das proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPK), diversas caspases e a produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 6). Mediante estimulação prolongada, esse canal permite a formação de um poro não seletivo que possibilita a passagem de moléculas de até 900 Da (Aga; Johnson *et al.*, 2002; Lenertz; Gavala *et al.*, 2011). O papel dessas várias vias de sinalização iniciadas por P2RX7 na ativação de diversos fatores de transcrição é ainda pouco compreendida, mas acredita-se que o influxo de Ca²⁺ e a ativação da via das MAPK exerçam um papel preponderante (Lenertz; Gavala et al., 2011).

Na resposta contra o *T. gondii*, a ativação do P2RX7 pela estimulação com ATP, promove a eliminação do parasito em macrófagos, de maneira independente da produção de NO (Correa; Marques da Silva *et al.*, 2010; Lees; Fuller *et al.*, 2010). Além disso, a eliminação do parasito é concomitante à indução de apoptose nos macrófagos infectados (Lees; Fuller *et al.*, 2010). Apesar da participação de P2RX7 na eliminação do *T. gondii* ter sido estabelecida *in vitro*, animais deficientes nesse receptor não apresentam maior susceptibilidade à infecção em comparação com animais controles C57Bl6/J. Também não foram observadas diferenças patológicas ou de produção de citocinas inflamatórias,

como IFN- γ , IL-12, IL-1 β ou TNF- α quando comparados controles e nocautes para P2RX7. No entanto, os camundongos deficientes em P2RX7 possuem “background” genético C57Bl6/J, linhagem conhecidamente já suscetível à infecção por *T. gondii* (Miller, C M; Zakrzewski *et al.*, 2011).

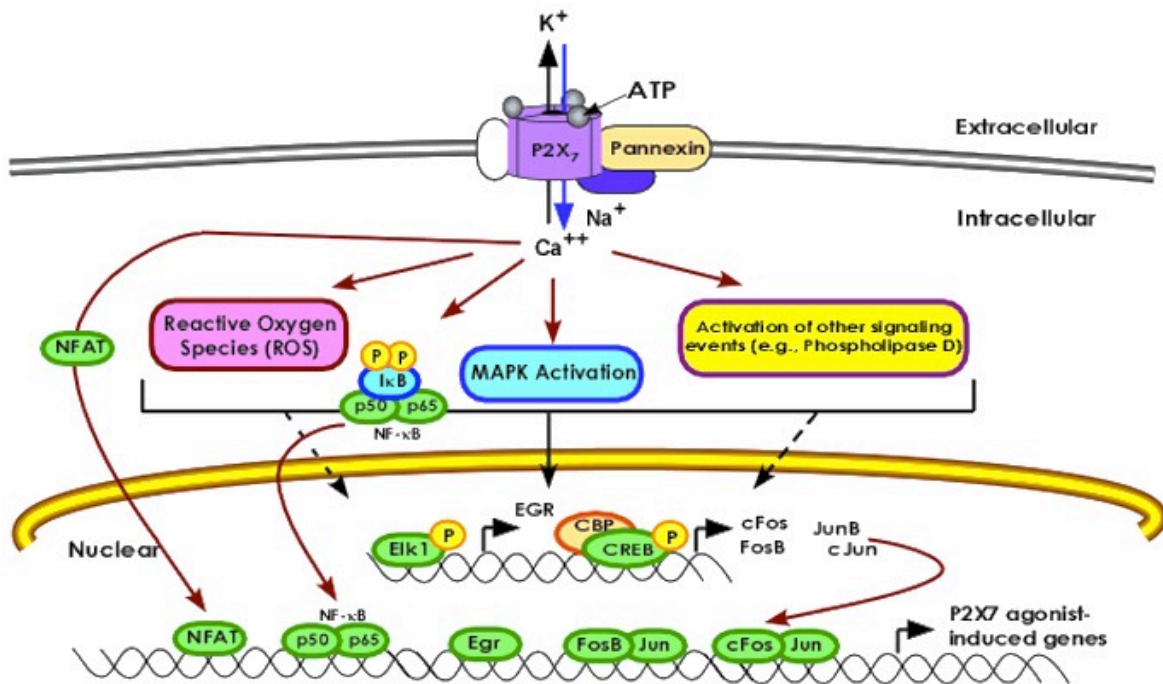


Figura 6: Resumo do mecanismo proposto para o controle dos reguladores transcricionais exercido por P2RX7. Estimulação do receptor ionotrópico de nucleotídeo P2RX7 com ATP extracelular induz o efluxo de K⁺ e influxo de Ca²⁺ e Na⁺. Após estimulação prolongada do receptor, há a formação de um poro não seletivo. A partir da ligação do agonista, P2RX7 pode iniciar múltiplos eventos de sinalização, tais como a produção de ROS, ativação da via das MAPK e a expressão e ativação de vários fatores de transcrição (em verde) (Lenertz; Gavala *et al.*, 2011).

Como visto até aqui, o reconhecimento do parasito pelos receptores da imunidade inata induzem a produção inicial de citocinas e quimiocina que proporcionam a formação de um microambiente essencial à ativação das células do sistema imune como um todo. No entanto, as células da resposta imune inata não atuam apenas na produção de mediadores inflamatórios, mas também tem papel essencial de apresentar os antígenos provenientes de patógenos para células T, processo que amplifica a resposta imune contra agentes agressores. As DC exercem o papel de apresentação de antígenos na infecção pelo *T. gondii* e, portanto, estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, articulando as duas frentes de resposta do hospedeiro para que atuem de

forma complementar no controle do parasito. A sessão seguinte tratará da resposta adquirida durante a infecção aguda pelo *T. gondii* no modelo murino.

1.2.2 A resposta imune adaptativa no modelo murino da infecção por *T. gondii*

A resposta imune adaptativa inclui alguns tipos celulares, dentre eles, pode-se citar: os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B. Essas células exercem papéis distintos e, na infecção pelo *T. gondii*, possuem diferentes níveis de importância dependendo do tempo de infecção (Holland, 2003; Holland; Lewis *et al.*, 2002). Enquanto as células T CD8⁺ são essenciais para a sobrevivência dos animais durante toda a infecção, as T CD4⁺ parecem atuar principalmente no controle dos cistos teciduais, que ocorre durante a fase crônica (Gazzinelli, R; Xu *et al.*, 1992). Os linfócitos B, por outro lado, tem a função de produzir anticorpos IgG2a, importantes na resistência do animal durante a fase crônica da infecção (Johnson e Sayles, 2002).

Ainda nas primeiras horas de infecção, as DC não infectadas primam as células T CD8⁺, via apresentação de antígenos cruzada (Goldszmid; Coppens *et al.*, 2009; John; Harris *et al.*, 2009). Além disso, mais tardiamente, DC infectadas são as únicas células capazes de apresentar antígenos de *T. gondii* para os linfócitos T CD8⁺ (Dzierszinski; Pepper *et al.*, 2007). Após o reconhecimento do antígeno, as células T CD8⁺ ativadas produzem citocinas essenciais para o estabelecimento de suas funções efetoras, como IFN- γ , TNF- α e IL-2 (John; Harris *et al.*, 2009).

As células T CD8⁺ podem exercer sua função através de dois mecanismos principais: a produção de citocinas e a eliminação direta de células infectadas através da sua ação citolítica, mediante contato célula-célula (Denkers e Gazzinelli, 1998). Mais especificamente na toxoplasmose, as células T CD8⁺ tem papel fundamental na produção de IFN- γ , essencial para a ativação de macrófagos que atuarão diretamente na eliminação dos taquizoítos durante a fase aguda (Gazzinelli, R T; Hakim *et al.*, 1991). A ação citolítica das células T CD8⁺ é, contudo, controversa. Animais deficientes em perforina sobrevivem à fase aguda da infecção e, além disso, a lise de células infectadas com taquizoítos, promovida por células T CD8⁺ *in vitro*, promove a liberação dos taquizoítos viáveis (Denkers; Yap *et al.*, 1997; Wang; Kang *et al.*, 2004). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que células T CD8⁺ desempenham papel fundamental na

eliminação direta dos cistos cerebrais, através do processo citolítico, dependente de perforina (Suzuki; Wang *et al.*, 2010). Nesse trabalho, animais deficientes de linfócitos que receberam, por transferência adotiva, células T CD8⁺ provenientes de animais deficientes em IFN- γ , eliminaram os cistos cerebrais com a mesma eficiência que os animais que receberam células T CD8⁺ capazes de produzir IFN- γ (Suzuki; Wang *et al.*, 2010). Portanto, o papel dessas células na eliminação de células-alvo infectadas, parece depender da forma de vida do parasito nelas contida.

Já os linfócitos T CD4⁺, orquestram a resposta imune adquirida, através da produção de citocinas regulatórias e inflamatórias, proporcionando equilíbrio entre regulação e ativação do sistema. A ação efetora das células T CD4⁺ é mediada por três subtipos principais: Th1, Th2 e Th17 (Zhu e Paul, 2008). Durante a infecção por *T. gondii*, há polarização da imunidade para a geração de forte resposta Th1. No entanto, é a ação combinada das diversas citocinas e quimiocinas produzidas pelas células T CD4⁺ que proporciona o equilíbrio entre eliminação do parasito e dano tecidual.

Na ausência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ há aumento da reativação da infecção crônica, com liberação de taquizoítos no cérebro e intensa necrose dos tecidos, semelhante à encontrada em animais com deficiência de IFN- γ (Gazzinelli, R; Xu *et al.*, 1992). No entanto, animais que não apresentam apenas células T CD4⁺ desenvolvem grande número de cistos cerebrais, produção de IFN- γ diminuída e não resistem à fase crônica (Johnson e Sayles, 2002). Isso demonstra, portanto, que os linfócitos T CD4⁺ contribuem para a produção de IFN- γ , apesar de não serem as principais produtoras dessa citocina durante a infecção. Isso também indicaria que essas células podem exercer outras funções, que não apenas a manutenção dos níveis de IFN- γ .

Até o presente momento, os mecanismos específicos de atuação das células T CD4⁺ ainda não foram totalmente esclarecidos. Elas poderiam atuar através da ação conjunta dos seguintes mecanismos: (i) produção de IFN- γ (Gazzinelli, R T; Hakim *et al.*, 1991); (ii) promoção de mudança de classe de anticorpo, para produção de IgG2a (Johnson e Sayles, 2002) e; (iii) produção de citocinas imunomoduladoras que controlam o dano tecidual (Jankovic; Kullberg *et al.*, 2007).

Além de sua função na produção de citocinas efetoras, as células T CD4⁺ induzem a mudança de isotipo nas células-alvo. Animais deficientes em células T CD4⁺ apresentam níveis de IgG2a, principal classe de anticorpo produzido na infecção por *T. gondii*, comparáveis aos de animais não infectados (Johnson e Sayles, 2002). Apesar desses anticorpos fornecerem proteção durante a fase crônica, sua produção, quando desacompanhada de altos níveis de IFN- γ e de células T CD8⁺, é insuficiente para proteger os animais da infecção (Johnson e Sayles, 2002).

Apesar da clara contribuição da IL-12 e IFN- γ na resposta imune protetora contra o parasito, na ausência de mecanismos regulatórios, a produção excessiva desses agentes chega a ser deletéria (Gazzinelli, R T; Wysocka *et al.*, 1996). As células Th1, induzidas na infecção produzem citocinas inflamatórias, mas, surpreendentemente, também são fonte de IL-10 (Jankovic; Kullberg *et al.*, 2007). Essa citocina modula a resposta imune e, inicialmente, pensava-se que as células Th2 eram sua fonte mais importante de produção. No entanto, na infecção pelo *T. gondii*, onde a polarização da resposta Th1 é muito potente, as próprias células Th1 são a principal fonte de IL-10 (Jankovic; Kullberg *et al.*, 2007).

Animais incapazes de produzir IL-10, apresentam dano tecidual extenso e, apesar de conseguirem controlar os níveis do parasito, sucumbem rapidamente à infecção (Gazzinelli, R T; Wysocka *et al.*, 1996). Uma vez produzida, a IL-10 não apenas controla a produção de IFN- γ pelas células Th1, como também inibe a produção de TNF- α , IL-1, IL-6, ROS e NO por macrófagos ativados, limitando sua ação e mantendo os níveis de destruição tecidual a patamares compatíveis com a sobrevivência do animal (Gazzinelli, R T; Hakim *et al.*, 1991; Jankovic; Kullberg *et al.*, 2007).

De maneira geral, portanto, as células Th1 exercem a função de controlar os níveis de parasitos através dos mecanismos já citados, bem como de modular a resposta imune de maneira a minimizar os danos ao hospedeiro. O papel de outras subpopulações de células T CD4⁺ no controle da infecção, como as Th17 e da própria IL-17 foram apenas timidamente investigados.

Animais que não expressam o receptor de IL-17 desenvolvem processo inflamatório limitado em todos os tecidos infectados, com pouco dano à mucosa intestinal e baixo número de cistos cerebrais (Guiton; Vasseur *et al.*, 2010; Kelly; Kolls *et al.*, 2005). A inflamação branda está associada à diminuída migração de neutrófilos para a mucosa intestinal durante a infecção aguda (Kelly; Kolls *et al.*, 2005) e diminuídos níveis de citocinas efetoras como IFN- γ , TNF- α e regulatórias, como IL-10 (Guiton; Vasseur *et al.*, 2010). Isso indica que a IL-17 e o recrutamento de neutrófilos estariam envolvidos em processos degenerativos, que levariam ao dano tecidual observado nos animais com expressão do receptor de IL-17.

A IL-17 pode ser produzida por células, tanto da imunidade inata como da adquirida. Durante a infecção oral, a produção de IL-17 no intestino do animal divide-se entre células NK, responsáveis por ~60%, e células Th17, responsáveis por ~35%. No entanto, em alguns órgãos do hospedeiro, como no cérebro, a produção de IL-17 se dá principalmente por células Th17 (Stumhofer; Laurence *et al.*, 2006). Independente da fonte celular, sua produção é estimulada por IL-6, TGF- β e IL-23, mas inibida por IL-27 e IL-2 (Passos; Silver *et al.*, 2010; Stumhofer; Laurence *et al.*, 2006).

Portanto, estabelecer o equilíbrio entre inflamação, controle do parasito e processo imunopatológico é essencial para o estabelecimento da resposta imune protetora com mínimo dano ao hospedeiro. O balanço desses processos é fundamental para a sobrevivência de ambos, parasito e hospedeiro, que durante milhares de anos, vêm refinando mutuamente a relação que estabelecem entre si.

1.2.3 A resposta imune em humanos: o comportamento da toxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos

Indivíduos imunocompetentes infectados pelo *T. gondii* também apresentam polarização da resposta para o tipo Th1, caracterizada por intensa produção de IFN- γ e manutenção dos níveis de IgG anti-*T.gondii* ao longo da vida (Johnson e Sayles, 2002).

Muito embora o TLR11 exerça um papel fundamental na indução da produção de IL-12 e IFN- γ durante a infecção por *T. gondii* em camundongos, ele não é funcional em humanos (Takeda e Akira, 2005; Yarovinsky; Zhang *et al.*, 2005). É interessante notar também,

que a principal família de proteínas envolvidas na resistência à infecção por *T. gondii* em camundongos, as GTPases reguladas por IFN- γ (IRG), também está ausente em humanos (Hunn; Feng *et al.*, 2011). Dessa forma, apesar da semelhança da infecção entre as duas espécies, a interação molecular entre parasito e hospedeiro envolve diferentes protagonistas e coadjuvantes, que, no entanto, ainda estão por ser estabelecidos.

Em indivíduos imunocompetentes, a resposta imune elaborada pelo hospedeiro é, na grande maioria dos casos, suficiente para conter a multiplicação do parasito a níveis não patológicos. No entanto, em indivíduos imunossuprimidos, como pacientes com AIDS, submetidos a terapia anti-rejeição de transplantes, e aqueles que apresentam síndrome de hiper IgM tipo 1 (HIGM1), a toxoplasmose é uma doença oportunista (Ajzenberg; Yera *et al.*, 2009). Na década de 80 e início dos anos 90, quando a terapia anti-retroviral ainda não estava disponível, a infecção por *T. gondii* era a causa mais comum de encefalite nos indivíduos HIV positivos, e, muitas vezes, levava o indivíduo à morte (Ajzenberg; Yera *et al.*, 2009). Felizmente, após a introdução do tratamento anti-retroviral, a prevalência de toxoplasmose cerebral diminuiu consideravelmente. No entanto, o estudo da resposta imune nos diversos grupos de indivíduos imunossuprimidos ainda é ferramenta importante no esclarecimento dos mecanismos de resposta envolvidos no controle do parasito.

Indivíduos com HIGM1 não expressam a forma funcional de CD40L, molécula presente na superfície de linfócitos T CD4⁺ ativados. Em decorrência disso, indivíduos com essa síndrome hereditária, apresentam baixa produção de citocinas Th1, como IL-12 e IFN- γ frente a infecção por *T. gondii* (Subauste; Wessendarp *et al.*, 1999). A produção dessas citocinas, juntamente com IL-2, também está diminuída em indivíduos HIV positivos antes mesmo de apresentarem diminuição da contagem de linfócitos T CD4⁺ (Gazzinelli, R T; Bala *et al.*, 1995).

Além dos linfócitos T CD4⁺, outras células do sistema imune que expressam a molécula CD4, podem ser alvos da infecção por HIV e, posteriormente, serem lisadas pelas células T CD8⁺ citolíticas. Isso inclui DC e macrófagos, componentes da imunidade inata, indispensáveis para apresentação de antígenos e controle do *T. gondii*, respectivamente

(Blanchet; Moris *et al.*, 2011). Dessa forma, o desenvolvimento da resposta Th1 é a forma de controle do parasito, tanto no modelo animal, como também em humanos.

1.3 ASPECTOS GERAIS DA TOXOPLASMOSE OCULAR

1.3.1 A toxoplasmose ocular no mundo e no Brasil

A toxoplasmose ocular (TO) ou, mais especificamente a retinocoroidite (RC), é a manifestação mais comum da infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocompetentes. O primeiro caso da doença foi descrito em 1923. Nessa época, acreditava-se que a TO, era decorrente apenas da transmissão congênita e o relato do primeiro caso da doença, decorrente da infecção adquirida só foi descrito, cerca de trinta anos depois, em 1952, em pacientes sabidamente soronegativos antes do desenvolvimento das lesões (Holland; Lewis *et al.*, 2002). Nos dias de hoje, a comunidade científica admite que a RC pode decorrer de ambas as formas de infecção (Balasundaram; Andavar *et al.*, 2010).

De uma forma geral, a manifestação da doença ocular nos indivíduos que adquirem o parasito pela via congênita é mais frequente que naqueles que a adquirem após o nascimento (Holland, 2003). Na França, 18,9% das crianças nascidas com toxoplasmose desenvolvem RC até 12 anos de idade (Faucher; Garcia-Meric *et al.*, 2012). Entretanto, em outros países, como no Brasil, a prevalência é ainda mais alta. No estado de Minas Gerais, a TO de origem congênita chega a acometer cerca de 80% dos recém-nascidos soropositivos no estado (Vasconcelos-Santos; Machado Azevedo *et al.*, 2009). Já em um estudo populacional, realizado na localidade de Melquíades, no estado mineiro, a prevalência de TO acomete 12,5% dos soropositivos, apesar de não ter sido identificada a via de infecção (Portela; Bethony *et al.*, 2004). No Sul do país, onde a maioria dos casos decorre de infecção adquirida, a prevalência é de aproximadamente 18% (Glasner; Silveira *et al.*, 1992; Silveira; Belfort *et al.*, 1988). Taxas similares a essa foram reportadas em várias regiões epidêmicas de infecção por *T. gondii* (de Moura; Bahia-Oliveira *et al.*, 2006).

Além de mais prevalente, no Brasil, a doença ocular também apresenta-se de forma mais grave, com lesões relativamente maiores, mais numerosas, e, geralmente, causando

maior dano ao indivíduo afetado, quando comparados aos casos da doença relatados na França e Estados Unidos (Gilbert; Freeman *et al.*, 2008). Essas diferenças não podem ser explicadas exclusivamente por maiores prevalências da infecção no Brasil, uma vez que a França apresenta prevalência de toxoplasmose semelhante às brasileiras (Bahia-Oliveira; Jones *et al.*, 2003). Dessa forma, atribui-se essas diferenças à distribuição de cepas geneticamente diversas, mais virulentas no Brasil em relação às cepas circulantes na França (Ajzenberg; Cogne *et al.*, 2002). Além disso, como já foi mencionado, o status imune do hospedeiro, bem como seu “background” genético podem contribuir para o desenvolvimento diferencial da TO observados entre França e Brasil (Ajzenberg; Yera *et al.*, 2009; Howe; Honore *et al.*, 1997; Jamieson; Cordell *et al.*, 2009; Khan, A; Jordan *et al.*, 2006; Mets; Holfels *et al.*, 1996).

1.3.2 Manifestações da toxoplasmose ocular

Quando infectados, cerca de 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes nunca chegarão a desenvolver TO. Porém, naqueles que a desenvolve, várias manifestações clínicas podem ser observadas, dentre as mais frequentes: RC, estrabismo, microftalmia, catarata e miopia (Holland; Lewis *et al.*, 2002).

De especial interesse nesse trabalho, a RC pode ser causada em decorrência de ambas as rotas de infecção e seu surgimento pode se dar meses ou mesmo anos após a infecção (Holland, 1999; Silveira; Belfort *et al.*, 2001). O desenvolvimento tardio das lesões não é um fenômeno totalmente compreendido, mas há três hipóteses possíveis para explicá-lo, são elas: i) persistência e reativação dos cistos com diferenciação de bradizoítos em taquizoítos e liberação destes em áreas previamente morfologicamente normais da retina, desde o momento da infecção; ii) reativação da doença em outros locais e disseminação dos taquizoítos para a retina e; iii) reinfecção do indivíduo por uma cepa diferente (Holland, 2003).

Uma vez infiltrados na região ocular, os taquizoítos recém chegados, ou aqueles provenientes de um cisto local reativado, provocam um processo inflamatório intenso, que leva à turvação do humor aquoso e ao dano ao tecido da retina e coróide. Na grande maioria dos casos de TO, o indivíduo desenvolve apenas uma lesão de diâmetro inferior a 1000 μm , localizada no polo posterior do olho (Figura 3b, seta branca) (Holland; Lewis

et al., 2002). Porém, episódios de recorrência, ou reativação da RC previamente estabelecida são característicos da TO (Figura 3b, seta preta). Estas normalmente ocorrem nas bordas das lesões anteriores, formando lesões satélites adjacentes, mesmo em indivíduos imunocompetentes (Holland, 2004). Apesar de poderem apresentar várias lesões, normalmente esses indivíduos apresentam apenas um foco de onde se desenvolvem todas elas. Após cerca de 6 semanas, a inflamação cessa e a lesão ativa cicatriza-se, com ou sem o tratamento específico (Holland, 2003). Indivíduos imunossuprimidos, por outro lado, podem apresentar extensas áreas de necrose e vários focos de RC, que podem acometer ambos os olhos (Holland, 2004).

Embora sejam causadas por ambas as vias de infecção, dados demonstram que há diferenças entre a RC decorrente de cada via. Cerca de 60% das RC decorrentes da infecção congênita se localizam na região macular. Essa taxa é substancialmente maior do que a esperada, caso as lesões se localizassem ao acaso, principalmente tendo-se em vista que a região ocupada pela mácula constitui apenas 5% da retina (Mets; Holfels *et al.*, 1996). Em casos de TO adquirida, apesar de também serem frequentes lesões na região macular, não se observa predominância de determinada região específica onde essas lesões se localizam (Holland, 2004).

Apesar de inicialmente acreditar-se que haveriam diferenças morfológicas entre os casos de RC decorrentes de cada via de infecção, a concepção atual é a de que a distinção clínica precisa é improvável (Holland, 2004). Esses aspectos da TO são, portanto, bastante controversos e são tema de intenso debate entre oftalmologistas especialistas em uveítes.

As sessões seguintes tratarão dos mecanismos de resposta imune envolvidos no modelo animal e em humanos, bem como a susceptibilidade genética desses últimos ao desenvolvimento de lesões oculares em decorrência da infecção pelo parasito.

1.4 A RESPOSTA IMUNE NA TOXOPLASMOSE OCULAR

1.4.1 O modelo animal

O olho é um órgão imuno-privilegiado, que, em circunstâncias normais, apresenta mecanismos para proporcionar tal condição imunológica. Dentre eles, está a produção constitutiva de TGF- β e expressão de baixos níveis de MHC classe I que atuam de forma a inibir a resposta a mediadores inflamatórios e evitar o reconhecimento de elementos da resposta imune (Streilein; Ksander *et al.*, 1997). As células da retina também expressam constitutivamente altos níveis de ligante de Fas (FasL). Isso induz a apoptose e regula negativamente a função de células T e NK (Hori; Vega *et al.*, 2010; Lyons; Anthony *et al.*, 2001; Streilein; Ksander *et al.*, 1997). Agindo em conjunto, esses fatores previnem a destruição dos tecidos oculares decorrente de processos inflamatórios.

Por outro lado, a existência desses mecanismos anti-inflamatórios e, de certa forma, imunossupressores, proporciona um ambiente imunológico favorável à sobrevivência e multiplicação do *T. gondii*. O controle do parasito no olho é, portanto, um processo complexo, já que muitos dos mecanismos requeridos para o controle podem também interferir na condição de imuno-privilegio e ocasionar o dano tecidual.

A infecção por *T. gondii* altera o estado de imuno-privilegio ocular, uma vez que as células do olho passam a expressar a molécula MHC classe I, IL-6 e TGF- β e, adicionalmente, fatores pró-inflamatórios, como TNF- α e síntese de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esses mediadores têm papel protetor durante a TO e, na ausência de alguns deles, como IL-6, TNF- α e NO, produzido pela iNOS, os animais apresentam maior dano da retina, que correlaciona com maiores números de parasitos (Hayashi; Chan *et al.*, 1996; Lyons; Anthony *et al.*, 2001).

Refletindo o que ocorre no modelo sistêmico de infecção, a indução da resposta Th1, com envolvimento de células T CD4⁺ e CD8⁺ é essencial para a proteção dos animais quanto ao desenvolvimento de TO (Gazzinelli, R T; Brezin *et al.*, 1994; Gazzinelli, R T; Hakim *et al.*, 1991). A administração de anticorpos anti-CD4, anti-CD8 ou anti-IFN- γ resulta em aumento do número de lesões oculares e da gravidade do processo

inflamatório em animais susceptíveis a infecção com a cepa ME49 de *T. gondii* (C57Bl6) (Gazzinelli, R T; Brezin *et al.*, 1994). No entanto, de maneira interessante, animais nocautes em CD4 desenvolvem no olho, um processo inflamatório brando e, mesmo com a mínima produção de IFN- γ e TNF- α , apresentam níveis de parasito semelhantes aos encontrados nos animais C57BL/6, susceptíveis à infecção com a cepa RH (Lu; Huang *et al.*, 2004). Ao contrário, em animais deficientes da molécula CD8 o processo inflamatório é intenso, com extensa área de necrose da retina com maior contagem de parasitos, em relação ao grupo controle e aos deficientes em CD4 (Lu; Huang *et al.*, 2004). Isso indica que, enquanto as células T CD8⁺ seriam essenciais no controle do parasito, as células T CD4⁺ seriam as principais produtoras de IFN- γ e TNF- α , que, quando em excesso, poderiam levar ao processo imunopatológico (Lu; Huang *et al.*, 2004).

As células T que infiltram o olho durante o processo inflamatório desencadeado pela presença do parasito são altamente especializadas, ativas e ágeis. Essas células, além das citocinas efetoras, expressam CXCR3, um receptor de quimiocina relacionado ao tráfego de células Th1 aos locais de infecção. As quimiocinas que se ligam a esse receptor, como CXCL9 e CXCL10 têm expressão aumentada na retina infectada. A CXCL10 em especial, é responsável pela manutenção desses linfócitos no sítio de infecção. O tratamento com anticorpo anti-CXCL10 leva à diminuição dos números de células T CD4⁺ e CD8⁺, diminuição da expressão de IFN- γ na retina o que acarreta o aumento da replicação de parasitos e da patologia ocular. Dessa forma, a manutenção das células T CD4⁺, produtoras de IFN- γ e TNF- α , e das células T CD8⁺ produtoras de granzima B e IFN- γ no local da infecção, são essenciais no controle do parasito (Norose; Kikumura *et al.*, 2011).

Na TO, assim como no modelo de infecção sistêmica, na ausência de mecanismos imunomodulatórios, a resposta Th1 exacerbada pode causar dano tecidual. Isso ocorre, por exemplo, em animais deficientes em IL-10, onde há exacerbção da produção de IFN- γ e TNF- α , o que leva a intensa necrose dos tecidos, sem contudo, haver controle da infecção (Lu; Huang *et al.*, 2003).

Outro meio de controle da ativação de células T CD4⁺ ocorre através da regulação da expressão da molécula de MHC classe II e moléculas co-estimulatórias. Na retina de animais infectados, células locais e leucócitos infiltrados têm expressão aumentada de

MHC classe II. Contudo, essas células não expressam moléculas co-estimulatórias, membros da família B7, agentes clássicos na ativação das células T, mas sim PD-L1, molécula que tem sido relacionada à supressão da atividade de linfócitos T. Dessa forma, células da retina de animais infectados com *T. gondii* são capazes de suprimir a ativação das células T de forma dependente de PD-L1. A expressão de ambas as moléculas é dependente da produção de IFN- γ (Charles; Joshi et al., 2010).

Portanto, apesar do olho ser um órgão imuno-privilegiado, o que dificulta a ação efetora das células da resposta imune, o hospedeiro murino lança mão de mecanismos similares de controle do parasito tanto na região ocular quanto nos diversos órgãos do corpo.

1.4.2 A resposta imune em humanos

A avaliação do processo imunopatológico que acarreta o desenvolvimento de RC é de difícil estudo, uma vez que o tecido ocular é limitado e a retirada de biópsias inviabilizaria o estudo funcional do órgão. Dessa forma, análises histopatológicas são realizadas em olhos de fetos e crianças com toxoplasmose congênita coletados *post mortem*. Assim, em um estudo realizado por Roberts e colaboradores, em 2001, foi avaliado o globo e o tecido ocular de crianças e fetos que vieram a óbito em decorrência de complicações da toxoplasmose congênita. Nesse trabalho, foram observados infiltrado moderado de T CD8⁺, altos números de células T CD4⁺, além de parasitos extra e intracelulares, com ausência de cistos. Na grande maioria dos olhos não foram identificados linfócitos B ou macrófagos (Roberts; Mets *et al.*, 2001).

Em humanos, as células T CD4⁺ parecem ter papel fundamental na resposta imune contra o parasito. Análises sistêmicas realizadas com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) identificaram a produção de IL-2 e IFN- γ por clones de células T CD4⁺ específicos para *T. gondii*, isolados do sangue de pacientes soropositivos para toxoplasmose (Saavedra; de Meuter et al., 1991). Também foi demonstrado que as células T CD4⁺ isoladas de pacientes com toxoplasmose assintomática, apresentam, em sua maioria, perfil Th0, uma vez que sub estímulo com antígenos do parasito, essas células produzem níveis similares de IL-4 e IFN- γ (Prigione; Facchetti et al., 2000). Durante a infecção aguda, há diminuição da razão celular T CD4⁺/CD8⁺ e aumento

significativo de células T expressando o TCR $\gamma\delta$. As células T CD4⁺ responsivas ao taquizoíto apresentam perfil Th0 ou Th1, com produção de grandes quantidades de IFN- γ (Prigione; Chiesa *et al.*, 2006).

Além da análise sistêmica das células que atuam nos diferentes momentos da infecção pelo *T. gondii*, também são feitas análises de citocinas do humor aquoso (líquido que preenche a câmara anterior do olho – Figura 3a) de pacientes com AOT. A análise dessas amostras evidencia a produção de um conjunto de citocinas de funções inflamatórias, e regulatórias, tais como: IL-12, IL-5, IL-4, IL-10, IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α , entre outras (Lahmar; Abou-Bacar *et al.*, 2009).

1.4.3 Susceptibilidade genética em humanos

A susceptibilidade genética do hospedeiro pode afetar a resposta imune ao parasito, influenciando o desenvolvimento da TO. O primeiro trabalho abordando este tema data de 1999, quando o Mack e colaboradores reportaram a associação do alelo DQ3 do HLA-DQ em crianças com hidrocefalia decorrente da infecção congênita (Mack; Johnson *et al.*, 1999). Porém, foi em 2008 que estudos de associações de polimorfismos genéticos e susceptibilidade à TO começaram a ser publicados com maior intensidade.

A exploração desse tema é ainda tímida e se concentra na análise de três grupos de genes: i) citocinas importantes no controle da infecção (IL-1A, IL-10, TNF- α e IFN- γ); ii) receptores e moléculas participantes da transdução de sinal na resposta imune inata (TLR2, TLR5, TLR9, NALP1, P2RX7, IRAK4) e; iii) genes que participam do desenvolvimento no olho do embrião humano (COL2A1, ABCA4). Um resumo dos achados no estudo de polimorfismos associados com a TO em humanos pode ser encontrado na Tabela 2, que inclui os trabalhos publicados de 2008 a Fevereiro de 2012.

Polimorfismos nos genes de TNF- α , IL-10, IL-1A foram avaliados em 2008 por Cordeiro e colaboradores que encontraram evidências de associação genética em polimorfismos de alguns desses genes ao desenvolvimento de TO (Cordeiro; Moreira *et al.*, 2008a; Cordeiro; Moreira *et al.*, 2008b, c). Esses estudos foram realizados em 100 pacientes apresentando TO e, como controle, foram utilizados 100 indivíduos infectados soropositivos, mas sem sinais de lesões ocular. Os autores encontraram evidências de

associação do alelo A do polimorfismo -1082G/A, no gene de IL-10 com a TO e do alelo T e genótipo CT do polimorfismo -889C/T no gene de IL-1A, com recorrência de TO (número de casos = 45 e controle = 14). Já para o gene de TNF- α , o polimorfismo avaliado, -308G/A não foi associado com o desenvolvimento de TO em nenhuma das análises. Contudo, é importante ressaltar que nenhum desses trabalhos reporta os níveis dessas citocinas no soro ou no humor aquoso dos pacientes. Portanto, se esses polimorfismos influenciam a produção das citocinas e a forma como influenciam o desenvolvimento da TO ainda estão por ser estabelecidos.

Tabela 2: Genes associados ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular reportados por estudos publicados entre 2008 e Fevereiro de 2012 (Continua).

Referência	Genes	SNPs em associação com TO	Amostra (n e tipo)	Ensaio funcionais
(Cordeiro; Moreira <i>et al.</i> , 2008a)	IL-10	-1082G/A	100/100 caso/controle	NA
(Cordeiro; Moreira <i>et al.</i> , 2008b)	IL-1A IL-1B	-889C/T +3954C/T	45/14 caso/controle	NA
(Cordeiro; Moreira <i>et al.</i> , 2008c)	TNF- α	-	100/100 caso/controle	NA
(Jamieson; de Roubaix <i>et al.</i> , 2008)	COL2A1 ABCA4	rs2276455 rs1793958 rs6823 rs2070739 rs2276454 rs1635544 rs3803183 rs2997633 rs3112831 rs1761375 rs952499	457 pares mãe/filho UE; 138 trios EUA	NA NA
(Albuquerque; Aleixo <i>et al.</i> , 2009)	IFN- γ	+874T/A	34/134 caso/controle	NA
(Peixoto-Rangel; Miller <i>et al.</i> , 2009)	TLR2 TRL4 TLR5 TLR9	- - - rs352140	68 trios BR	NA
(Jamieson; Peixoto-Rangel <i>et al.</i> , 2010)	P2RX7	rs1718119; rs3751143	149 trios EUA; 68 trios BR	Macrófagos humanos portadores do alelo C têm menor eficiência em eliminar o parasito (Lees; Fuller <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 2: Conclusão.

Referência	Genes	SNPs em associação com TO	Amostra (n e tipo)	Ensaio funcionais
(Witola; Mui <i>et al.</i> , 2011)	NALP1	rs8081261; rs11652907	124 trios EUA	Deficiência em produção de IL-1 β , IL-18 e IL-12 em monócitos humanos infectados com <i>T. gondii</i> .
(Bela; Dutra <i>et al.</i> , 2012)	IRAK4	rs1461567; rs4251513	149 trios EUA	Deficiência na ativação de linfócitos B e T, formação dos centros germinativos e produção de IL-12 e IFN- γ em camundongos deficientes em IRAK4.

¹Número total de indivíduos coletados divididos por faixa etária; ²Percentual de indivíduos coletados em relação ao total cadastrado. SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças; M: Masculino, F: Feminino; TO: Toxoplasmose ocular. UE: União Européia; EUA: Estados Unidos da América; BR: Brasil.

Em 2009, Albuquerque e colaboradores avaliaram o polimorfismo +874T/A no gene que codifica para IFN- γ em 34 indivíduos com TO e 134 controles. Nesse trabalho, o genótipo AA foi encontrado com maior frequência nos indivíduos com RC, em comparação com os indivíduos controle (Albuquerque; Aleixo *et al.*, 2009). Mais uma vez, ensaios funcionais para elucidar como esse polimorfismo estaria atuando na produção de IFN- γ ou como ele contribuiria para o desenvolvimento das lesões oculares não foram objetivos do estudo.

Além de genes que codificam para citocinas, genes de receptores da imunidade inata também estão associados à toxoplasmose congênita. Em um estudo realizado com trios pais/casos de TO foi encontrada associação entre o polimorfismo de base única (SNP) rs352140 no gene do TLR9 e o desenvolvimento de RC. Nesse trabalho, também foram investigados polimorfismos nos genes de TLR2, 4 e 5, porém sem associação com a doença (Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009).

Coortes específicas para estudos de associação genética na TO congênita foram desenvolvidas na Europa e Estados Unidos. A coorte americana, chamada de “National Collaborative Chicago-based congenital toxoplasmosis study” (NCCCTS) constitui-se de 176 trios pais/caso contendo crianças com toxoplasmose congênita com ou sem manifestação ocular e/ou cerebral. A coorte europeia, chamada de “European multicentre study on congenital toxoplasmosis” (EMSCOT) constitui-se de 457 pares de

mãe/caso de crianças com toxoplasmose congênita com ou sem manifestação ocular (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008).

A coorte NCCCTS é fonte de estudos de associação de polimorfismos em diversos genes, como IRAK4, NALP1, P2RX7, COL2A1 e ABCA4 com a toxoplasmose congênita. Dados de nosso grupo associam dois polimorfismos do gene de IRAK4 (rs1461567 e rs4251513) com a toxoplasmose congênita. Nesse estudo também foi realizada a caracterização funcional do gene IRAK4 em camundongos deficientes para essa molécula. Esses animais apresentam deficiência em ativação de linfócitos B, T e DC, formação de centros germinativos e produção de IL-12 e TNF- α (Bela; Dutra *et al.*, 2012).

Também foram estudados polimorfismos no gene P2RX7 em 138 trios provenientes do NCCCTS. Nesses pacientes o SNP rs1718119 está associado com manifestações da infecção congênita, como comprometimento cerebral e ocular. Esse polimorfismo acarreta uma mudança de aminoácido de treonina para alanina na posição 348 no receptor P2RX7 (Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010). Posteriormente, foi descrito que macrófagos humanos, portando o alelo C para o SNP rs3751143, que acarreta perda de função do receptor P2RX7, são menos eficientes em eliminar o parasito, em comparação com macrófagos humanos contendo o alelo A (Lees; Fuller *et al.*, 2010).

Em 2011 os polimorfismos rs8081261 e rs11652907 no receptor NALP1 também foram associados ao desenvolvimento de TO na coorte NCCCTS. Ensaio funcionais com macrófagos humanos deficientes em NALP1 apresentaram morte celular acelerada quando infectados com *T. gondii* e também menor produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e IL-12, importantes no controle da infecção por *T. gondii* (Witola; Mui *et al.*, 2011).

Apesar de polimorfismos nos genes de moléculas do sistema imune estarem associados ao desenvolvimento de TO, os casos mais graves ocorrem quando a mãe se infecta durante o primeiro trimestre de gravidez, ocasião em que a imunidade do bebê ainda não foi estabelecida. Genes que atuam no desenvolvimento do feto poderiam, portanto, influenciar os casos de TO. Em 2008 Jamieson e colaboradores reportaram evidências de associação de dois genes (COL2A1 e ABCA4), importantes no processo de desenvolvimento ocular, na manifestação do fenótipo clínico da toxoplasmose congênita

(Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008). O gene ABCA4 codifica uma proteína translocadora de lipídios com consumo de ATP. Acredita-se que sua função na retina seja de translocar lipídios retinóides importantes para o processo de formação de opsinas, lipoproteínas importantes na detecção de estímulos luminosos. Mais de 500 mutações nesse gene estão associadas a inúmeras desordens visuais de caráter hereditário (Pollock e Callaghan, 2011). Variantes nesse gene foram associadas ao comprometimento cerebral e ocular (rs2997633, rs3112831, rs1761375 na coorte EMSCOT e rs952499 em NCCCTS) na toxoplasmose congênita (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008).

O gene COL2A1, por sua vez, codifica colágeno tipo II, uma proteína estrutural, produzida por células do tecido conjuntivo e presente principalmente em cartilagens. Polimorfismos nesse gene estão associados à síndrome de Stickler, na qual os indivíduos apresentam degeneração da retina e anormalidades no vítreo, de forma congênita (Rose; Levy *et al.*, 2005). No trabalho realizado por Jamieson e colaboradores em 2008, foram encontradas evidências de associação de polimorfismos nesse gene (rs2276455, rs1793958 na população EMSCOT e rs6823, rs2070739, rs2276454, rs1635544, rs3803183 em NCCCTS) com a TO (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008).

Nessa tese, demonstramos que a geração de resposta Th1 é de vital importância para o controle do parasito. No entanto, sabe-se que a falta de mecanismos de imunorregulação, tem papel importante no controle do processo imunopatológico, minimizando os danos ao hospedeiro. É importante observar que outros tipos celulares, como células Th17 ainda não estudadas na TO, podem ter papel, não no controle da infecção, mas na geração do processo imunopatológico. Sabe-se também que fatores genéticos alteram a susceptibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento patológico da toxoplasmose congênita.

2 HIPÓTESE DE TRABALHO E OBJETIVOS

Nessa tese, hipotetizamos que polimorfismos nos genes da resposta imune alteram a imunologia do hospedeiro deixando-o mais susceptível ao desenvolvimento da TO adquirida. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi a avaliação da associação de polimorfismos genéticos presentes em genes da resposta imune com o desenvolvimento da toxoplasmose ocular, bem como a caracterização da resposta imune adaptativa em indivíduos apresentando toxoplasmose ocular ativa e crônica. Os objetivos específicos desse trabalho foram:

2.1- Determinação da soroprevalência da toxoplasmose e da prevalência de TO no Vale do Jequitinhonha;

2.2- Construção dos pedigrees das populações provenientes das três vilas do Vale do Jequitinhonha;

2.3- Análise de polimorfismos de base única (SNPs) em genes candidatos do sistema imune inato na associação com o desenvolvimento de TO;

2.4- Caracterização da resposta imune *T. gondii*-específica:

Produção de citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17 em PBMCs de indivíduos com toxoplasmose ocular crônica, ativa e assintomática;

Capacidade proliferativa *T. gondii*-específica de linfócitos T CD4⁺ T CD8⁺, em PBMCs de indivíduos com toxoplasmose ocular crônica e assintomática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E PACIENTES

As amostras utilizadas neste trabalho foram divididas de acordo com três diferentes etapas do projeto. A primeira constituiu-se na análise populacional, na qual foram determinadas as prevalências da toxoplasmose e da TO e construção dos pedigrees na população proveniente do Vale do Jequitinhonha, MG. A segunda constituiu-se na genotipagem e análise genética dos SNPs candidatos em um grupo de indivíduos com COT e controles provenientes do Vale do Jequitinhonha e de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009). A última etapa envolveu a avaliação da resposta imune *T. gondii*-específica, nos indivíduos soropositivos para toxoplasmose assintomáticos, com COT, AOT e doadores saudáveis (soronegativos para toxoplasmose). Esses indivíduos foram provenientes das populações do Vale do Jequitinhonha e da região metropolitana de Belo Horizonte. Essas populações serão descritas pormenorizadamente nas subseções seguintes.

Os protocolos de pesquisa que envolvem a coleta de sangue de doadores foram aprovados pelos Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CONEP – número de registro 13.368) e Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz (CEP - CPqRR – FIOCRUZ). O protocolo de pesquisa que envolve a coleta de sangue e humor aquoso dos pacientes com TO ativa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG, número de registro: 236/11). Os termos de aprovação dos Comitês de Ética podem ser encontrados no ANEXO A.

Todos os procedimentos de coleta foram realizados por profissionais treinados e de acordo com as diretrizes institucionais e consistentes com o consentimento dos doadores voluntários. Cópia dos termos de consentimento apresentado aos voluntários doadores de sangue da população do Jequitinhonha e aos pacientes com TO ativa podem ser encontrados nos ANEXO B e ANEXO C, respectivamente.

3.1.1 População utilizada na análise da soroprevalência da toxoplasmose, prevalência da toxoplasmose ocular e genotipagem dos microssatélites para construção dos pedigrees

Nessa etapa, a população de estudo foi constituída de indivíduos provenientes de três vilarejos do município de Jequitinhonha, no norte de Minas Gerais, denominados Caju, Virgem das Graças (VdG) e São Pedro do Jequitinhonha (SPJ).

Do total de 1901 indivíduos previamente cadastrados, amostras de sangue de 1566 moradores das áreas de SPJ, VdG e Caju foram coletadas pela equipe de enfermeiros e alunos coordenada pela profa. Dra. Andrea Gazzinelli, da Universidade de Enfermagem, da UFMG. Nessa etapa, foram coletados três tubos de sangue com heparina, totalizando 30ml sangue de cada voluntário. A Tabela 3 apresenta o número de amostras de sangue adquiridas em cada vila e o percentual da população atingida, classificada por gênero e idade.

Tabela 3: Número de indivíduos submetidos a punção venosa, separados por faixa etária e gênero e percentual de indivíduos puncionados em relação ao total de indivíduos provenientes das vilas de SPJ, Caju e VdG no Vale do Jequitinhonha, MG

Faixa etária	SPJ		Caju		VdG	
	Coletados ¹ (M-F)	Total ² (%)	Coletados (M-F)	Total (%)	Coletados (M-F)	Total (%)
< 30	436 (205-231)	479 (91,0%)	221 (107-114)	242 (91,3%)	223 (86-137)	362 (61,6%)
31-50	138 (54-84)	159 (86,8%)	107 (52-55)	109 (98,2%)	98 (42-56)	137 (71,5%)
> 50	134 (66-68)	147 (91,2%)	96 (57-39)	97 (98,9%)	113 (52-61)	167 (67,6%)
Total	708 (325-383)	785 (90,2%)	424 (273-208)	448 (94,6%)	434 (180-254)	668 (64,9%)

¹Número total de indivíduos submetidos a punção venosa divididos por faixa etária; ²Percentual de indivíduos coletados em relação ao total cadastrado. SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças; M: Masculino, F: Feminino.

3.1.2 Amostras utilizadas na genotipagem e análise genética dos tag-SNPs

A genotipagem dos polimorfismos de base única marcadores de haplótipos (tag-SNPs) foi realizada nos indivíduos provenientes do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais e de

Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. As amostras de Minas Gerais compreendem 66 casos de COT distribuídos em 61 famílias com, ao menos, um caso da doença. Dois casos adicionais de COT foram genotipados mas não incluídos na análise genética, uma vez que não havia informação de suas estruturas familiares. Entretanto, eles foram usados nas análises imunológicas.

As amostras do Rio de Janeiro compreendem 68 casos de COT distribuídos em 30 famílias nucleares e 30 trios pais/filhos ou caso/irmãos com até três casos da doença (Tabela 4). O DNA dos pacientes provenientes de Campos dos Goytacazes foi extraído pela Dra. Alba Peixoto Rangel, sob orientação da profa. Dra. Lílian Bahia-Oliveira da Universidade de Campos dos Goytacazes, RJ, de acordo com o descrito em (Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010). No total, 301 amostras de DNA foram genotipadas para os tag-SNPs.

Tabela 4: Distribuição dos casos de COT de acordo com (A) famílias provenientes do Vale do Jequitinhonha, MG, e (B) trios de pais/filhos ou caso/irmãos provenientes de Campos dos Goytacazes, RJ

(A) Estrutura familiar em MG	Número ¹	(B) Rio de Janeiro Trios ²	Número ¹
Nº de famílias	13	Nº núcleos familiares	30
Nº núcleos familiares	61	Nº famílias com um filho afetado	28
Nº trios com uma geração afetada	51	Nº famílias com dois filhos afetados	2
Nº trios com duas gerações afetadas	10	Nº trios caso/irmãos	30
Nº trios com um filho afetado	54	Nº trios caso/irmãos com um caso	25
Nº trios com dois filhos afetados	6	Nº trios caso/irmãos com dois casos	4
Nº total de indivíduos afetados	66	Nº trios caso/irmãos com três casos	1
Nº total de indivíduos	141	Nº total de indivíduos afetados	68
		Nº total de indivíduos	160

¹Número de indivíduos para os quais se tem amostras de DNA e informação de ancestralidade. ²Modificado de (Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010), com autorização dos autores.

3.1.3 Amostras utilizadas nos ensaios de avaliação da resposta imune

Para os ensaios imunológicos foram coletados 60ml de sangue em 6 tubos com heparina de 105 indivíduos do Vale do Jequitinhonha, previamente genotipados. Os pacientes foram divididos em três grupos: SN: 21 indivíduos soronegativos para anticorpos IgG anti-*T. gondii*; COT: 59 indivíduos soropositivos para anticorpos IgG anti-*T. gondii* apresentando toxoplasmose ocular crônica; e NL: 25 indivíduos soropositivos

assintomáticos (Tabela 5). O sangue foi coletado no Vale do Jequitinhonha e transportado para Belo Horizonte a temperatura ambiente (tempo máximo de transporte: 11 horas). Os ensaios imunológicos tiveram início imediatamente após a chegada do material.

Adicionalmente, foram acessados quatro pacientes apresentando a forma ativa da toxoplasmose ocular. Para a realização do diagnóstico presuntivo de AOT, os pacientes foram avaliados por pelo menos dois oftalmologistas especializados em uveítes coordenados pelo Dr. Wesley Campos, no Centro de Uveítes do Hospital São Geraldo, em Belo Horizonte. Todos os indivíduos avaliados apresentavam IgG anti-*T.gondii* circulantes no momento do exame oftalmológico e apresentavam RC ativa de localização adjunta a uma RC anterior, critérios compatíveis com reativação da TO. A punção venosa foi realizada pela auxiliar de enfermagem Sra. Maria Bernadete Santério Inocêncio, quando foram coletados 30ml de sangue de cada pacientes.

Tabela 5: Indivíduos do Vale do Jequitinhonha e Belo Horizonte selecionados para os ensaios imunológicos

Faixa etária	Soronegativos (sexo M-F)	SP assintomáticos (sexo M-F)	COT ² (sexo M-F)	AOT ³ (sexo M-F)
< 30	5 (1-4)	1 (1-0)	12 (1-11)	2 (2-0)
31-50	4 (1-3)	13 (2-11)	17 (10-7)	2 (2-0)
> 50	12 (5-7)	11(5-6)	30 (14-16)	NA
Total	21 (9-14)	25 (8-17)	59 (25-34)	4 (4-0)

¹Sexo: M - masculino, F - feminino; ²COT: Indivíduos com toxoplasmose ocular crônica, apresentando índice ELISA (EI) acima de 1,1, apresentando lesões oculares cicatrizadas consistente com prévia RC causada por *T. gondii*; ³AOT: indivíduos com toxoplasmose ocular ativa, apresentando valores de EI acima de 1,1 com uveíte/RC consistente com reativação de TO; Soronegativos: indivíduos com EI abaixo de 1,0 sem TO; SP assintomáticos: indivíduos soropositivos (com EI acima 1,1) sem sinais de comprometimento ocular.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DE IGG ANTI- *T. GONDII* POR ENSAIO

IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

De cada indivíduo proveniente do Vale do Jequitinhonha, foram inicialmente coletados 30ml de sangue em tubo com heparina. Todas as amostras foram encaminhadas a Belo Horizonte e submetidas à separação do soro por centrifugação (10 minutos a 2000g). A fração celular foi encaminhada ao laboratório Biogenetics, em Uberlândia, MG, para

extração de DNA pelo método de fenol/clorofórmio, segundo o protocolo descrito no ANEXO D¹. O DNA extraído foi quantificado, em primeiro momento, pelo método de absorvância de ultravioleta (UV) a 260nm, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos da América, EUA).

As amostras de soro foram encaminhadas à doutoranda Samantha R. Béla e à aluna de iniciação científica Ariane K. C. Gomes, para análise dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ensaio imunoenzimático (ELISA) com a fração 3 do antígeno total de *T. gondii* (Giraldo; Cannizzaro *et al.*, 2000) e revelado segundo descrito em (Mineo; Camargo *et al.*, 1980). O protocolo detalhado do ELISA encontra-se no ANEXO E¹. Os títulos de anticorpos foram expressos em índice ELISA (EI), de acordo com a fórmula: EI = densidade óptica da amostra / densidade óptica do “cut off”. Valores de EI > 1,1 foram considerados positivos, EI < 1,1 foram considerados negativos e 1,0 < EI < 1,1 foram considerados indeterminados. As amostras de sangue, DNA e soro foram mantidas congeladas a -20°C até o momento de sua utilização nos diferentes procedimentos às quais foram submetidas.

3.3 DOSAGEM DE DNA POR MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA

Todas as amostras de DNA dos indivíduos do Vale do Jequitinhonha foram submetidas inicialmente à quantificação pelo método absorvância de UV, como já mencionado na sessão anterior. Posteriormente o DNA foi novamente quantificado pelo método de fluorescência. Esse método é mais sensível do que a detecção de absorvância de luz UV a 260nm, sendo capaz de detectar apenas o DNA de fita dupla presente na amostra e não sofre influência de substâncias contaminantes utilizadas no processo de extração (Holden; Haynes *et al.*, 2009).

No dia anterior ao ensaio, as amostras de DNA foram diluídas 1:10 em Tris-Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) (TE), pH7,5 e mantidas a 4°C. Então, 5µl de cada amostra juntamente com 45µl de TE e 50µl de 8 padrões de concentração de DNA, realizados com DNA de timo de bezerro (Sigma Aldrich®) nas concentrações (800ng/ml,

¹Os protocolos realizados por terceiros foram anexados ao trabalho, enquanto que os demais estão descritos de forma detalhada nessa sessão.

400ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12,5ng/ml e 6,25ng/ml) e 50µl de TE (como branco) foram transferidos em duplicata para uma placa de 96 poços (ABgene®, Epsom, Reino Unido). Em seguida, 50µl de Quanti-IT™ Picogreen® dsDNA (Invitrogen™, Grand Island, EUA), diluídos 1:200 foram adicionados a cada amostra e padrão. As placas foram centrifugadas brevemente e a leitura de emissão de fluorescência foi aferida em fluorímetro citofluor (GE Healthcare®, Reino Unido). Comparando a fluorescência das amostras com as da curva padrão, a concentração de DNA de cada amostra foi aferida e uma diluição estoque de 50ng/µl foi feita para cada amostra.

3.4 EXAME OFTALMOLÓGICO

A equipe médica foi composta por sete especialistas: Dr. Fernando Oréfice, Dra. Juliana Oréfice, Dr. Mário Carlos Lemos, Dr. Sidney, Dr. Gustavo Hering, Dra. Anna Christina Higino, coordenados pelo Dr. Wesley Campos, oftalmologista chefe do setor de Uveítes do Hospital São Geraldo, da Universidade Federal de Minas Gerais.

A população das três áreas do Vale do Jequitinhonha foi submetida a exames oftalmológicos de acuidade visual e biometria, para detecção e triagem das lesões tipicamente causadas pelo *T. gondii* e observação de anormalidades no vítreo. Um modelo da ficha de avaliação oftalmológica utilizada nos exames dos indivíduos do Vale do Jequitinhonha encontra-se disponível no ANEXO F. Do total de 1356 indivíduos avaliados, foram identificados 85 indivíduos com lesões sugestivas de toxoplasmose (tipos A e B). Estes foram então encaminhados a Belo Horizonte para exames de tomografia computadorizada da retina e retinografia para visualização, caracterização, documentação e reavaliação das lesões. A Tabela 6 sumariza os dados da população acessada nos exames oftalmológicos considerando os indivíduos previamente submetidos à punção venosa. Apenas os indivíduos com ambos exame oftalmológico e punção venosa constituem a população de estudo para cálculos de prevalência.

Tabela 6: Número de indivíduos submetidos ao exame oftalmológico, separados por faixa etária e gênero e percentual de indivíduos examinados em relação ao total de indivíduos punccionados das vilas de SPJ, Caju e VdG no Vale do Jequitinhonha, MG

Faixa etária	SPJ		Caju		VdG	
	Examinados ¹ (M-F)	Total ² (%)	Examinados (M-F)	Total (%)	Examinados (M-F)	Total (%)
< 30	379 (175-204)	436 (86,9%)	187 (89-98)	221 (84,6%)	200 (81-119)	223 (89,6%)
31-50	111 (41-70)	138 (80,4%)	88 (38-50)	107 (82,2%)	87 (35-52)	98 (88,8%)
> 50	119 (58-61)	134 (88,8%)	79 (45-34)	96 (82,3%)	106 (48-58)	113 (93,4%)
Total	609 (274-335)	708 (86,0%)	354 (172-182)	424 (83,5%)	393 (164-229)	434 (90,5%)

¹Número total de indivíduos examinados divididos por faixa etária; ²Percentual de indivíduos coletados em relação ao total de indivíduos com punção sanguínea. SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças; M: Masculino, F: Feminino.

3.4.1 Critério de classificação das lesões

As lesões cicatrizadas dos casos de COT foram classificadas de acordo com características morfológicas, desconsiderando a localização e tamanho, anteriormente descrito (Bahia-Oliveira; Silva *et al.*, 2009). Lesões do tipo A apresentam borda bem delimitada, rodeadas por halo hiper pigmentado e extensa destruição da retina e coróide (Figura 7a). Lesões do tipo B são caracterizadas por halo hipo pigmentado e menor dano tecidual em comparação com a lesão do tipo A (Figura 7b). Esses dois tipos de lesão preenchem os critérios morfológicos de RC causada por *T. gondii*. Lesões do tipo C são áreas de hiperplasia do epitélio retinal pigmentar ou atrofia, com menor grau de destruição tecidual em comparação com as lesões dos tipos A e B (Figura 7c). Devido ao baixo grau de destruição da retina, as lesões do tipo C podem ser consideradas como lesão de etiologia indeterminada.

Apesar da localização não ter sido incluída como critério de classificação das lesões, essa informação, bem como o número de lesões encontrada em cada olho, foram registradas em desenhos de fundo de olho, realizados pelos oftalmologistas no momento da avaliação do paciente. A localização foi feita baseada na divisão do fundo do olho em zonas, realizada por Holland em 1989, de acordo com o esquema na Figura 7d. A zona 1 é localizada internamente e inclui o nervo óptico e fóvea, a zona 2 é maior e é delimitada

pelas veias vorticosas enquanto que a zona 3 é a mais externa (Holland; Buhles *et al.*, 1989).

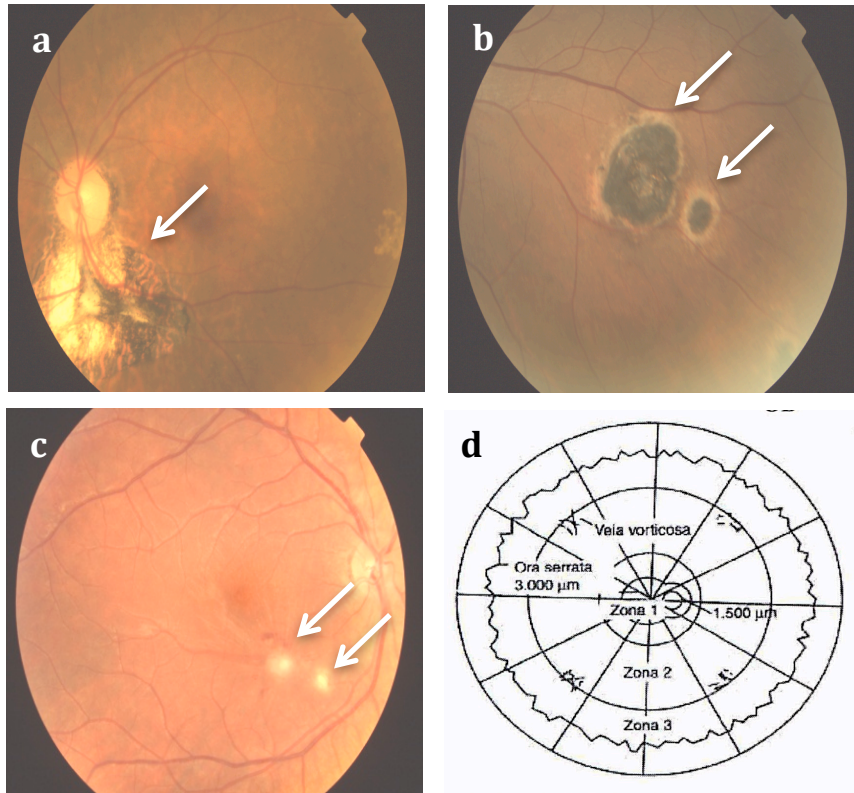


Figura 7: Retinografias representativas das três classes de lesões encontradas nos indivíduos provenientes das três vilas do Vale do Jequitinhonha. a) Lesões do tipo A apresentam borda bem delimitada, rodeadas por halo hiper pigmentado e extensa destruição da retina e coróide. b) Lesões do tipo B são caracterizadas por halo hipo pigmentado e menor dano tecidual. c) Lesões do tipo C são áreas de hiperplasia do epitélio retinal pigmentar ou atrofia, com menor grau de destruição tecidual em comparação com as lesões dos tipos A e B. d) Esquema de divisão do olho em zonas, segundo (Holland; Buhles *et al.*, 1989). A zona 1 abrange a área compreendida pelas arcadas vasculares temporais, numa extensão de 3000 μ m da fóvea. A zona 2 estende-se anteriormente a partir da zona 1 até o equador, identificado pelas bordas anteriores das ampolas das veias vorticosas. A zona 3 estende-se a partir da zona 2 até a *ora serrata*.

Dos 85 pacientes com lesões sugestivas de toxoplasmose (A e B), 68 foram confirmados como caso de COT e não foram identificados casos de AOT. Os critérios de classificação e inclusão dos pacientes como casos de COT foram: a sorologia positiva para IgG anti-*T. gondii* e presença de lesões oculares cicatrizadas com características morfológicas indicativas de TO (tipos A e B). Na maioria dos casos encaminhados a Belo Horizonte, foi realizada a medida de cada lesão, tendo como referência o disco óptico, com 1500 μ m de diâmetro. Esse procedimento foi realizado pela Dra. Juliana Oréfice em 50 dos 68 pacientes com TO, tendo como base as retinografias digitalizadas de cada indivíduo.

3.5 GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES

A genotipagem de microssatélites foi feita para confirmar as informações de pedigree e, para tanto, foram utilizados um total de onze marcadores, sendo nove derivados do ABI PRISM® Linkage Mapping Set (LMS), v2.5 (ABI - Applied Biosystems™, Carlsbad, EUA) e dois fabricados sob demanda. Os pares de iniciadores foram marcados com fluorescência com os corantes FAM™, NED™ e VIC™ na extremidade 5' do iniciador senso (Tabela 7).

Tabela 7: Informações sobre os marcadores microssatélites utilizados nas reações de genotipagem

Identificação	Nº do painel ¹	Fluorescência	Intervalo de tamanhos (bp) ²	Het ³	Nº de alelos
Myc10_10	NA	FAM™	100-120	NA	10
D11S4102	62	FAM™	140-172	0,77	16
Myc10_7	NA	FAM™	190-210	NA	7
D11S4151	15	FAM™	331-345	0,79	7
D11S4191	15	VIC™	89-119	0,87	15
D6S289	8	VIC™	160-182	0,79	11
D2S117	3	VIC™	190-220	0,82	15
D11S914	62	VIC™	279-291	0,71	6
D2S2382	4	VIC™	296-336	0,81	20
D2S325	3	NED™	154-184	0,82	15
D11S4147	63	NED™	224-246	0,81	11

¹Número de identificação no painel LMS v2.5 da ABI; ²Baseado nos valores encontrados para cada marcador na base de dados de CEU, em pares de base (bp). ³Valores de heterozigotidade usados para indicar o quão informativo é o marcador. NA: Não disponível.

Cada reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em separado para cada marcador em um total de 5µl, contendo 12,5ng de DNA, 2,2µl de pré-mix de tampão, 2,5 pmol de iniciadores e 0,25 unidades da polimerase AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems™). O pré-mix de tampão consistiu em Tampão TaqGold 2,3X, 6,9mM MgCl₂, 0,58mM de dNTPs (todos da Applied Biosystems™) e 1M Betaína (Sigma Aldrich®). Para cada reação, foi usado 6,95µl do MasterMix, 0,5µl de cada iniciador (diluídos a 1ng/µl) e 0,05µl de AmpliTaq Gold™ DNA Polimerase. As reações foram realizadas nos termocicladores Mastercycler (Eppendorf, Histon, Reino Unido) usando o protocolo Touchdown, otimizado pela pós-doc Dra. Michaela Fakiola, do CIMR, Addenbrookes Hospital em Cambridge, Reino Unido, como detalhado a seguir:

94°C	10 minutos		
94°C	20 segundos		} 15 ciclos
94°C	60 segundos com decréscimo de 0,5°C/ciclo		
72°C	60 segundos		
94°C	20 segundos	} 20-22 ciclos	
56°C	60 segundos		
72°C	60 segundos		
72°C	5 minutos		

Após a reação de PCR foi feito um mix de igual volume de todos os produtos. Dessa mistura, 2µl foram transferidos para uma placa de 96 poços e a esses foram adicionados 8µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems™) e 2,5µl de padrão de tamanho molecular Genescan 500 ROX™ (Applied Biosystems™). As amostras foram então desnaturadas por 5 minutos a 95°C, brevemente centrifugadas e deixadas a 4°C por pelo menos 3 minutos antes da corrida, realizada no equipamento ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems™), disponível no CIMR ou MegaBace/1000 (GE Healthcare®), disponível no ICB, UFMG.

A análise dos genótipos foi feita no programa ABI PRISM® Genotyper™, v3.6 (Applied Biosystems™) para as corridas realizadas no sistema da Applied Biosystems ou o programa Fragment Profile™ para as genotipagens feitas no MegaBace/1000 (GE Healthcare®). A Figura 8 exemplifica a genotipagem para o microssatélite D2S2382 de uma família constituída de pai (1), mãe (2) e dois filhos (3 e 4). Os dados foram obtidos no programa Fragment Profiler. Apenas como exemplo, pode-se observar na Figura 8 que mãe (2) e filho (3), são heterozigotos e o pai (1) e filho (4) são homozigotos para o alelo D2S2382. Dessa forma, pode-se concluir que a mãe contribuiu com o alelo 325 para o genótipo do filho 3 e com o alelo 311 para o genótipo do filho 4. O pai, por ser homozigoto, passou seu alelo 311 para ambos os filhos. Todos os membros dessa família apresentam, portanto, genótipos compatíveis, o que confirmou os dados obtidos na coleta de dados do pedigree.

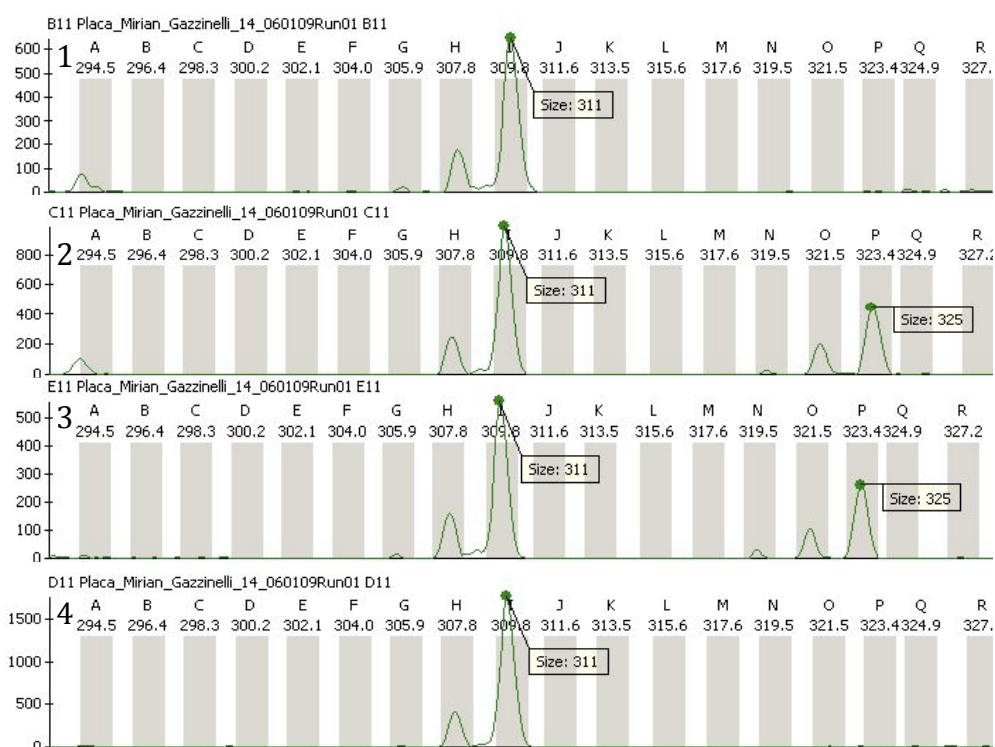


Figura 8: Ilustração gráfica dos picos de genotipagem para o microsatélite D2S2382 dentro de uma família, obtidos no programa Fragment Profiler. Os genótipos dos pais estão ilustrados pelos números 1 e 2 e os dos filhos estão ilustrados pelos 3 e 4. Observa-se um único pico de 311 pb nos indivíduos 1 e 4, indicando homocigotidade. Nos indivíduos 2 e 3, observa-se dois picos, com 311pb e 325pb, indicando heterocigotidade.

3.6 ANÁLISE DO PEDIGREE

3.6.1 Coleta de dados do pedigree

O pedigree para as áreas de Caju e VdG já havia sido coletado e digitalizado pelo grupo de pesquisa do Professor Gustavo Henrique Velásquez da Faculdade de Enfermagem da UFMG, também colaborador do projeto (Velasquez-Melendez; Parra *et al.*, 2007). A coleta das informações do pedigree para a área de SPJ foi feita de acordo com o protocolo proposto por Williams Blagero, em 2006. Basicamente, foi realizada uma entrevista com os chefes de família de cada moradia da área em questionário impresso. Um modelo do questionário pode ser encontrado no ANEXO G. Foram coletadas informações referentes aos avós, pais e filhos do entrevistado e informações adicionais, referentes aos primos e tios residentes na região. Posteriormente, os dados foram digitalizados como planilha (Williams-Blangero e Blangero, 2006).

3.6.2 Identificação dos pedigrees

Para separação dos pedigrees em cada uma das vilas foi utilizado o programa MENDEL (Lange; Sinsheimer *et al.*, 2005), versão 4.0, usando-se dois modelos de separação dos indivíduos. No modelo 1, foram agrupados no mesmo pedigree todos os indivíduos relacionados e obteve-se o pedigree expandido de cada região. No modelo 2, foram selecionados e agrupados o menor número de indivíduos capazes de conectar todos os indivíduos com o traço escolhido (TO), obtendo-se pedigrees reduzidos de cada região. Foram excluídos os indivíduos sem qualquer relação com outros do pedigree e também, os que se relacionavam apenas com indivíduos inacessíveis. Indivíduos inacessíveis são aqueles que não moram na região ou são falecidos, mas podem ser importantes por estabelecerem laços distantes no pedigree.

3.6.3 Detecção de erros

Para detecção de erros, os pedigrees foram submetidos ao programa PEDCHECK (O'Connell e Weeks, 1998). Esse software detecta erros de 3 tipos: a) tipo 0: erros de determinação do sexo e erros de incompatibilidade de parentesco, ambos gerados por erro na coleta e digitalização dos dados; b) tipo 1: leva em consideração os dados de genotipagem e avalia a compatibilidade genotípica entre pais e filhos e; c) tipo 2: erros mais elaborados, de difícil identificação, onde os genótipos dos indivíduos de um mesmo núcleo familiar são compatíveis entre si, mas incompatíveis com o restante da família. Os erros foram corrigidos manualmente, excluindo-se os genótipos problemáticos, até que nenhuma falha fosse encontrada.

3.6.4 Desenho dos pedigrees

Os pedigrees resumidos, obtidos através da utilização do modelo 2, no programa MENDEL, versão 4.0 (Lange; Sinsheimer *et al.*, 2005) foram desenhados no programa MADELINE, versão 2.0 (Trager; Khanna *et al.*, 2007).

3.6.5 Inclusão dos dados no banco de dados

Uma vez corrigidos, os dados dos pedigrees bem como os dados de genotipagem e o levantamento dos dados fenotípicos dos indivíduos (níveis de IgG e manifestação de TO) foram incluídos no banco de dados MySQL GenIE. Esse banco de dados, desenvolvido no laboratório da Dra. Jenefer Blackwell, no Instituto de Pesquisas Médicas (CIMR), em Cambridge, Reino Unido, é de acesso restrito aos usuários e é atualmente mantido pelo Telethon Institute for Child Health Research na University of Western, Austrália.

3.7 ANÁLISE DOS SNPs

3.7.1 Escolha dos genes candidatos

Os genes candidatos foram escolhidos baseando-se no conhecimento da resposta imune à infecção pelo *T. gondii*. Também foram levados em consideração outros genes que participam da cascata de sinalização dos receptores de resposta imune inata para os quais foram descritas mutações em humanos que conferem susceptibilidade ao parasito. Foram então selecionados os seguintes genes candidatos IRAK4, MyD88, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TIRAP e UNC93B1 da via de sinalização dos TLR; IL-10, IL-12, IFN- γ genes de citocinas da resposta imune; NOD2 da via de sinalização dos NLR os genes de ABCA4, COL2A1 e o gene P2RX7.

3.7.2 Escolha dos tag-SNPs

Para obter boa cobertura haplotípica em nossas análises, tag-SNPs comuns, com o limiar de frequência alélica mínima (MAF) maior que 0,2 foram identificados usando-se, como recurso o banco de dados do projeto HapMap (www.hapmap.com) e o método de seleção de tag-SNPs ($r^2 > 0,8$) implementado através do programa Haploview, versão 4.2 disponível no site <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>.

Como a população miscigenada brasileira possui mais de 70% de ancestralidade europeia e africana, os tag-SNPs foram escolhidos a partir dos dados das populações CEU e a população Yoruba em Ibadan, Nigéria (YRI) cumprindo o limiar da MAF

estipulada > 0,2. A relação dos 14 genes candidatos, bem como os 43 tag-SNPs selecionados foram listados na Tabela 8.

Tabela 8: Características gerais dos SNPs genotipados pela técnica de TaqMan™ em 301 amostras de DNA (continua)

Identificação do SNP	Função	Mudança de aa ¹	Crom	Posição Física ² (pb)	Fita	Alelos ³	MAF CEU	MAF YRI
IL-10rs1800896	Promotor	-	Cr 1	206946897	+	C/T	0,47	0,23*
IL-10rs3024490	Íntron 1	-	Cr 1	206945311	+	C/A	0,22	0,48
IL-10rs1518111	Íntron 1	-	Cr 1	206944645	+	C/T	0,21	0,48
ABCA4rs952499	Íntron 5	-	Cr 1	94558425	+	T/C	0,46	0,36
ABCA4rs1761375	Íntron 10	-	Cr 1	94538011	+	G/A	0,30	0,17
ABCA4rs1801574	Éxon 27	Sin	Cr 1	94475388	-	C/G	0,18	0,28
ABCA4rs3112831	Exon 10	H423P	Cr 1	94544234	-	T/C/G	0,29	0,14
ABCA4rs2297633	Íntron 18	-	Cr 1	94510673	+	G/T	0,33	0,04
TLR5rs1053954	Éxon 1	Sin	Cr 1	223283851	-	A/G	0,08	NA
TLR5rs1341987	Íntron 3	-	Cr 1	223309213	-	C/G	0,48	0,24
IL-12rs568408	3'UTR	-	Cr 3	159713467	+	G/A	0,15	0,22
MyD88rs6853	3'UTR	-	Cr 3	38184370	-	A/G	0,12	0,34
MyD88rs7744	3'UTR	-	Cr 3	38184021	-	A/G	0,15	0,01
TLR9rs187084	Promotor	-	Cr 3	52261031	-	A/G	0,34	0,29
TLR2rs1816702	Íntron 2	-	Cr 4	154609523	-	C/T	0,13	0,49
TLR2rs1898830	Íntron 2	-	Cr 4	154608453	-	A/G	0,06	0,08
TLR4rs10759932	Promotor	-	Cr 9	120465144	-	T/C	0,14	0,26
TLR4rs2770146	Íntron 3	-	Cr 9	120473338	+	T/C	0,33	0,10
TLR4rs2149356	Íntron 3	-	Cr 9	120474199	+	G/T	0,28	0,18*
TLR4rs7873784	3'UTR	-	Cr 9	120478936	-	G/C	0,15	0,28
UNC93B1rs11228120	Íntron 3	-	Cr 11	67768796	-	C/T	0,17	0,08
UNC93B1rs308328	Íntron 7	-	Cr 11	67765056	+	T/C	0,38	0,06*
TIRAPrs7932766	Éxon 2	Sin	Cr 11	126162862	+	C/T	0,24	0,13
TIRAPrs8177374	Éxon 2	S180L	Cr 11	126162843	-	C/T	0,17	0,00
P2RX7rs2230911	Exon 11	T357S	Cr 12	121615131	+	C/G	0,09	0,20
P2RX7rs2230912	Exon 13	Q460R	Cr 12	121622196	+	A/G	0,03	0,03
P2RX7rs208293	Íntron 4	-	Cr 12	121600180	+	G/A	0,34	0,16*
P2RX7rs3751143	Éxon 13	E496A	Cr 12	121622304	+	G/T	0,18	0,07
P2RX7rs1718119	Éxon 11	A348T	Cr 12	121615103	+	T/C	0,42	0,48
P2RX7rs1621388	Éxon 13	Sin	Cr 12	121622563	+	C/T	0,37	0,50
IRAK4rs1461567	Íntron 2	-	Cr 12	44164689	-	G/A	0,30	0,02
IRAK4rs4251513	Íntron 8	-	Cr 12	44174204	-	C/G	0,50	0,06
IRAK4rs4251429	Íntron 1	-	Cr 12	44154407	-	G/C	0,02	0,36
IFN-γrs1861493	Íntron 1	-	Cr 12	68551196	+	A/G	0,33	0,04
COL2A1rs1635544	Íntron 22	-	Cr 12	48380031	-	T/C	0,47	0,50
COL2A1rs1793958	Íntron 2	-	Cr 12	48392433	+	G/A	0,33	0,43
COL2A1rs2070739	Exon 47	G1336S	Cr 12	48367976	-	C/T	0,10	0,00
COL2A1rs2276455	Íntron 28	-	Cr 12	48376137	-	G/A	NA	0,50
COL2A1rs2276454	Exon 28	Sin	Cr 12	48376291	+	G/A	0,39	0,33

Tabela 8: conclusão

Identificação do SNP	Função	Mudança de aa ¹	Crom	Posição Física ² (pb)	Fita	Alelos ³	MAF CEU	MAF YRI
COL2A1rs3803183	Exon 1	T9S	Cr 12	48398080	-	A/T	NA	0,34
NOD2rs3135499	3'UTR	-	Cr 16	50766127	+	A/C	0,40	0,41*
NOD2rs2111235	Íntron 1	-	Cr 16	50733969	+	G/A	0,25	0,34
NOD2rs2076753	Íntron 2	-	Cr 16	50733374	+	G/T	0,34	0,02

¹Mudança de aminoácido na sequência proteica ocasionada pela troca de nucleotídeo no gene; ²Localização física dos marcadores de acordo com o constructo 37.3 do genoma humano; ³Alelo majoritário>minoritário de acordo com a frequência na população CEU; *Inversão do alelo mais frequente na população YRI, em relação a CEU; NA: dados não disponíveis; Sin: mudança de nucleotídeo sinônima. G: glicina; S: serina; T: treonina; E: ácido glutâmico; A: alanina; Q: glutamina; R: arginina; L: leucina; H: histidina; P: prolina.

3.7.3 Genotipagem dos tag-SNPs pelo método TaqMan™

A genotipagem de 43 SNPs foi realizada durante o estágio de doutorado sanduíche realizado na Universidade de Cambridge, em colaboração com a Profa. Dra. Jenefer M. Blackwell, para o total de 301 amostras já descritas na subseção 3.1.2 deste documento.

Sucintamente o método TaqMan® (Applied Biosystems™) é baseado na atividade 5'-3' da exonuclease Taq DNA polimerase, que resulta na clivagem de sondas marcadas com fluorescência durante a PCR (Lie e Petropoulos, 1998). A sonda TaqMan™ (20-30 bp), consiste de uma sequência sítio específica conjugada a dois fluorocromos na sua extremidade 3'. Um deles funciona como repórter e o outro funciona interrompendo a reação. A sonda hibridiza com a fita de DNA que lhe é complementar e, durante a amplificação é degradada devido à atividade exonucleásica 5'-3' da DNA polimerase. O fluorocromo repórter, é separado do outro fluorocromo resultando no aumento da intensidade do fluorocromo repórter, que é proporcional à quantidade de produto de PCR formado.

A genotipagem dos SNPs usando as técnicas TaqMan® SNP Genotyping ou Custom TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems™) foram realizadas em placas ópticas de 384 poços (Applied Biosystems). Todo o processo de pipetagem foi realizado usando sistema robotizado BiomekFX (Beckman, High Wycombe, Reino Unido). Para as reações, 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, 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 (Beckman). As placas foram seladas com plásticos adesivos da Applied Biosystems e as PCR foram feitas nos termocicladores MJ Research PTC-225 localizados no CIMR Addenbrooks Hospital, Universidade de Cambridge, Reino Unido, da seguinte maneira:

95°C	10 minutos	} 40 ciclos
92°C	15 segundos	
60°C	1 minuto	

Os dados obtidos foram analisados no sistema de detecção de seqüência ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems™). O agrupamento dos dados em três grupos de genótipos foi realizado usando o programa *Sequence Detection System* (SDS) da Applied Biosystems™ (Figura 9).

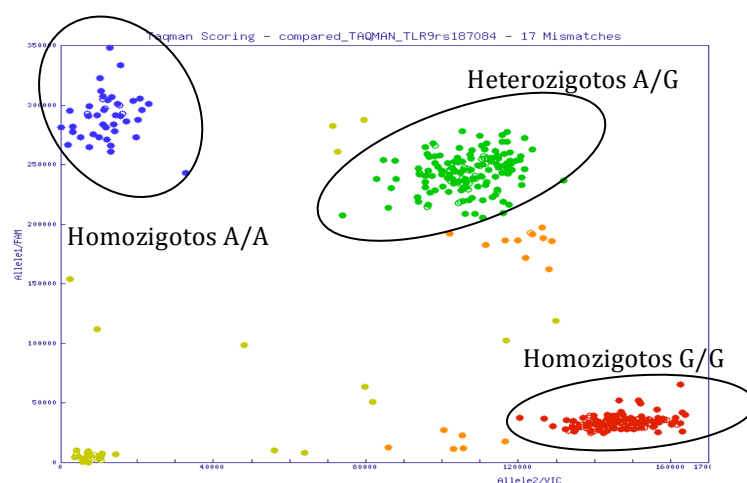


Figura 9: Ilustração gráfica do agrupamento dos genótipos obtidos na genotipagem pela reação de TaqMan™, para o SNP TLR9rs187084 no total de 301 amostras, usando o software SDS. Homozigotos para cada um dos alelos estão representados por pontos azuis (alelo 1) ou vermelhos (alelo 2), heterozigostos estão representados pelos pontos verdes. Amostras não genotipadas, ou não agrupadas foram representadas por pontos amarelos, para exclusão. Amostras classificadas de forma diferente pelos avaliadores foram marcadas de laranja e também foram excluídas das análises subsequentes.

Os genótipos que aparecerem na origem, bem como aqueles localizados fora ou entre os grupos (filtros), foram omitidos da análise final. A avaliação dos dados foi feita por dois profissionais independentes. Os resultados das duas análises independentes foram comparados automaticamente e apenas os genótipos em que houve concordância entre ambos os avaliadores foram armazenados no banco de dados do MySQL GenIE, sendo os demais descartados.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS GENÉTICOS

3.8.1 Cálculo do poder amostral

Os cálculos de estimativa de poder amostral foram feitos utilizando script, baseado no método descrito por Knapp (Knapp, 1999). O script desenvolvido pela pesquisadora Dra. Heather Cordell, do Institute of Human Genetics da Newcastle University foi implementado no Excel (informação pessoal).

Famílias com vários casos de TO foram decompostas em núcleos familiares individuais e foram distinguidas para os cálculos de estimativa de poder amostral e análise de associação alélica baseada em famílias (FBAT) (Tabela 4). Dessa forma, do total de 128 casos de COT (68 casos do Vale do Jequitinhonha, MG e 60 casos de Campos dos Goytacazes, RJ), 126 deles apresentam familiares disponíveis para análise genética de trios (pais/caso ou caso/irmão). Os dois pacientes restantes não foram considerados nas análises genéticas subsequentes.

3.8.2 Cálculo da frequência alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O cálculo da frequência alélica e da proporção de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de fundadores não relacionados e não afetados pela TO nas amostras nos trios pais/caso ou irmãos/caso foram avaliadas usando o pacote GenAssoc para o programa STATA v8.0. Os marcadores que desviaram do HWE ($p < 0,05$) foram excluídos das análises de associação alélica. (disponível em <http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/programa/stata/>).

3.8.3 Teste de Associação Baseado em Família (FBAT)

Foram realizados testes de associação alélica baseados em família (FBAT) (Slatkin, 2008) levando em consideração a manifestação de TO. As análises foram realizadas no software FBAT onde foram testados diferentes modelos: recessivo, quantitativo e genótipo. Brevemente, o método de FBAT é baseado no teste de desequilíbrio de transmissão alélica, mas permite análises considerando diferentes modelos e

indisponibilidade de dados parentais completos (Horvath; Xu *et al.*, 2001; Laird; Horvath *et al.*, 2000). As análises foram realizadas considerando a hipótese nula de “não ligação e não associação”.

3.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

3.9.1 Purificação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Para isolamento das PBMCs foi utilizado gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich®). Para tanto, o total de 60ml de sangue de cada paciente foi dividido em três tubos cônicos de 50ml (~20ml/tubo) e o volume final foi completado para 35ml com solução salina tamponada (PBS) 1x estéril. O material foi centrifugado durante 40 minutos a 400g, a temperatura ambiente. Após centrifugação, 2ml do plasma de cada paciente foi coletado e armazenado para confirmação da resposta sorológica anti-*T. gondii*. O anel contendo as PBMCs foi transferido para um novo tubo cônico de 50ml e submetido a 3 ciclos de centrifugação a 300g a 4°C com 30ml de meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich®). A concentração celular foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer e foi ajustada para 1×10^7 células/ml em meio RPMI sem soro, contendo 0,04mg/ml de sulfato de gentamicina (meio R).

3.9.2 Estimulação das células com antígeno total de *T. gondii*

Uma alíquota de 50µl da solução de células de cada indivíduo, equivalente a 5×10^5 células foi distribuída, em duplicata, em placas de fundo chato para cultura de células de 96 poços estéreis. Em cada poço foram adicionados 150µl de meio R suplementado com 20% de SFB (R20), contendo 10 µg/ml de antígeno total solúvel da cepa RH de *T. gondii*, (STAg) ou 2 µg/ml de α CD3 + 1 µg/ml de α CD28, como controle positivo (estímulo policlonal) ou, para controle negativo, apenas meio R.

Após 8 horas de estimulação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂, as placas foram brevemente centrifugadas e o sobrenadante de cultura foi transferido para placas de cultura de células de 96 poços estéreis. O sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior detecção de citocinas.

3.9.3 *Marcação das células para ensaio de proliferação celular*

Para o ensaio de proliferação, foram separadas 1×10^7 células de cada paciente, o equivalente a 1ml, em tubo cônico estéril de 15ml. A cada amostra, foram adicionados 1ml de solução de RPMI sem soro contendo Succinimidil Éster de Carboxifluoresceína CFSE (Invitrogen™) previamente diluído 1:4000 da solução estoque a 10mM. As células foram incubadas durante 8 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O CFSE se liga a proteínas do citoplasma celular e, durante a divisão, ele se difunde entre as células filhas, identificando as populações celulares que proliferaram durante a estimulação. Após o período de incubação, a reação do CFSE com as proteínas do citoplasma celular foi bloqueada lavando-se as células com 14ml de meio R10 em 3 ciclos de centrifugação por 5 minutos a 300g a 4°C. No último ciclo, após a centrifugação, as células foram ressuspensas no total de 1ml de meio R10 e distribuídas igualmente em placas de 48 poços (equivalente a 250µl de célula por poço $\sim 1 \times 10^6$ células/poço).

A estimulação das células foi realizada com os mesmos estímulos e concentrações utilizadas nos ensaios da caracterização da resposta imune, descritos na seção 3.9.2 deste texto. As células permaneceram em cultura por 5 dias em ambiente com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Após a cultura, o sobrenadante de cultura foi coletado com descrito no item 3.9.2 para posterior detecção de citocinas. As células foram coletadas de acordo com o descrito no item 3.9.2 porém, foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo em U para marcação de moléculas de superfície, de acordo com o painel 5 que consta da Tabela 9 e de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.5. Após a marcação as células foram ressuspensas em 200µl de paraformaldeído 2% e encaminhadas para leitura em citômetro de fluxo, BD FACScan™ (BD Bioscience - Becton Dickinson Biosciences, San José, EUA).

3.9.4 *Estimulação das células para caracterização da resposta imune e ensaio de proliferação celular*

Uma alíquota de 100µl de cada amostra de célula, equivalente a 1×10^6 células foi distribuída em cada poço de placas de 96 poços com fundo em U estéreis. A cada poço foram adicionados 100µl de meio R20, contendo um dos estímulos: 10 µg/ml de STAg

ou 2 µg/ml de αCD3 + 1 µg/ml de αCD28, como controle positivo (estímulo policlonal) ou meio R10, como controle negativo. O volume de 0,2µl de Brefeldina A (“GolgiPlug Protein Transport Inhibitor”) (BD Bioscience) foi adicionada a cada poço após 10 horas de estimulação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂, para permitir a concentração de citocinas no interior da célula. Após 6 horas adicionais de estímulo na presença de Brefeldina A (16 horas de estimulação no total), as células foram marcadas para moléculas de superfície e citocinas intracelulares.

3.9.5 Marcação de moléculas de superfície

Foram adicionados 100µl de tampão de FACS (PBS 1x suplementado com 0,5% de BSA) a cada poço. As placas foram centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada poço foi aspirado a vácuo cuidadosamente e descartado. Foram adicionados 50µl de tampão de FACS contendo a diluição dos anticorpos para marcação de moléculas de superfície, a cada poço. As células foram então incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esse período 200µl de Tampão de FACS foram adicionados em cada poço e as placas foram centrifugadas a 300g por 5 minutos à temperatura ambiente, para retirar o excesso de anticorpo não ligado. Informações adicionais em relação aos anticorpos e diluições podem ser encontrados na Tabela 9.

Tabela 9: Painéis de anticorpos utilizados na citometria de fluxo utilizando o FACSCalibur™ equipado com 2 lasers (azul e vermelho), capaz de discernir quatro fluorocromos

Detector	Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4	Painel 5
FL1	CD4-FITC	CD4-FITC	CD8-FITC	CD3-FITC	CFSE
Volume/ensaio ¹	1,25µl	1,25µl	2,50µl	0,50µl	-
FL2	TNF-α-PE	IL-17-PE	IFN-γ-PE	IgG1-PE	HLADR-PE
Volume/ensaio ¹	2,50µl	1,25µl	2,50µl	2,50µl	1,25µl
FL3	IFN-γ-PECy7	IFN-γ-PECy7	TNF-α-PerCPCy5.5	IgG1-PerCPCy5.5	CD8-PerCPCy5.5
Volume/ensaio ¹	0,25µl	0,25µl	2,50µl	2,50µl	0,65µl
FL4	IL-2-APC	IL-2 APC	IL-2 APC	IgG1-APC	CD4-APC
Volume/ensaio ¹	0,25µl	0,25µl	0,25µl	0,25µl	0,65µl

¹Ensaio de 50µl por amostra. Painéis 1 e 2: Marcação de células CD4 produtoras de citocinas Th1 e Th17, respectivamente; Painel 3: Marcação de células CD8 produtoras de citocinas Th1; Painel 4: marcação com isotipos controles; Painel 5: Marcação de células CD4 e CD8 ativadas proliferativas; FITC Isotiocitrato de fluoresceína; CFSE: Succinimidil Éster de Carboxifluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCPCy5.5 complexo proteico Peridil Clorofila conjugado em tandem com a cianina 5.5; APC: Alofocianina; PECy7: Ficoeritrina conjugada em tandem com cianina 7.

3.9.6 *Marcação intracelular de citocinas*

Após o procedimento de marcação de moléculas de superfície, deu-se procedência à marcação de citocinas intracelulares e moléculas nucleares. Maiores detalhes em relação aos anticorpos e diluições utilizados em cada painel, estão dispostos nas Tabela 9, 10 e ADENDO A.

Inicialmente, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente por vácuo. Então, 100µl de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) ou tampão de fixação intracelular (eBiosciences®, San Diego, EUA), diluído 1:4, foram adicionados a cada poço. A escolha do tampão baseou-se no tipo de molécula a ser marcada. A solução Cytofix/Cytoperm foi utilizada para os painéis com marcação intracelular de citocinas e o tampão de fixação intracelular, para os painéis que apresentavam anticorpos para moléculas intranucleares. As células foram incubadas a 4°C por 30 minutos, ao abrigo da luz. Essa etapa fixa a morfologia da célula e a deixa permeável à subsequente marcação intracelular.

Após fixação e permeabilização, foram adicionados 100µl em cada poço de tampão de permeabilização Perm/Wash™ (BD Biosciences) ou “Permeabilization Buffer” (eBioscience), previamente diluídos em água, de acordo com as indicações dos fabricantes. As células foram centrifugadas a 350g por 3 minutos. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com bomba a vácuo e foram adicionados 50µl da diluição do anticorpo, realizada em tampão de permeabilização. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após esse período, foram adicionados 200µl do tampão de permeabilização em cada poço e as células foram centrifugadas a 350g por 3 minutos a 25°C. Esse procedimento de centrifugação foi repetido mais uma vez, para eliminação completa dos anticorpos não ligados. Finalmente, foram adicionados 200µl de solução de paraformaldeído a 2% em PBS para leitura em citômetro de fluxo nos citômetros FACSCalibur™ com o programa Cellquest ou LSR Fortessa™ com o programa Diva (BD Biosciences).

Tabela 10: Painel de anticorpos utilizados na citometria de fluxo utilizando o sistema LSR Fortessa™ equipado com 3 lasers (azul, violeta e vermelho), capaz de discernir até quatorze fluorocromos

Painel	Detector (Sistema LSR Fortessa™ com 3 lasers)						
	B515	B562	B675	B750	R660	R710	R750
Anticorpo	CD3	Tbet	CD45RO	IFN- γ	IL-17A	TNF- α	CD4
Fluorocromo	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	Ax647	Ax700	APCe780
Volume/ensaio ¹	1,25 μ l	0,25 μ l	1,00 μ l	0,25 μ l	1,5 μ l	1,0 μ l	0,50 μ l

¹Ensaio de 50 μ l por amostra. Marcação de células CD4 produtoras de citocinas Th1 e Th17, respectivamente; FITC Isotiocitrato de fluoresceína; CFSE: Succinimidil Éster de Carboxifluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCPCy5.5 complexo proteico Peridil Clorofila conjugado em tandem com a cianina 5.5; APC: Alofocianina; PECy7: Ficoeritrina conjugada em tandem com cianina 7; Ax647 e Ax700: Alexa Fluor® 647 e 700, respectivamente; APCe780: Alofocianina conjugada em tandem com eFluor®780.

3.9.7 Determinação da concentração de citocinas

Para determinar as concentrações de IL-17A, IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 e TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células realizadas de acordo com as subseções 3.9.2 e 3.9.3 foi utilizado o kit BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), de acordo com a indicação do fabricante. O total de 1800 eventos dentro do gate de “beads” foi adquirido no citômetro BD FACScan™ (BD Bioscience). A concentração de citocinas em cada amostra foi calculada usando o programa BD FCAP Array™, versão 1.0.1 (BD Biosciences) e o GraphPad Prism, versão 5.0b foi usado para representações gráficas.

3.9.8 Análise estatística

As análises estatísticas para os ensaios *in vitro* foram realizadas usando o teste t de Student com a correção de Welch ou o teste de Mann-Whitney, usando o programa GraphPad Prism, versão 5.0b para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente, de acordo com o teste de normalidade.

4 RESULTADOS

4.1 A SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO VALE DO JEQUITINHONHA

Nesse trabalho, inicialmente, foi avaliada a soroprevalência da toxoplasmose em cada vila do Vale do Jequitinhonha: São Pedro do Jequitinhonha (SPJ), Caju e Virgem das Graças (VdG). Considerando os pacientes que se submeteram a exame oftalmológico e punção sanguínea, a prevalência encontrada foi de 31,0% em SPJ (189/609), 38,4% em Caju (136/354) e 65,4% (257/393) em VdG. Já a prevalência total foi de 43,0% (583/1356).

A prevalência nessas áreas é semelhante entre homens e mulheres, mas aumenta com a idade. O perfil de distribuição da prevalência em faixas etárias contudo, é diferente nos três vilarejos (Tabela 11). Em SPJ, a prevalência sobe de 21% em indivíduos com até 30 anos, para 54% em indivíduos com mais de 51 anos. Em Caju, a prevalência na primeira faixa etária é de 30% e se mantém estável em 48% nas faixas subsequentes. Em VdG, vila onde se observa maiores taxas de prevalência em todas as idades, indivíduos até 30 anos apresentam 60% de soropositividade. Esse nível sobe e se mantém alto nas faixas etárias de 31 a 50 anos e acima de 51 anos de idade.

Tabela 11: Soroprevalência da toxoplasmose de acordo com a idade e gênero dos indivíduos nas três vilas do Vale do Jequitinhonha

Faixa etária (anos)	Soroprevalência da toxoplasmose (sexo M-F)		
	SPJ	Caju	VdG
≤ 30	21,0 (20,0-22,0)	30,0 (32,0-27,0)	60,0 (57,0-61,0)
31-50	41,0 (41,0-41,0)	48,0 (53,0-44,0)	75,0 (66,0-81,0)
≥ 51	54,0 (57,0-51,0)	48,0 (44,0-53,0)	69,0 (67,0-71,0)
Total	31,0 (31,0-31,0)	38,0 (40,0-37,0)	65,0 (62,0-68,0)

M: masculino; F: feminino; SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças

Na Figura 10, onde as faixas etárias são de dez anos e, portanto, oferecem maiores detalhes em relação ao perfil de distribuição da toxoplasmose de acordo com a idade, pode-se observar a diferença no perfil de soroprevalência da toxoplasmose nas três

populações. Em SPJ (Figura 10, painel da esquerda) a prevalência nos primeiros dez anos de vida é inferior a 20%, ela dobra na próxima década e se mantém estável em torno de 30% até os indivíduos com até 40 anos de idade. Na próxima faixa etária há um aumento brusco, para cerca de 60%, seguida por uma queda e aumento bruscos até a última faixa analisada. Em Caju (Figura 10, painel central), a prevalência durante os 30 primeiros anos de vida, fica em torno de 30% e então sobe para o patamar de aproximadamente 50% nas próximas faixas etárias. Em VdG (Figura 10, painel da direita), a vila com as maiores prevalências observadas, vê-se que a toxoplasmose tem uma distribuição praticamente homogênea na população de todas as idades.

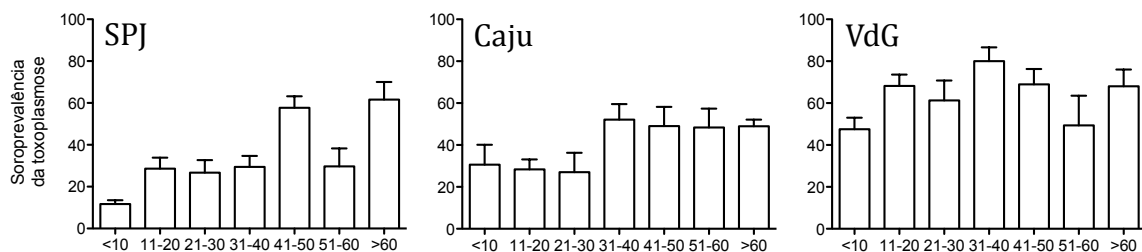


Figura 10: Distribuição das taxas de prevalência nas diferentes faixas etárias nos indivíduos provenientes das três vilas do Vale do Jequitinhonha. SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças. No eixo x estão apresentadas as diferentes faixas etárias em que foram separados os indivíduos: <10: até 10 anos, 11-20 de 11 a 20 anos; 21-30 de 21 a 30 anos, 31-40 de 31 a 40 anos, 41-50 de 41 a 50 anos, 51-60, de 51 a 60 anos e >60 indivíduos acima de 60 anos de idade.

4.2 A TOXOPLASMOSE OCULAR NO VALE DO JEQUITINHONHA

O exame de biometria realizado nos moradores do Vale do Jequitinhonha identificou 180 indivíduos com lesões oculares cicatrizadas dos três tipos (A, B e C) e nenhuma RC ativa (Tabela 12). As lesões A e B manifestam-se com maior frequência em indivíduos soropositivos. Já lesões do tipo C não foram consideradas como casos de TO, uma vez que elas aparecem em iguais frequências em indivíduos infectados e não infectados. Portanto, indivíduos infectados com lesões oculares cicatrizadas dos tipos A ou B foram considerados casos de COT o que constituiu 68 casos. Isso indica que 11,7% (68/583) dos indivíduos infectados manifestaram TO nas três vilas do Vale do Jequitinhonha. Considerando cada vila separadamente, Caju apresentou o menor número de casos, um total de 6, que representa 4,4% dos indivíduos infectados, SPJ apresentou 25 casos (13,2% dos soropositivos) e VdG com 37 casos, o que inclui 14,4% dos infectados.

Tabela 12: Distribuição dos casos de lesões oculares em relação à sorologia anti-*T. gondii* nos indivíduos do Vale do Jequitinhonha

Sorologia	Tipos de lesões oculares ¹			Sem lesão	Total
	A	B	C		
Soropositivos	23 (3,9%)*	45 (7,2%)*	40 (6,9%) ^{ns}	475	583
Soronegativos	03 (0,3%)	14 (1,8%)	55 (7,1%)	701	773
Total	26	59	95	1176	1356

¹Teste de χ^2 realizado comparando-se a frequência de lesões de cada tipo sobre o total de indivíduos soropositivos e soronegativos; * $p < 0,0001$; ^{ns} $p > 0,05$.

Assim como demonstrado em outros trabalhos, a distribuição da TO na população do Vale do Jequitinhonha aumenta com a idade, como o demonstrado na Figura 11. Enquanto nos indivíduos com menos de 10 anos, ela ocorre em menos de 5% dos infectados, em indivíduos com mais de 51 anos, a ocorrência ultrapassa os 15%. A idade média dos indivíduos afetados foi de 46,7 anos ($\pm 23,3$, desvio padrão).

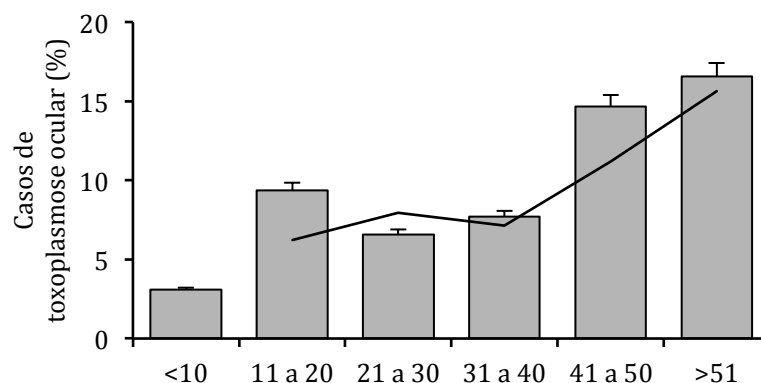


Figura 11: Distribuição da TO de acordo com as faixas etárias dos indivíduos do Vale do Jequitinhonha. No eixo x estão apresentadas as diferentes faixas etárias em que foram separados os indivíduos: <10: até 10 anos, 11-20: indivíduos de 11 a 20 anos; 21-30: indivíduos de 21 a 30 anos, 31-40: indivíduos de 31 a 40 anos, 41-50 de 41 a 50 anos e >51, indivíduos com mais de 51 anos de idade. A linha indica a tendência de aumento da manifestação da toxoplasmose de acordo com a idade.

A classificação das lesões em tipos A, B e C, não leva em consideração a localização no globo ocular, contudo, essa informação auxilia a distinguir as lesões congênitas, frequentemente maculares das adquiridas, frequentemente periféricas (Holland, 2009). Dos 68 casos de TO há registro de localização e número de lesões para 66 pacientes tendo em vista que dois pacientes não possuem o desenho das lesões na ficha do exame oftalmológico realizado na área de campo e não fizeram a retinografia posterior em Belo Horizonte (Tabela 13). Nos 66 pacientes, 86 olhos apresentaram lesões. Na maioria dos

casos, a lesão ocorre em apenas um olho (72,7%) nos casos restantes, em ambos os olhos (27,3%).

Em relação ao número de lesões, no total de 66 pacientes para os quais haviam dados disponíveis, foram identificadas 148 lesões. Isso significa que, em média há 2,2 lesões/paciente. No entanto, a maioria dos pacientes (53%) apresenta apenas uma lesão (35/66), enquanto que 31,8% apresenta de 2 a 3 lesões (21/66) e os 15,2% restantes apresentam mais de 3 lesões (10/66).

Tabela 13: Caracterização dos achados oftalmológicos nos indivíduos com toxoplasmose ocular, provenientes do Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais

Retinocoroidite	Nº de lesões	Nº de olhos	Nº de pacientes
Unilateral	72	48	48
Bilateral	76	36	18
Não classificados ¹	2	2	2
Total	150	86	68
Número	Nº de lesões	Nº de olhos	Nº de pacientes
Apenas uma	NA	35	35
De 2 a 3	NA	33	21
Mais que 3	NA	16	10
Total	NA	84	66
Localização²	Nº de lesões (Zn1/Zn2/Zn3)³	Nº de olhos	Nº de pacientes
Zona 1	15/0/0	13	12
Zona 2	0/38/0	33	26
Zona 3	0/0/25	18	14
Zonas 1 e 2	9/14/0	6	6
Zonas 1 e 3	4/0/8	4	4
Zonas 2 e 3	0/13/8	7	6
Zonas 1, 2 e 3	3/5/6	3	3
Total	31/70/47	84	71

¹Indivíduos sem desenho do fundo de olho na ficha de avaliação e sem retinografia.

²Divisão do olho em 3 zonas, de acordo com o proposto por (Holland; Buhles *et al.*, 1989). ³Número de lesões localizadas em cada uma das zonas do olho. NA: não se aplica. Zn1, 2 ou 3: Zonas 1, 2 ou 3.

Quanto à localização das lesões na retina, foi utilizado o esquema proposto por Holland e Buhles, em 1989, que divide a retina em 3 zonas (Figura 7d) (Holland; Buhles *et al.*, 1989). A maioria dos pacientes apresenta apenas uma das zonas da retina afetada (73,2%). Nesses pacientes, a maioria das lesões se localiza na região periférica,

constituída pelas zonas 2 e 3 (80,8%) e o restante localiza-se na zona 1, onde se concentra a região macular (19,2%). O restante dos pacientes (26,8%) apresenta extensas lesões cobrindo de duas ou três zonas da retina, ou múltiplos focos de lesões distribuídos em duas ou mais zonas da retina em um ou ambos os olhos. Nesse critério, alguns pacientes que apresentam ambos os olhos afetados, foram contabilizados duas vezes, já que a localização das lesões é diferente no olho esquerdo em relação ao olho direito. Informações detalhadas de cada caso de TO estão descritas no ADENDO B.

Lesões numerosas e extensas, podem representar maior grau de inflamação ou maior número de episódios de reativação da infecção. Dessa forma, observa-se que há três faixas etárias em que os pacientes apresentam maior número de lesões: durante a primeira década de vida, entre 31 e 40 anos e acima de 51 anos de idade (Figura 12).

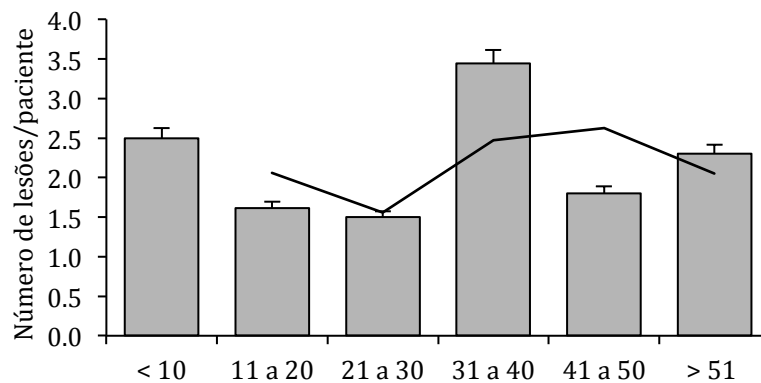


Figura 12: Número de lesões por paciente de acordo com a faixa etária. No eixo y: número de lesões dividido pelo número de casos de TO em cada faixa etária. No eixo x estão apresentadas as diferentes faixas etárias em que foram separados os indivíduos: <10 até 10 anos, 11-20 de 11 a 20 anos; 21-30 de 21 a 30 anos, 31-40 de 31 a 40 anos, 41-50 de 41 a 50 anos e >51, indivíduos com mais de 51 anos de idade. A linha indica a tendência da distribuição do número de lesões de acordo com as faixas etárias.

Por outro lado, quando se avalia o tamanho das lesões, observa-se uma medida média de 4,4 diâmetros de disco (dd) por paciente ($\pm 1,9$ dd de desvio padrão). Avaliando a distribuição de tamanho de acordo com cada faixa etária, observam-se lesões relativamente menores nos grupos de indivíduos com até 10 anos de idade, de 21 a 40 anos, enquanto que os pacientes nas faixas etárias de 11 a 20 e acima de 41 anos, apresentam lesões de maior extensão (Figura 13).

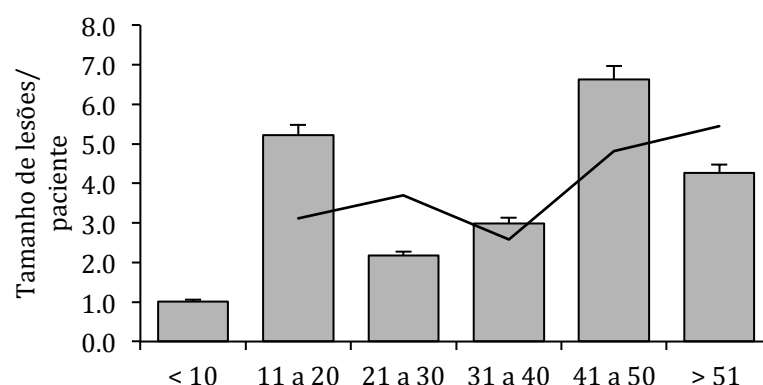


Figura 13: Tamanho das lesões por paciente de acordo com a faixa etária. No eixo y: média do tamanho das lesões por caso de TO em cada faixa etária. Tamanho da lesão foi calculado usando como base um diâmetro de disco (dd) de 1500 μ m. No eixo x estão apresentadas as diferentes faixas etárias em que foram separados os indivíduos: <10 até 10 anos, 11-20 de 11 a 20 anos; 21-30 de 21 a 30 anos, 31-40 de 31 a 40 anos, 41-50 de 41 a 50 anos e >51, indivíduos com mais de 51 anos de idade. A linha indica a tendência da distribuição do tamanho da lesão de acordo com as faixas etárias.

4.3 DESCRIÇÃO DOS PEDIGREES

A construção de pedigrees estendidos foi feita usando-se os modelos 1 e 2 do programa MENDEL, versão 4.0 (Lange; Sinsheimer *et al.*, 2005). Para tanto, baseou-se nos dados confirmados pela genotipagem de 11 microssatélites e corrigidos usando o programa PEDCHECK (O'Connell e Weeks, 1998), para cada vila (Tabela 14).

Tabela 14: Sumário dos pedigrees estendidos identificados nas vilas de São Pedro do Jequitinhonha, Caju e Virgem das Graças, no Vale do Jequitinhonha

	SPJ	Caju	VdG
Nº de pedigrees	27	19	21
Nº de indivíduos afetados	25	6	37
Nº de indivíduos inacessíveis	1199	738	797
Total de indivíduos amostrados	609	354	393
População amostrada no pedigree principal - (nº e %)	551 (90,5%)	320 (90,4%)	316 (80,4%)
População do pedigree principal	1928	1295	1464
Nº de indivíduos afetados em singletons ¹	2	NA	NA
Total de indivíduos	2126	1300	1466

¹Indivíduos em singleton são aqueles sem informação de qualquer parente, computados apenas os singletons com caso de TO; SPJ: São Pedro do Jequitinhonha; VdG: Virgem das Graças.

Em SPJ, a população foi dividida em 27 pedigrees, enquanto que no Caju, foram identificados 19 pedigrees e em VdG, o total de 21 famílias. Apesar de ter sido identificado mais de um pedigree em cada região, cerca de 90% dos moradores de SPJ e Caju e 80% dos moradores de VdG se concentram em um único pedigree grande e os demais se localizam em famílias com poucas gerações ou núcleos familiares (Tabela 14).

Como a maioria dos casos de TO se distribui em um único pedigree e a visualização das famílias nos pedigrees estendidos é dificultada pelo número de componentes, foi realizada a separação dos casos em pedigrees reduzidos. Para tanto, foi utilizado o modelo 2 do programa MENDEL versão 4.0 (Lange; Sinsheimer *et al.*, 2005), que considera o número mínimo de pessoas na família capaz de agrupar o maior número de casos da doença. Os pedigrees reduzidos foram então facilmente desenhados para visualização da estrutura familiar (Figura 14), utilizando-se o programa MADELINE, versão 2.0 (Trager; Khanna *et al.*, 2007).

Na figura 14, indivíduos soropositivos estão representados em azul, com a simbologia padrão de pedigrees, onde o círculo representa indivíduos do sexo feminino e quadrados indicam indivíduos do sexo masculino. Em amarelo, indivíduos que apresentam sorologia negativa para toxoplasmose e em branco, indivíduos sem dados sorológicos. Indivíduos com TO são identificados pelo número de lesões oculares que apresentam. De todos os indivíduos apresentados, dois (CAJ_541 e SPJ_293, Pedigree_02 e _03, respectivamente) apresentam sorologia positiva, porém não apresentam lesões oculares.

Pela análise dos pedigrees reduzidos das famílias de SPJ, dos 25 casos de lesão ocular encontrados na região dois não possuem informação de pedigree. Esses indivíduos não foram, portanto, incluídos na análise genética, mas fizeram parte dos ensaios imunológicos. Dos casos restantes, dez estão distribuídos em três famílias com mais de um indivíduo afetado pela TO (Figura 14, Pedigree_03, _04 e _05). Os treze casos restantes estão separados em núcleos familiares contendo apenas um indivíduo afetado (desenhos dos pedigrees não mostrados).

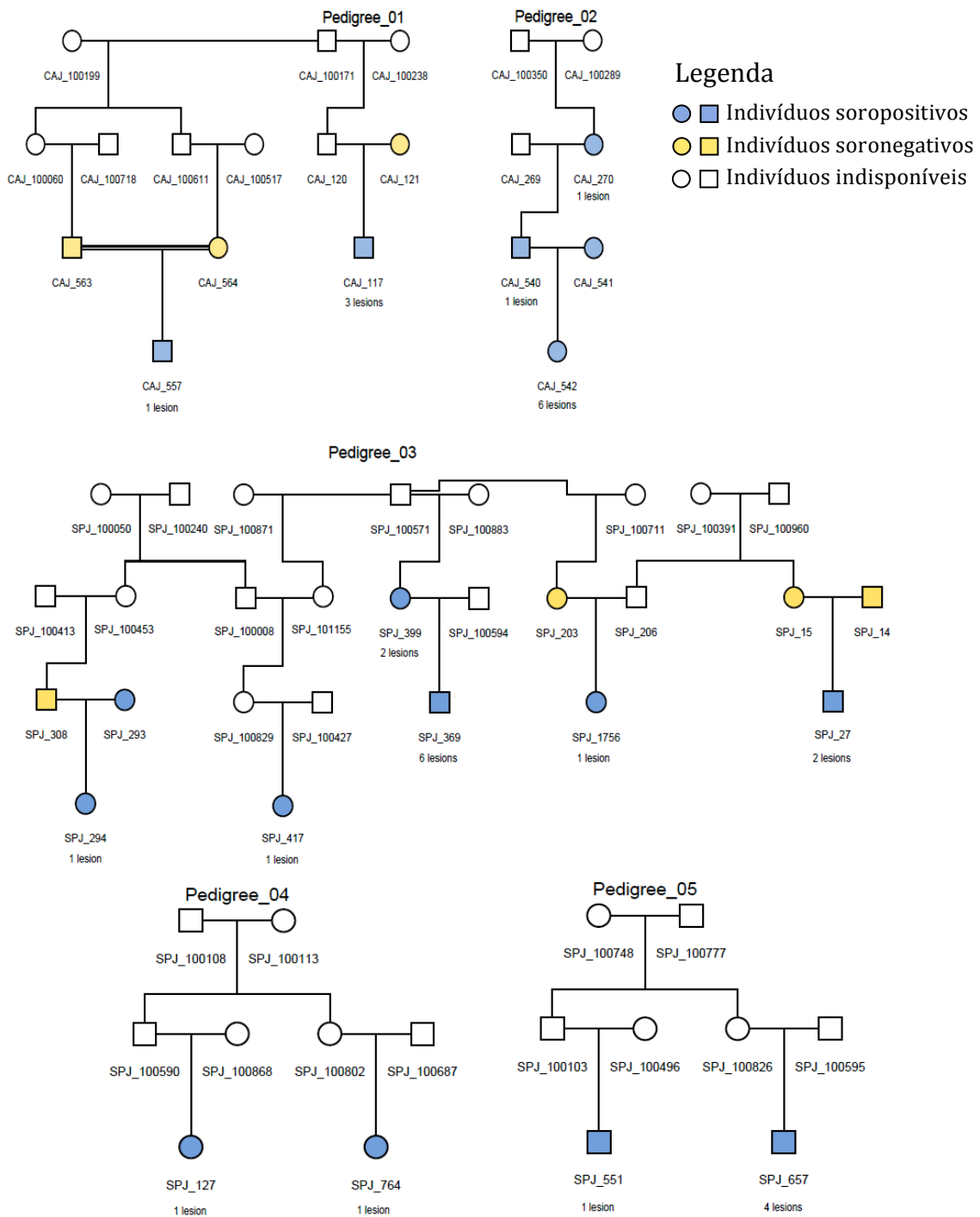


Figura 14: Desenho dos pedigrees reduzidos para as áreas de Caju (1, 2) e SPJ (3, 4 e 5), utilizando o programa MADELINE, versão 2.0 (Trager; Khanna et al., 2007). Em amarelo, indivíduos soronegativos para toxoplasmose (IE<1,1); em azul, indivíduos soropositivos (IE>1,1); e em branco, indivíduos sem sorologia para toxoplasmose. Cada indivíduo foi identificado por seu número de identificação (ID) que é único. Os casos de TO são identificados pelo número de lesão que cada um apresenta, descrito abaixo do ID de cada indivíduo. Os quadrados representam indivíduos do sexo masculino e os círculos representam indivíduos do sexo feminino. Traço duplo conectando dois indivíduos representa matrimônio consanguíneo (Pedigree_01).

Já em Caju, dos seis casos de TO, cinco pacientes estão agrupados em duas famílias com mais de um caso (Figura 14, Pedigree_01 e _02) e apenas um indivíduo está separado em um núcleo familiar distinto, com apenas um indivíduo afetado (não mostrado).

A região de VdG concentra a maioria dos casos de TO. Nessa área, 18 casos estão distribuídos em uma mesma família. Do restante dos casos, 11 estão distribuídos em 5 famílias com mais de um caso e 8 estão dispostos em núcleos familiares com apenas um indivíduo afetado. Os pedigrees com casos múltiplos de TO provenientes de VdG estão representados no ADENDO C.

Para as análises posteriores de poder amostral e associação alélica baseada em famílias, cada família multicaso foi destrinchada em núcleos familiares, de forma a conter apenas os casos e seus pais. O número e a estrutura dos núcleos familiares isolados do Vale do Jequitinhonha, bem como aqueles provenientes de Campos dos Goytacazes estão dispostos na Tabela 4.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS GENÉTICOS

4.4.1 Frequência dos alelos na população e cálculo de HWE

As frequências alélicas para as amostras provenientes do Vale do Jequitinhonha e Campos dos Goytacazes foram calculadas usando um grupo de indivíduos não relacionados e não afetados, provenientes das famílias dessas regiões (n=170) (Tabela 15). Informação do alelo ancestral também está apresentada na Tabela 15, de acordo com o disponível no banco de dados de SNPs do NCBI (dbSNP). Para comparação, as frequências das populações YRI e CEU encontram-se listadas na Tabela 8.

Também foram feitos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg no mesmo grupo de indivíduos. Do total de 43 marcadores, dois: IFN- γ rs1861493 ($p=0,032$) e TLR2 rs1816702 ($p=0,004$) estão fora das proporções esperadas para o HWE e não foram incluídos nas análises de associação alélica subsequentes (Tabela 15, *itálico*).

Tabela 15: Frequência de alelos comuns e valores de *p* para HWE para os tag-SNPs dos genes candidatos genotipados nas amostras do Vale do Jequitinhonha e Campos dos Goytacazes analisadas em conjunto (Continua)

Identificação do SNP	Alelos	Alelo ancestral ¹	Alelo Comum	Frequência do alelo comum ²	HWE <i>p</i> -valor
IL-10rs1800896	C/T	T	T	0,70	0,685
IL-10rs3024490	C/A	C	C	0,62	0,337
IL-10rs1518111	C/T	C	C	0,62	0,354
ABCA4rs952499	T/C	C	T	0,54	0,412
ABCA4rs1761375	G/A	G	G	0,74	0,100
ABCA4rs1801574	C/G	G	C	0,79	0,682
ABCA4rs3112831	T/C	C	T	0,63	0,406
ABCA4rs2297633	G/T	T	G	0,79	0,260
TLR5rs1053954	T/C	T	C	0,89	0,390
TLR5rs1341987	C/G	C	G	0,63	0,950
IL-12rs568408	G/A	G	G	0,86	0,535
MyD88rs6853	A/G	G	A	0,80	0,600
MyD88rs7744	A/G	G	A	0,86	0,129
TLR9rs187084	A/G	G	A	0,65	0,565
<i>TLR2rs1816702</i>	<i>C/T</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>0,76</i>	<i>0,032</i>
TLR2rs1898830	A/G	A	A	0,75	0,920
TLR4rs10759932	T/C	T	T	0,82	0,172
TLR4rs2770146	T/C	T	T	0,61	0,530
TLR4rs2149356	G/T	T	G	0,67	0,574
TLR4rs7873784	G/C	C	G	0,87	0,667
UNC93B1rs11228120	C/T	T	T	0,86	0,084
UNC93B1rs308328	T/C	C	T	0,56	0,394
TIRAPrs7932766	C/T	C	C	0,78	0,146
TIRAPrs8177374	C/T	C	C	0,87	0,201
P2RX7rs2230911	C/G	C	C	0,83	0,313
P2RX7rs2230912	A/G	A	A	0,73	0,267
P2RX7rs208293	C/T	C	C	0,63	0,930
P2RX7rs3751143	C/A	A	A	0,79	0,669
P2RX7rs1718119	G/A	A	G	0,63	0,114
P2RX7rs1621388	G/A	G	G	0,64	0,124
IRAK4rs1461567	G/A	G	G	0,94	0,549
IRAK4rs4251429	G/C	C	G	0,88	0,250
IRAK4rs4251513	C/G	C	C	0,65	0,116

Tabela 15: Conclusão

Identificação do SNP	Alelos	Alelo ancestral ¹	Alelo Comum	Frequência do alelo comum ²	HWE p-valor
<i>IFN-γrs1861493</i>	<i>A/G</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>0,86</i>	<i>0,004</i>
COL2A1rs1635544	G/A	G	G	0,52	0,755
COL2A1rs1793958	G/A	G	G	0,54	0,412
COL2A1rs2070739	C/T	C	C	0,87	0,168
COL2A1rs2276454	G/A	G	G	0,54	0,482
COL2A1rs2276455	G/A	G	G	0,56	0,448
COL2A1rs3803183	A/T	A	A	0,75	0,776
NOD2rs3135499	A/C	C	C	0,58	0,800
NOD2rs2111235	G/A	G	G	0,66	0,681
NOD2rs2076753	G/T	G	G	0,75	0,816

¹Alelo ancestral de acordo com informação disponível no banco de dados de SNP do NCBI (dbSNP);
²Frequência do alelo comum em indivíduos não afetados e não relacionados, derivados das famílias de Campos dos Goytacazes e do Vale do Jequitinhonha. HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg. Itálico: marcadores com proporções de alelos fora do esperado no HWE; Negrito azul: marcadores não informativos. Ambos foram excluídos das análises de associação alélica.

4.4.2 Cálculo do poder amostral

Estimativas do poder amostral foram realizadas antes dos testes de associação alélica nas famílias do Vale do Jequitinhonha, MG (n = 61) e trios de Campos dos Goytacazes, RJ (n = 68), usando o método descrito por Knapp em 1999, que foi implementado no Excel pela Profa. Heather Cordell (comunicação pessoal). O número de trios presentes nas famílias do Vale do Jequitinhonha e Campos dos Goytacazes e suas características encontram-se descritas na Tabela 4. O valor teórico de poder amostral, para detecção de associações alélicas com a TO, foi então calculado para diferentes valores de “odds ratio” (OR) usando marcadores putativos com diferentes frequências alélicas. Na Tabela 16, estão listados os resultados das aproximações primárias da porcentagem de poder amostral obtidos, para três valores de significância: $p = 0,05$, $p = 0,01$ e $p = 0,001$ nas amostras de Campos dos Goytacazes, Vale do Jequitinhonha e Brasil (quando foram consideradas todas as amostras em conjunto).

Como exemplo da interpretação dos cálculos de poder amostral (Tabela 16, em negrito itálico), pode-se deduzir que: para uma OR de 2 e MAF de um marcador de 0,3, os 61 trios do Vale do Jequitinhonha têm 83,3% de poder de detecção de associações alélicas

para $p = 0,05$; e 59,8% de poder para $p = 0,01$; enquanto que os trios de Campos dos Goytacazes têm, para os mesmos valores de significância, 86,8% e 65,5% de poder, respectivamente. Quando consideradas em conjunto (Brasil) o total de trios ($n = 129$) tem 98,6% de poder para $p = 0,05$ e 93,0% para $p = 0,01$. O poder reduz significativamente quando valores de p mais significativos e/ou menores OR são consideradas, particularmente para marcadores com baixa MAF ($\leq 0,15$).

Quando comparadas separadamente, as amostras de cada estado não apresentam poder suficientemente alto para detectar associações alélicas em marcadores com $MAF \geq 0,20$, portanto, nas análises posteriores, as amostras foram consideradas em conjunto (Brasil). Além disso, marcadores com frequência alélica menor que 0,15 na população (Tabela 15, negrito azul) foram excluídos das análises de associação, uma vez que o poder de detecção de associações com esses marcadores é muito baixo, mesmo considerando as amostras em conjunto. Portanto, do total de 43 marcadores genotipados, onze: TLR5 rs1053954, IL-12 rs568408, MyD88 rs7744, TLR4 rs7873784, UNC93B1 rs11228120, TIRAP rs8177374, IRAK4 rs1461567, IRAK4 rs4251429, IFN- γ rs1861493, COL2A1 rs2070739, TLR2 rs1816702 não fizeram parte das análises de associação alélica subsequentes.

4.4.3 Teste de associação alélica baseado em família (FBAT)

Na população brasileira, devido à miscigenação de povos de diferentes etnias, considera-se mais apropriado e robusto, o uso testes de associação alélica baseados em famílias (FBAT). As análises do tipo caso-controle, nesse tipo de população, são mais propensas a resultados espúrios e falsas associações, uma vez que fazem-se necessários o uso de marcadores étnicos para identificar o perfil de miscigenação de cada grupo utilizado nas análises.

Tabela 16: Estimativas do poder amostral pelo método proposto por Knapp para os trios de Campos dos Goytacazes RJ, Vale do Jequitinhonha MG e ambas as populações, Brasil

MAF do SNP	Efeito do alelo "Odds Ratio"	% Poder amostral nos trios de pais/filhos e caso/irmãos ¹								
		Campos dos Goytacazes, RJ (68 trios)			Vale do Jequitinhonha, MG (61 trios)			Brasil ² (129 trios)		
		<i>p</i> = 0,05	<i>p</i> = 0,01	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,05	<i>p</i> = 0,01	<i>p</i> = 0,001	<i>p</i> = 0,05	<i>p</i> = 0,01	<i>p</i> = 0,001
0,5	3	99,7	97,9	87,9	99,5	96,3	82,2	100,0	100,0	99,8
	2	87,7	67,2	36,0	84,3	61,5	30,4	98,8	93,8	76,8
	1,5	50,2	24,5	7,1	46,6	21,8	6,0	73,8	47,8	20,2
0,4	3	99,8	98,6	90,7	99,7	97,3	85,7	100,0	100,0	99,9
	2	88,6	68,6	37,5	85,3	63,0	31,8	99,0	94,4	78,5
	1,5	50,2	24,5	7,1	46,6	21,8	6,0	73,8	47,8	20,2
0,3	3	99,8	98,4	90,1	99,6	97,1	84,9	100,0	100,0	99,9
	2	86,8	65,5	34,3	83,3	59,8	29,0	98,6	93,0	74,9
	1,5	47,2	22,3	6,2	43,8	19,8	5,2	70,4	43,7	17,5
0,2	3	99,5	96,6	83,2	99,1	94,4	76,6	100,0	100,0	99,6
	2	80,4	55,5	25,3	76,4	50,1	21,2	96,6	86,7	62,2
	1,5	40,4	17,5	4,3	37,5	15,6	3,7	61,7	34,6	12,0
0,15	3	98,8	93,2	73,7	98,0	89,9	66,1	100,0	99,9	98,6
	2	73,5	46,5	18,7	69,2	41,6	15,5	93,5	78,8	49,9
	1,5	35,2	14,1	3,2	32,7	12,7	2,7	54,2	27,9	8,6
0,1	3	95,9	83,5	54,6	93,9	78,4	47,1	99,9	99,0	92,9
	2	61,6	33,7	11,1	57,5	29,9	9,2	85,5	63,4	32,3
	1,5	28,3	10,3	2,0	26,4	9,3	1,8	43,6	19,7	5,2
0,05	3	80,8	54,3	22,8	76,6	48,6	18,7	93,8	87,1	60,9
	2	41,2	17,5	4,1	38,1	15,5	3,5	50,5	35,6	12,1
	1,5	19,4	6,0	1,0	18,2	5,5	0,9	28,8	10,5	2,1

¹ Considerando apenas os trios para os quais se têm amostra de DNA; ² Constitui as amostras de Campos dos Goytacazes e Vale do Jequitinhonha analisadas em conjunto. MAF: frequência alélica do alelo minoritário; SNP: polimorfismo de base única; Efeito do alelo indica o nível de interferência do alelo no fenótipo estudado (TO), quanto maior esse valor, maior a interferência do alelo. Em negrito itálico, exemplo descrito no texto.

O método baseado em famílias tem como princípio o teste de desequilíbrio de transmissão, onde os alelos não transmitidos aos indivíduos doentes são usados como controle para os alelos transmitidos. As frequências dos alelos transmitidos são comparadas às frequências esperadas, segundo a primeira lei de Mendel (onde a frequência de transmissão é de 50:50 para cada alelo). Nas análises usando TDT, são levadas em consideração as transmissões envolvendo apenas indivíduos com pais heterozigotos. Quando um dos alelos é transmitido mais frequentemente do que o esperado, esse alelo pode estar associado ao traço avaliado em questão.

O método do FBAT também permite a inclusão de diferentes modelos de transmissão do alelo. Em nossas análises foram utilizados os modelos recessivo, aditivo e efeito do genótipo. No FBAT, dados parentais faltantes são resolvidos condicionando a configuração do genótipo da prole, os traços observados e os genótipos disponíveis dos pais para obter a hipótese nula.

Os resultados dos cálculos de FBAT, para os 32 marcadores estudados, após a exclusão daqueles que apresentaram proporções fora do esperado para o HWE, ou sem poder de detecção de associação para o tamanho amostral utilizado, foram resumidos nas Tabelas 17 e 18. Como para as análises de FBAT são consideradas apenas as famílias com pais heterozigotos, o número de famílias informativas para cada teste pode variar e também foi listado nas tabelas a seguir. A Tabela 17 mostra os resultados para as análises de FBAT de acordo com os modelos de herança aditivo e recessivo, enquanto que a Tabela 18 mostra os resultados para as análises dos marcadores segundo o modelo de genótipo.

No total da população brasileira, os resultados do modelo aditivo de herança mostram associação significativa entre TLR9, SNP rs187084, P2RX7, SNP rs1718119 e rs1621388 com a TO (Tabela 17). Os alelos G nos três SNPs são transmitidos em maior frequência nos indivíduos afetados pela TO ($Z=2,035$, $p=0,042$, $Z=2,521$, $p=0,012$ e $Z=2,031$, $p=0,042$, respectivamente).

Tabela 17: Resultados do teste de associação alélica entre 32 marcadores e a toxoplasmose ocular, nos trios provenientes do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro assumindo os modelos de herança aditiva e recessiva. As análises foram feitas no programa fbat assumindo a hipótese nula de “não ligação e não associação” (Continua)

Marcadores	Alelo	Frequência do alelo	Modelo de herança aditiva						Modelo de herança recessiva					
			Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
IL-10rs1800896	C	0,33	44	27	30,7	12,45	-1,039	0,298	11	3	4,14	2,44	-0,731	0,465
	T	0,67	44	65	61,3	12,45	1,039	0,298	38	22	19,47	9,32	0,827	0,408
IL-10rs3024490	C	0,65	40	45	46,8	12,97	-0,509	0,611	31	12	13,11	7,14	-0,416	0,678
	A	0,35	40	37	35,2	12,97	0,509	0,611	19	8	7,28	4,23	0,351	0,725
IL-10rs1518111	C	0,68	40	49	47,8	12,69	0,327	0,743	32	14	13,47	7,34	0,195	0,846
	T	0,32	40	33	34,2	12,69	-0,327	0,743	18	6	6,64	3,92	-0,322	0,747
ABCA4rs952499	T	0,53	46	51	53,3	14,46	-0,596	0,552	33	15	14,66	7,60	0,125	0,900
	C	0,47	46	45	42,7	14,46	0,596	0,552	24	12	9,39	5,30	1,133	0,257
ABCA4rs1761375	G	0,72	37	51	52,0	12,07	-0,288	0,773	34	17	17,06	7,96	-0,021	0,983
	A	0,28	37	29	28,0	12,07	0,288	0,773	12	6	5,06	2,51	0,593	0,553
ABCA4rs1801574	G	0,22	28	15	19,0	0,22	-1,317	0,187	6	4	2,72	1,36	1,097	0,272
	C	0,78	28	45	41,0	0,22	1,317	0,187	27	19	13,72	6,69	2,041	0,041
ABCA4rs3112831	T	0,66	32	38	41,1	10,38	-0,962	0,336	27	11	12,79	6,29	-0,715	0,474
	C	0,34	32	30	26,9	10,38	0,962	0,336	13	7	5,69	2,80	0,780	0,435
ABCA4rs2297633	T	0,23	30	21	17,5	0,82	1,172	0,241	5	1	1,34	0,97	-0,341	0,733
	G	0,77	30	39	42,5	0,82	-1,172	0,241	30	10	13,84	7,22	-1,427	0,153
TLR5rs1341987	G	0,62	48	63	61,5	15,36	0,383	0,702	39	19	18,47	9,32	0,173	0,863
	C	0,38	48	39	40,5	15,36	-0,383	0,702	19	7	7,97	4,23	-0,472	0,637
MyD88rs6853	G	0,18	23	19	15,5	7,19	1,305	0,192	6	4	2,08	1,29	1,691	0,090
	A	0,82	23	27	30,5	7,19	-1,305	0,192	21	8	9,58	5,04	-0,706	0,480
TLR9rs187084	G	0,32	44	39	31,5	13,40	2,035	0,042	13	6	5,19	2,77	0,487	0,626
	A	0,68	44	51	58,5	13,40	-2,035	0,042	39	12	18,64	9,08	-2,203	0,027

Tabela 17: Continuação

Marcadores	Alelo	Frequência do alelo	Modelo de herança aditiva						Modelo de herança recessivo					
			Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
TLR2rs1898830	G	0,31	40	28	25,08	11,24	0,870	0,384	7	2	2,17	1,35	-0,144	0,886
	A	0,69	40	54	56,92	11,24	-0,870	0,384	39	15	18,08	9,15	-1,020	0,308
TLR4rs10759932	T	0,75	44	69	66,8	12,58	0,611	0,541	42	25	21,97	10,48	0,935	0,349
	C	0,25	44	25	27,2	12,58	-0,611	0,541	5	3	2,14	1,18	0,794	0,427
TLR4rs2770146	T	0,62	21	25	25,0	6,39	0,000	1,000	16	7	6,92	3,60	0,044	0,965
	C	0,38	21	19	19,0	6,39	0,000	1,000	10	4	3,92	2,16	0,057	0,955
TLR4rs2149356	T	0,40	32	25	26,4	10,74	-0,427	0,669	14	5	5,72	3,06	-0,413	0,679
	G	0,60	32	41	39,6	10,74	0,427	0,669	26	13	12,32	6,13	0,274	0,784
UNC93B1rs308328	T	0,48	41	38	44,83	14,31	1,806	0,070	29	9	11,92	6,51	-1,144	0,253
	C	0,52	41	48	41,17	14,31	-1,806	0,070	25	14	10,09	5,76	1,632	0,102
TIRAPrs7932766	T	0,23	18	13	13,67	5,22	-0,292	0,770	5	1	2,5	1,25	-1,342	0,179
	C	0,77	18	23	22,33	5,22	0,292	0,770	14	6	6,83	3,47	-0,447	0,655
P2RX7rs2230911	C	0,17	26	12	16,5	7,47	-1,646	0,099	4	1	1,00	0,75	0,000	1,000
	G	0,83	26	44	39,5	7,47	1,646	0,099	26	17	12,50	6,22	1,804	0,071
P2RX7rs2230912	A	0,17	19	15	16,1	5,51	-0,476	0,634	8	1	2,87	1,63	-1,461	0,144
	G	0,83	19	27	25,9	5,51	0,476	0,634	15	7	7,75	3,38	-0,408	0,683
P2RX7rs208293	G	0,62	40	54	48,42	14,85	1,449	0,143	32	21	14,58	7,52	2,340	0,019
	A	0,38	40	30	35,58	14,85	-1,449	0,143	21	9	8,17	4,59	0,389	0,697
P2RX7rs3751143	T	0,76	39	57	56,6	11,38	0,128	0,898	35	21	17,90	8,41	1,069	0,285
	G	0,24	39	27	27,4	11,38	-0,128	0,898	9	6	3,33	1,97	1,899	0,057
P2RX7rs1718119	G	0,68	40	66	57,3	12,05	2,521	0,012	36	26	17,75	8,80	2,781	0,005
	A	0,32	40	20	28,7	12,05	-2,521	0,012	10	3	3,50	2,13	-0,343	0,732

Tabela 17: Conclusão

Marcadores	Alelo	Frequência do alelo	Modelo de herança aditiva						Modelo de herança recessivo					
			Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
P2RX7rs1621388	A	0,33	37	18	24,75	11,05	-2,031	0,042	9	3	3,00	1,88	0,000	1,000
	G	0,67	37	58	51,25	11,05	2,031	0,042	34	23	16,25	8,05	2,379	0,017
IRAK4rs4251513	G	0,33	28	27	24,33	9,00	0,889	0,374	14	6	5,39	3,11	0,346	0,729
	C	0,67	28	29	31,67	9,00	-0,889	0,374	21	7	9,06	4,84	-0,935	0,349
COL2A1rs1635544	T	0,52	40	48	44,00	12,45	1,134	0,257	25	17	11,81	5,67	2,181	0,029
	C	0,48	40	36	40,00	12,45	-1,134	0,257	23	11	9,81	5,33	0,516	0,606
COL2A1rs1793958	G	0,55	43	57	51,33	14,22	0,972	0,331	32	15	14,44	7,60	0,201	0,840
	A	0,45	43	37	40,67	14,22	-0,972	0,331	20	6	9,11	4,55	-1,459	0,144
COL2A1rs2276454	G	0,57	42	49	45,5	14,64	0,915	0,360	29	15	11,89	6,58	1,212	0,225
	A	0,43	42	39	42,5	14,64	-0,915	0,360	26	10	10,39	6,00	-0,159	0,873
COL2A1rs2276455	A	0,41	40	34	40,33	13,17	-1,752	0,080	24	9	9,64	5,56	-0,272	0,786
	G	0,59	40	50	43,67	13,17	1,752	0,080	27	17	11,37	6,17	2,292	0,022
COL2A1rs3803183	T	0,28	38	24	29,83	11,02	-1,531	0,126	10	3	4,33	7,14	-0,912	0,361
	A	0,72	38	56	50,92	11,02	1,531	0,126	33	19	15,25	7,88	1,336	0,181
NOD2rs3135499	C	0,45	53	40	42,72	15,60	-0,688	0,492	19	3	7,17	4,10	-2,058	0,039
	A	0,55	53	70	67,28	15,60	0,688	0,492	44	18	19,45	10,25	-0,453	0,650
NOD2rs2111235	G	0,68	47	61	59,00	16,23	0,496	0,619	40	17	17,73	9,53	-0,235	0,814
	A	0,32	47	37	39,00	16,23	-0,496	0,619	19	5	7,73	4,42	-1,296	0,194
NOD2rs2076753	T	0,24	27	15	15,20	7,67	-0,072	0,942	4	2	1,50	0,86	0,535	0,592
	G	0,76	27	39	38,80	7,67	0,072	0,942	26	14	13,30	6,05	0,285	0,775

Frequência dos alelos no total de 301 indivíduos genotipados; Nº Fam: número de famílias informativas para cada teste; S e E(S) indicam a transmissão observada e esperada para o respectivo alelo; Var(S): variância. Valores positivos de Z indicam associação do dado alelo com a TO, enquanto que valores negativos, indicam o alelo não associado ou protetor. Ambos indicam associação significativa para valores nominais de $p \leq 0,05$. Em negrito azul, valores de p-valor significativos.

Quando o modelo recessivo de herança é considerado, cinco SNPs adicionais (um em ABCA4, um em P2RX7, dois em COL2A1 e um em NOD2) estão associados à TO. Em ABCA4, P2RX7, COL2A1, os alelos associados à TO: C em rs1801574; G em rs208293; T em rs1635544 e; G em rs2276455, são significativamente transmitidos em maior frequência para a prole afetada ($Z=2,041$, $p=0,041$; $Z=2,340$, $p=0,019$; $Z=2,181$, $p=0,029$ e; $Z=2,292$ $p=0,029$, respectivamente). No entanto, em NOD2, o alelo protetor C em rs3135499 é transmitido em menor frequência à prole afetada ($Z=-2,035$, $p=0,039$).

A análise de FBAT usando o modelo de herança de genótipo, os mesmos marcadores descritos nos modelos de herança recessiva e aditiva estão em associação com a TO (Tabela 18). No entanto, os genótipos: AA em rs187084 ($p=0,027$, $Z=-2,203$) no gene de TLR9; GA em rs208293 ($p=0,017$, $Z=-2,370$), GA em rs1718119 ($p=0,013$, $Z=-2,476$) e AG em rs1621388 ($p=0,023$, $Z=-2,276$) no gene de P2RX7; TC ($p=0,039$, $Z=-2,064$) em rs1635544 do gene COL2A1 e; CC em rs3135499 ($p=0,039$, $Z=-2,058$) no gene de NOD2 estão significativamente sub-representados nos indivíduos afetados com TO. Enquanto que os genótipos: GG em rs208293 ($p=0,019$, $Z=2,341$), GG em rs1718119 ($p=0,005$, $Z=2,781$) e GG em rs1621388 ($p=0,017$, $Z=2,379$) no gene de P2RX7; TT em rs1635544 ($p=0,029$, $Z=2,181$) e GG em rs2276455 ($p=0,021$, $Z=2,292$) no gene de COL2A1 estão significativamente super-representados nos indivíduos afetados pela TO.

A associação dos genes P2RX7, TLR9 e COL2A1 com a TO, já descrita anteriormente, foi confirmada no presente estudo (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008; Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010; Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009). O papel dos polimorfismos de P2RX7 na resposta ao parasito foi descrito em células humanas (Lees; Fuller *et al.*, 2010). No entanto, o papel do polimorfismo de TLR9 na resposta ao *T. gondii* ainda está por ser descrito e foi avaliado nesse trabalho (Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009). Já o papel de COL2A1 parece ser no desenvolvimento do olho humano e, portanto não foi testado nessa tese (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008).

A associação da TO com o receptor NOD2 é um dado inédito, e, portanto, os ensaios imunológicos foram feitos de forma a compreender o papel desse receptor na resposta imune frente à infecção com o *T. gondii*.

Tabela 18: Resultados do teste de associação alélica entre 32 marcadores e a toxoplasmose ocular, nos trios provenientes do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro assumindo o modelo de herança de genótipo. As análises foram feitas no programa fbat assumindo a hipótese nula de “não ligação e não associação” (Continua)

Marcadores	Genótipo	Frequência do genótipo	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
TLR9rs187084	GG	0,073	13	6	5,19	2,77	0,487	0,626
	GA	0,487	43	27	21,17	10,30	1,816	0,069
	AA	0,440	39	12	18,64	9,08	-2,203	0,027
IL-10rs1800896	CC	0,122	11	3	4,14	2,43	-0,731	0,464
	CT	0,411	44	21	22,39	11,07	-0,417	0,677
	TT	0,467	38	22	19,47	9,32	0,827	0,408
IL-10rs3024490	CC	0,396	31	12	13,11	7,14	-0,416	0,677
	CA	0,513	40	21	20,61	9,76	0,124	0,900
	AA	0,092	19	8	7,28	4,23	0,351	0,725
IL-10rs1518111	CC	0,441	32	14	13,47	7,34	0,195	0,846
	CT	0,470	40	21	20,89	9,84	0,035	0,972
	TT	0,089	18	6	6,64	3,93	-0,322	0,747
ABCA4rs952499	TT	0,248	33	15	14,66	7,60	0,125	0,900
	TC	0,571	46	21	23,96	11,36	-0,877	0,380
	CC	0,181	24	12	9,39	5,31	1,133	0,257
ABCA4rs1761375	GG	0,449	34	17	17,06	7,96	-0,021	0,983
	GA	0,541	36	17	17,88	8,87	-0,295	0,767
	AA	0,010	12	6	5,06	2,51	0,593	0,553
ABCA4rs1801574	GG	0,046	6	4	2,72	1,36	1,097	0,273
	GC	0,350	28	7	13,56	6,87	-2,501	0,012
	CC	0,604	27	19	13,72	6,69	2,041	0,041
ABCA4rs3112831	TT	0,427	27	11	12,79	6,29	-0,715	0,474
	TC	0,460	32	16	15,51	7,80	0,175	0,861
	CC	0,113	13	7	5,69	2,80	0,780	0,435
ABCA4rs2297633	TT	0,024	5	1	1,34	0,97	-0,341	0,733
	TG	0,402	30	19	14,83	7,47	1,527	0,127
	GG	0,574	30	10	13,84	7,22	-1,427	0,153
TLR5rs1341987	GG	0,389	39	19	18,47	9,32	0,173	0,863
	GC	0,458	48	25	24,56	11,76	0,130	0,897
	CC	0,154	19	7	7,97	4,24	-0,472	0,637
MyD88rs6853	GG	0,014	6	4	2,08	1,29	1,691	0,090
	GA	0,328	22	11	11,33	5,44	-0,143	0,886
	AA	0,657	21	8	9,58	5,04	-0,706	0,480
TLR2rs1898830	GG	0,102	7	2	2,17	1,35	-0,144	0,886
	GA	0,412	40	24	20,75	9,74	1,041	0,298
	AA	0,486	39	15	18,08	9,15	-1,020	0,308

Tabela 18: Continuação

Marcadores	Genótipo	Frequência do genótipo	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
TLR4rs10759932	TT	0,578	42	25	21,97	10,48	0,935	0,349
	TC	0,352	43	19	22,89	10,73	-1,187	0,235
	CC	0,071	5	3	2,14	1,18	0,794	0,427
TLR4rs2770146	TT	0,346	16	7	6,92	3,60	0,044	0,965
	TC	0,541	21	11	11,17	5,14	-0,074	0,941
	CC	0,113	10	4	3,92	2,16	0,057	0,955
TLR4rs2149356	TT	0,159	14	5	5,72	3,06	-0,413	0,679
	TG	0,490	31	15	14,96	7,64	0,016	0,987
	GG	0,351	26	13	12,32	6,13	0,274	0,784
UNC93B1rs308328	TT	0,235	29	9	11,92	6,51	-1,144	0,252
	TC	0,490	41	20	20,99	10,22	-0,312	0,755
	CC	0,276	25	14	10,09	5,76	1,632	0,103
TIRAPrs7932766	TT	0,047	5	1	2,50	1,25	-1,342	0,179
	TC	0,365	17	11	8,67	4,22	1,136	0,256
	CC	0,588	14	6	6,83	3,47	-0,447	0,655
P2RX7rs2230911	CC	0,035	4	1	1,00	0,75	0,000	1,000
	CG	0,273	26	10	14,50	6,47	-1,769	0,077
	GG	0,692	26	17	12,50	6,22	1,804	0,071
P2RX7rs2230912	AA	0,009	8	1	2,87	1,63	-1,461	0,144
	AG	0,328	19	13	10,38	4,51	1,232	0,218
	GG	0,663	15	7	7,75	3,38	-0,408	0,683
P2RX7rs208293	GG	0,336	32	21	14,58	7,52	2,341	0,019
	GA	0,561	38	12	19,25	9,36	-2,370	0,017
	AA	0,103	21	9	8,17	4,59	0,389	0,697
P2RX7rs3751143	TT	0,555	35	21	17,90	8,41	1,069	0,285
	TG	0,404	38	15	20,77	9,38	-1,883	0,059
	GG	0,042	9	6	3,33	1,97	1,899	0,058
P2RX7rs1718119	GG	0,423	36	26	17,75	8,79	2,781	0,005
	GA	0,514	39	14	21,75	9,79	-2,476	0,013
	AA	0,063	10	3	3,50	2,13	-0,343	0,731
P2RX7rs1621388	AA	0,074	9	3	3,00	1,88	0,000	1,000
	AG	0,501	36	12	18,75	8,79	-2,276	0,023
	GG	0,425	34	23	16,25	8,05	2,379	0,017
IRAK4rs4251513	GG	0,169	14	6	5,39	3,11	0,346	0,729
	GC	0,317	28	15	13,56	6,99	0,555	0,582
	CC	0,514	21	7	9,06	4,84	-0,935	0,349

Tabela 18: Conclusão

Marcadores	Genótipo	Frequência do genótipo	Nº Fam	S	E(S)	Var(S)	Z	Valor p
COL2A1rs1635544	TT	0,272	25	17	11,81	5,67	2,181	0,029
	TC	0,504	39	14	20,37	9,57	-2,064	0,039
	CC	0,224	23	11	9,80	5,34	0,516	0,060
COL2A1rs1793958	GG	0,259	32	15	14,44	7,60	0,201	0,840
	GA	0,574	41	25	22,44	10,08	0,805	0,421
	AA	0,167	20	6	9,11	4,55	-1,459	0,145
COL2A1rs2276454	GG	0,319	29	15	11,89	6,58	1,212	0,224
	GA	0,504	41	19	21,72	10,52	-0,839	0,402
	AA	0,176	26	10	10,39	5,99	-0,159	0,873
COL2A1rs2276455	AA	0,166	24	9	9,64	5,56	-0,272	0,785
	AG	0,490	40	16	21,05	10,29	-1,575	0,115
	GG	0,344	27	17	11,31	6,17	2,292	0,021
COL2A1rs3803183	TT	0,060	10	3	4,33	2,14	-0,912	0,362
	TA	0,436	37	18	20,42	9,02	-0,805	0,421
	AA	0,505	33	19	15,25	7,88	1,336	0,182
NOD2rs3135499	CC	0,211	19	3	7,17	4,10	-2,058	0,039
	CA	0,487	53	34	28,38	13,10	1,552	0,121
	AA	0,302	44	18	19,45	10,25	-0,453	0,651
NOD2rs2111235	GG	0,448	40	17	17,73	9,53	-0,235	0,814
	GA	0,381	46	27	23,55	11,67	1,010	0,312
	AA	0,131	19	5	7,73	4,42	-1,296	0,194
NOD2rs2076753	TT	0,044	4	2	1,50	0,88	0,535	0,593
	TG	0,383	26	11	12,20	6,17	-0,483	0,629
	GG	0,573	26	14	13,30	6,05	0,285	0,776

Frequência dos genótipos no total de 301 indivíduos genotipados; Nº Fam: número de famílias informativas para cada teste; S e E(S) indicam a transmissão observada e esperada para o respectivo genótipo; Var(S): variância. Valores positivos de Z indicam associação de determinado genótipo com a TO, enquanto que valores negativos, indicam o genótipo não associado ou protetor. Ambos indicam associação significativa para valores nominais de $p \leq 0,05$. Em negrito azul, valores de p -valor significativos.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

4.5.1 A resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺: ativação e proliferação celular

Estudos anteriores sugerem que as células T de pacientes com TO apresentam alteração na capacidade de resposta a antígenos de *T. gondii* (Yamamoto; Vallochi *et al.*, 2000). Essa questão foi então investigada utilizando PBMCs de indivíduos soropositivos com e sem evidência de TO crônica (COT e NL, respectivamente). A expressão de MHC classe II

(HLA-DR) foi utilizada como marcador de ativação dos linfócitos T CD4⁺, tendo em vista que a expressão do HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ permanece elevada na fase crônica de infecções. As PBMCs foram estimuladas por 5 dias na presença de STAg e a frequência de células expressando HLA-DR foi avaliada (Figura 15 a e b).

Indivíduos em ambos os grupos soropositivos (COT e NL) apresentam frequência de células T CD4⁺HLA-DR⁺ significativamente mais alta, quando comparados ao grupo de indivíduos soronegativos (SN). Entre os grupos soropositivos, indivíduos com COT apresentam frequência significativamente menor de células T CD4⁺HLA-DR⁺, em comparação com o grupo NL (Figura 15a). Sob estimulação com STAg, os linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ apresentam a mesma capacidade proliferativa em ambos os grupos de indivíduos soropositivos (NL e COT), como pode ser observado pela avaliação da diluição do CFSE, após 5 dias de cultura (Figura 15b). No entanto, quando são comparados separadamente, ambos os grupos soropositivos apresentam diferença significativa na frequência de células T CD4⁺HLA-DR⁺CFSE^{lo} em relação ao SN.

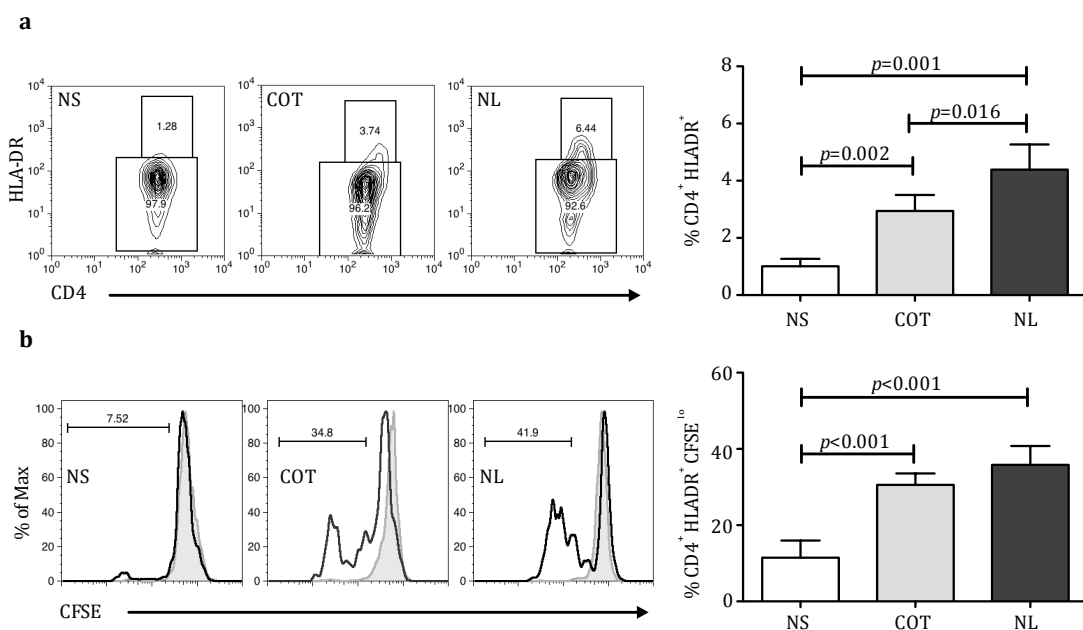


Figura 15: Frequência e proliferação de células T CD4⁺HLA-DR⁺ em pacientes soropositivos com e sem TO. **(a)** Gráficos de contorno representativos de um único indivíduo SN (à esquerda), COT (ao meio) e NL (à direita), mostrando a frequência de células HLA-DR⁺ dentro da população de linfócitos T CD4⁺, após cultura de cinco dias na presença de STAg. À direita, gráfico de barras representando a frequência (média ± erro padrão MEP) das células T CD4⁺ expressando HLA-DR. **(b)** As PBMCs foram marcadas com CFSE e cultivadas na presença de STAg por 5 dias a 37°C, 5% CO₂. Histogramas representam a diluição do CFSE em células T CD4⁺HLA-DR⁺ em um paciente SN (painel da esquerda), COT (painel central) e NL (painel da direita), quando as células foram cultivadas em presença (curva branca) ou ausência de STAg (curva cinza). À direita, gráfico de barras representando as frequências (±MEP) de células T CD4⁺HLA-DR⁺CFSE^{lo}. Em **a** e **b**, barras brancas, cinzas e pretas, representam pacientes SN (n=21), COT (n=59) e NL (n=25), respectivamente. *p* valores mostrados foram calculados usando Teste t de Student.

O mesmo ensaio foi realizado para os linfócitos T CD8⁺ (Figura 16). Indivíduos do grupo NL apresentam frequência de células T CD8⁺HLA-DR⁺ significativamente mais alta, em relação ao grupo NS. Em contraste, não há diferença da frequência dessas células entre os indivíduos NS e COT, ou COT e NL (Figura 16 à esquerda). Sob estimulação com STAg, os linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ apresentam a mesma capacidade proliferativa em ambos os grupos de indivíduos soropositivos (NL e COT), como pode ser observado pela avaliação da diluição do CFSE, após 5 dias de cultura (Figura 16 à direita). No entanto, as frequências de células T CD8⁺HLA-DR⁺CFSE^{lo} dos grupos soropositivos são diferentes em relação aos indivíduos soronegativos (SN).

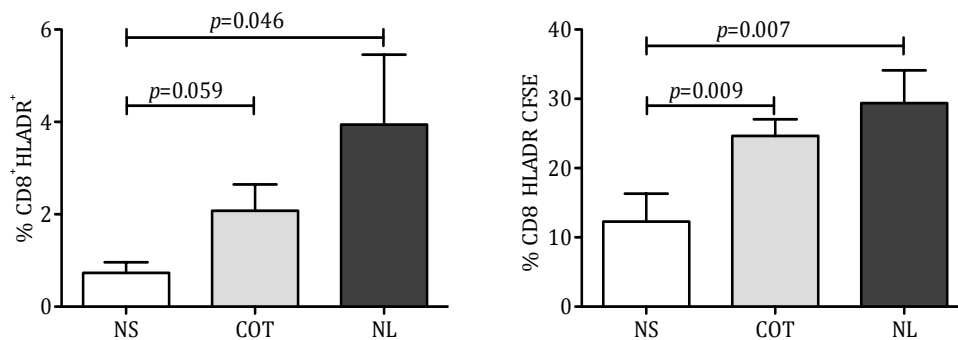


Figura 16: Frequência e proliferação de células T CD8⁺HLA-DR⁺ em pacientes soropositivos com e sem TO. As PBMCs foram marcadas com CFSE e cultivadas na presença de STAg por 5 dias a 37°C, 5% CO₂. À esquerda o gráfico de barras representando a frequência (±MEP) das células T CD8⁺ expressando HLA-DR. À direita, gráfico de barras representando as frequências (±MEP) de células T CD8⁺HLADR⁺CFSE^{lo}. As barras brancas, cinzas e pretas, representam pacientes SN (n=21), COT (n=59) e NL (n=25), respectivamente. *p* valores mostrados foram calculados usando Teste t de Student.

Em conjunto, esses resultados indicam que indivíduos com TO apresentam menores frequências de células T CD4⁺ ativadas capazes de responder a antígenos de *T. gondii*, em comparação com indivíduos soropositivos sem lesão. A capacidade proliferativa dessas células, no entanto, é semelhante entre os indivíduos soropositivos, mas difere dos indivíduos soronegativos.

4.5.2 Produção de citocinas Th1 e Th2 nos diferentes grupos de pacientes

Para acessar a produção de citocinas nos três diferentes grupos de indivíduos, o total de PBMCs foi colocado em cultura na presença ou ausência de STAg, por 8 horas. O sobrenadante de cultura foi coletado e a produção de citocinas foi aferida por CBA.

As PBMCs provenientes de indivíduos soropositivos produziram níveis significativos mais altos de IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-10 em comparação com indivíduos soronegativos (Figura 17). No entanto, os níveis dessas citocinas foram semelhantes nos grupos de indivíduos soropositivos (COT e NL), independente da presença de TO. Não houve diferença dos níveis de TNF- α quando comparados quaisquer dos grupos entre si. Não foi observada a produção de IL-4 em nenhum dos grupos de pacientes.

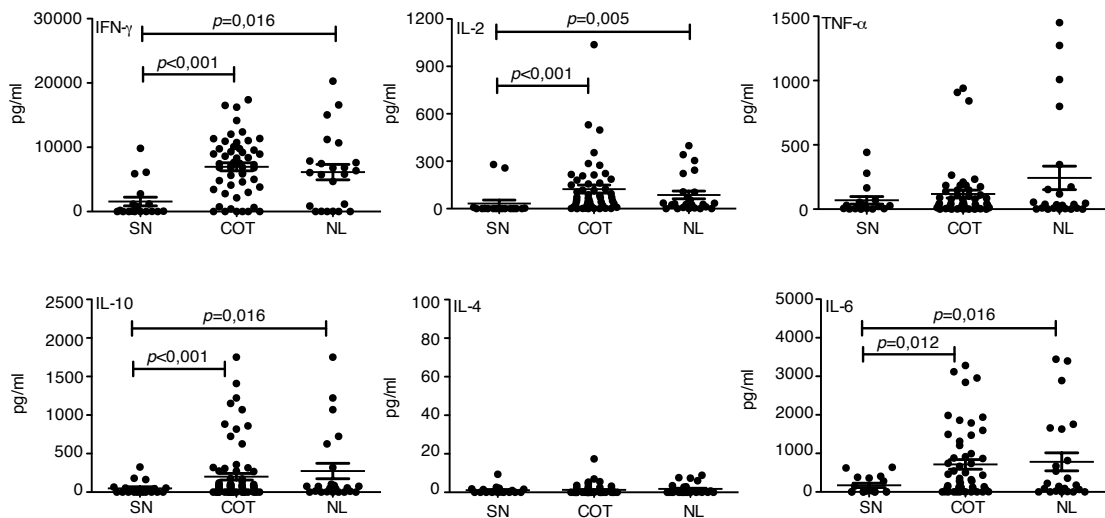


Figura 17: Produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 em sobrenadante de cultura de PBMCs de indivíduos com e sem TO. As PBMCs de indivíduos soronegativos (SN, n=21), de pacientes com COT (n=59), ou de indivíduos sem lesão ocular (NL, n=25) foram cultivadas por 8 horas na presença de STAg e os níveis de citocina no sobrenadante de cultura foi aferido por CBA. Nos gráficos, cada círculo preto representa um indivíduo. Os p valores foram calculados utilizando-se o teste t de Student.

Esses resultados indicam que indivíduos com toxoplasmose, independente do comprometimento ocular, apresentam um perfil similar de produção de citocinas, que inclui citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-6) e imunomodulatória (IL-10), mas não inclui a produção de citocinas Th2 (IL-4). No entanto, não se sabe se a frequência das células T CD4⁺, produtoras de citocinas Th1, principais citocinas na resposta protetora contra o *T. gondii* seria diferente nesses grupos de indivíduos.

4.5.3 A resposta de células Th1

Para avaliar a frequência de células T CD4⁺ produtoras de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2 e/ou TNF- α) em indivíduos com COT, NL e SN, PBMCs isoladas de indivíduos dos três grupos foram cultivadas por 16 horas em presença ou ausência de STAg. As células então foram

marcadas para as moléculas de superfície, CD4 ou CD8 e para as citocinas intracelulares: IFN- γ , IL-2 e TNF- α .

Das 7 possíveis combinações das 3 citocinas, os indivíduos soropositivos apresentam frequência significativamente mais alta das células: T CD4⁺ que produz simultaneamente IFN- γ , IL-2 e TNF- α (chamadas multifuncionais), IFN- γ e IL-2 mas não TNF- α e IFN- γ e TNF- α mas não IL-2 em comparação com indivíduos soronegativos (Figura 18a). No entanto, a frequência dessas células não foi diferente entre indivíduos NL e COT. Quando são analisados apenas os linfócitos T CD4⁺ responsivos, produtores de quaisquer uma, duas ou três das citocinas analisadas, o perfil da resposta Th1 é semelhante em indivíduos NL e COT (Figura 18b).

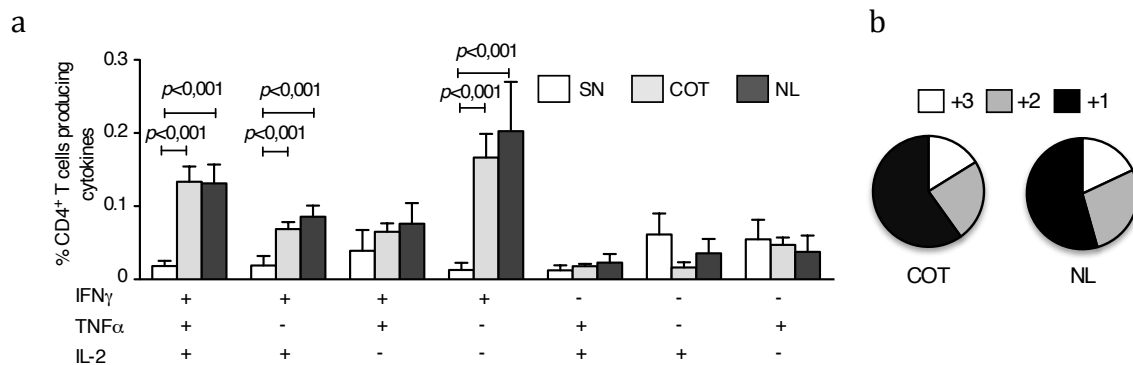


Figura 18: Resposta de células Th1 multifuncionais em indivíduos com e sem TO. PBMCs foram isoladas dos pacientes e cultivadas por 16 horas em presença ou ausência de STAg. As células foram então marcadas para a molécula CD4 e as citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Em (a) o gráfico de barra representa a frequência (\pm MEP) de células T CD4⁺ produzindo uma das sete combinações possíveis das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . nos três grupos de indivíduos SN (barras brancas, n=21), COT (barras cinzas, n=59) e NL (barras pretas, n=25). (b) Gráficos de pizza mostrando a fração da resposta total de células T CD4⁺, que compreende apenas as células que produzem quaisquer três (branco), duas (cinza) ou uma (preto) citocinas.

Esses resultados indicam que a resposta Th1, frente à infecção por *T. gondii*, é específica, sendo que está presente apenas nos indivíduos soropositivos e, essencialmente, semelhante nos indivíduos soropositivos, independente do comprometimento ocular. A presença de células triplo positivas indica a presença de resposta multifuncional específica contra antígenos do *T. gondii*.

4.5.4 A resposta de células Th17

A resposta Th17 também foi avaliada nos três grupos de indivíduos. Para tanto, inicialmente foi avaliada a produção de IL-17A no sobrenadante de cultura de PBMCs após 5 dias, na presença de STAg.

As PBMCs provenientes de indivíduos com COT produzem níveis significativamente mais altos de IL-17A quando comparados com o grupo de indivíduos NL (Figura 19). PBMCs de indivíduos soronegativos e NL, no entanto, produzem níveis mais baixos dessa citocina em resposta ao STAg.

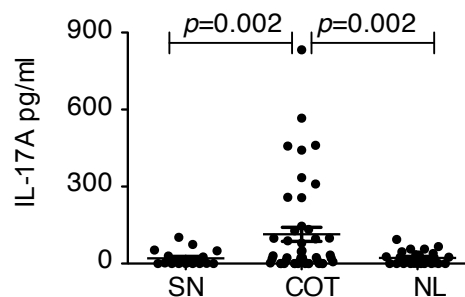


Figura 19: Produção de IL17-A em sobrenadante de cultura de PBMCs de indivíduos com e sem TO. As PBMCs de indivíduos soronegativos (SN, n=21), de pacientes com COT (n=59), ou de indivíduos sem lesão ocular (NL, n=25) foram cultivadas por 5 dias na presença ou ausência de STAg e os níveis de citocina no sobrenadante de cultura foi aferido por CBA. No gráfico, cada círculo preto representa um indivíduo. Os p valores foram calculados utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

A interleucina 17-A é uma citocina pró-inflamatória que pode ser produzida por alguns tipos celulares, como neutrófilos, eosinófilos e, principalmente células T CD4⁺. Uma vez que a produção de IL17-A está aumentada em indivíduos com TO, o próximo passo foi avaliar se, em indivíduos com TO esta citocina é produzida por células Th17. Também foi demonstrado que essas células são capazes de produzir outras citocinas, como IFN- γ , TNF- α e IL-4 (Aarvak; Chabaud *et al.*, 1999a; Aarvak; Chabaud *et al.*, 1999b; Albanesi; Scarponi *et al.*, 2000). Dessa forma, também foi avaliada a produção concomitante de IFN- γ e TNF- α . A produção de IL-4 não foi investigada uma vez que essa citocina não foi detectada em sobrenadante de cultura de PBMCs de indivíduos soropositivos em resposta ao STAg (Figura 17).

Para avaliar a presença de células Th17 em pacientes com TO, PBMCs dos três grupos de pacientes foram cultivadas por 16 horas em presença ou ausência de STAg. As células

então foram coletadas para marcação da molécula de superfície CD4 e das citocinas IL-17A e IFN- γ (Figura 20). Indivíduos dos grupos soropositivos (COT e NL) apresentam frequência significativamente maior de células produzindo apenas IFN- γ ou IL-17A e IFN- γ concomitantemente, quando comparados com o grupo de indivíduos SN (Figura 20 a e b). No entanto, nos indivíduos do grupo COT a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A está aumentada, em comparação com os grupos NL e SN (Figura 20b).

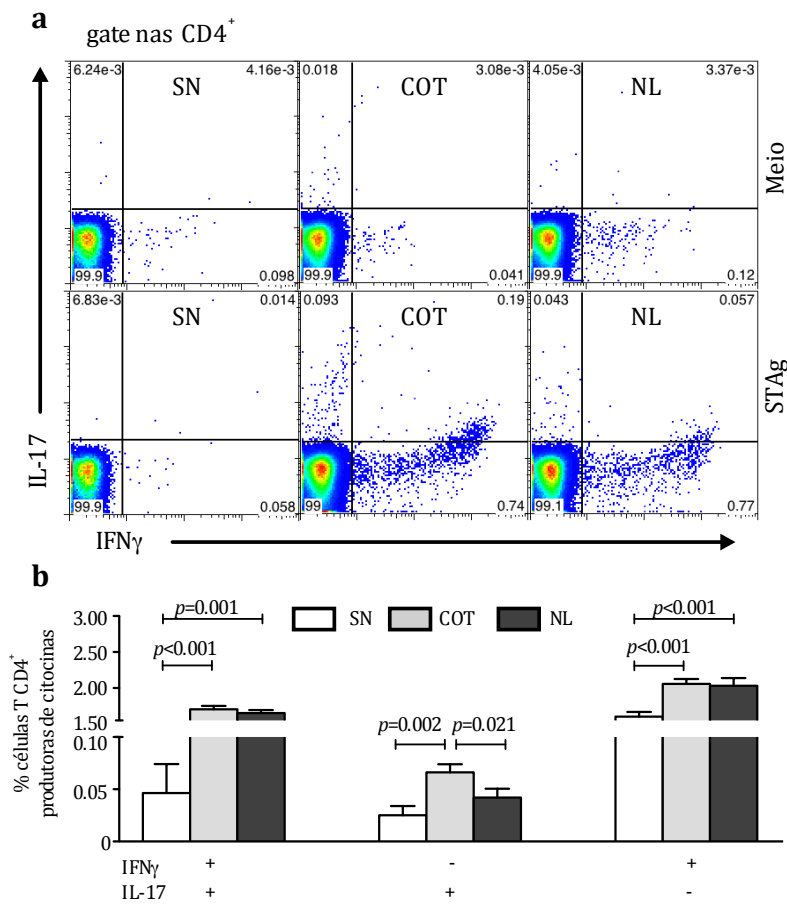


Figura 20: Frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A e IFN- γ em indivíduos com e sem TO. PBMCs dos três grupos de indivíduos foram estimuladas com ou sem STAg por 16 horas. (a) “Density plots” representativos mostrando a distribuição de células T CD4⁺ produzindo IL-17A, IFN- γ ou ambos após cultura na ausência (linha superior) ou presença de STAg (linha inferior). Cada “density plot” ilustra os dados para arquivos concatenados de 2 indivíduos SN (painéis à esquerda) 4 COT (painéis centrais) e 3 NL (painéis à direita). (b) Gráfico de barra mostrando a frequência média (\pm MEP) de células T CD4⁺ que produzem as três combinações possíveis das citocinas IL-17A e IFN- γ . *p* valores calculados com o teste t de Student.

Uma vez que indivíduos com COT apresentam maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A, em comparação com indivíduos sem comprometimento ocular, foi realizada uma caracterização mais pormenorizada dessas células T CD4⁺ com o objetivo de identificar se tratam-se de células Th17.

Para tanto, PBMC dos indivíduos com COT foram cultivadas por 16 horas em presença de STAg. Após a cultura, essas células foram marcadas para as moléculas de superfície CD4, CD27 e CD45RO, para as citocinas IL-17A e IFN- γ e para o fator de transcrição Tbet, tipicamente expresso em células Th1. Nesses indivíduos, a IL-17A provém de células, T CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺Tbet⁺IFN- γ , o que indica se tratar de células Th17 de memória (Figura 21).

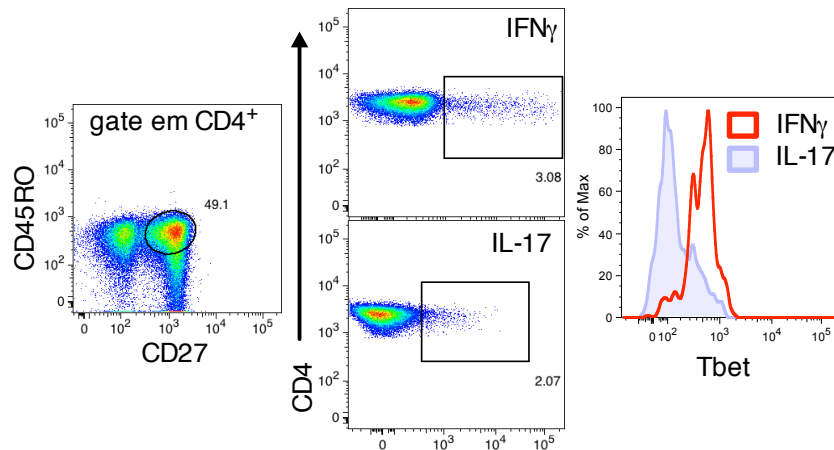


Figura 21: Caracterização fenotípica das células T CD4⁺ produtoras de IL-17A nos pacientes com lesão ocular. O painel da esquerda mostra o gate feito em células T CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ em um único paciente apresentando COT. Os dois painéis centrais mostram as células T CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺IFN- γ ⁺ (acima) e T CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺IL17A⁺ (abaixo). Painel à direita mostra um histograma representativo da expressão de Tbet nas populações de células T CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ produtoras de IFN- γ (linha vermelha) ou IL-17 (linha azul, com preenchimento azul claro) em um paciente dos seis pacientes com COT estudados nesse ensaio.

Em conjunto, esses resultados indicam que linfócitos Th17 produtores da citocina IL-17A podem estar envolvidos no desenvolvimento de lesões oculares durante a fase aguda, inflamatória da infecção por *T. gondii*. O estudo de células provenientes de pacientes com AOT é de extrema importância para na avaliação dessas células durante a fase ativa da TO. Além disso, também foi avaliado se os polimorfismos de NOD2 e TLR9 (rs3135499 e rs187084, respectivamente), associados ao desenvolvimento da TO, influencia a resposta das células Th17.

4.5.5 A produção de citocinas de acordo com os genótipos dos SNPs nos receptores da imunidade inata, associados à toxoplasmose ocular

4.5.5.1 Polimorfismos no gene de TLR9 e sua interação com a resposta anti-*T. gondii*

O papel de TLR9 na indução de resposta imune protetora frente a infecção por *T. gondii* é controverso. Contudo, o SNP rs352140 ($p=1,5 \times 10^{-5}$) foi relacionado ao desenvolvimento de TO em indivíduos com toxoplasmose congênita (Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009). Nesse trabalho, também foi encontrada associação do TLR9 com a TO, embora outro SNP tenha sido avaliado (rs187084, $p=0,042$).

Uma vez que houve associação do TLR9 com o desenvolvimento da TO na população avaliada aqui, foi averiguado o papel desse polimorfismo na produção de citocinas em resposta a antígenos do parasito. Para tanto, PBMCs de indivíduos soropositivos apresentando ou não TO foram cultivadas em presença de STAg por 8 horas. O sobrenadante de cultura foi então coletado e os níveis de citocinas aferido por CBA. Os indivíduos foram separados nos três possíveis genótipos para o SNP de TLR9 (Figura 22).

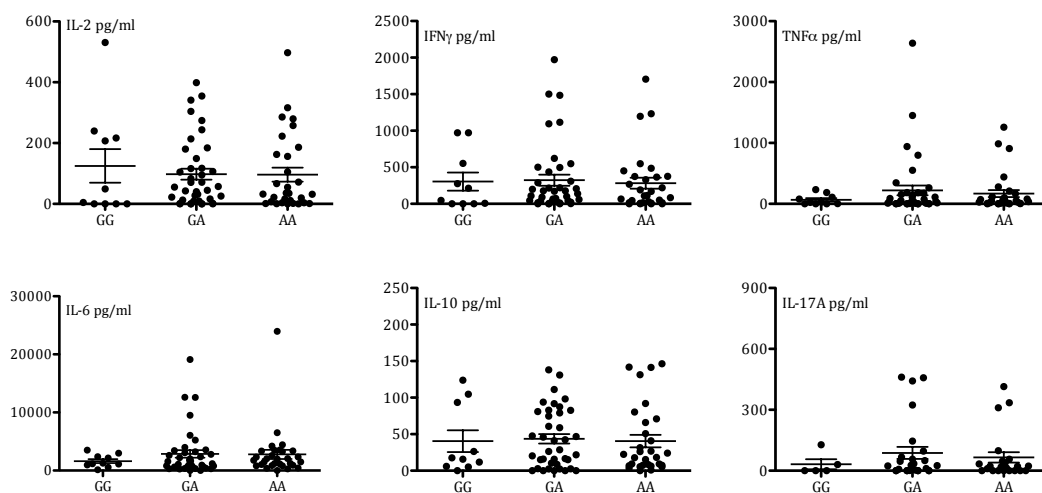


Figura 22: Distribuição da produção de citocinas Th1, imunomodulatória e Th17 em indivíduos soropositivos com ou sem TO (n=84) portadores dos diferentes genótipos do SNP rs187084, no gene de TLR9. Gráficos mostrando a produção de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2), imunomodulatória (IL-10) e Th17 (IL-17), para os diferentes genótipos do SNP rs187084. Cada indivíduo é representado por um círculo preto. Os p valores foram calculados utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

Indivíduos carregando o genótipo GG apresentam tendência a menor produção de TNF- α , IL-6 e IL-17, quando comparados aos indivíduos com os genótipos GA ou AA. No entanto, essa tendência não é significativa, quando comparadas a produção dessas citocinas, para o genótipo GG em relação aos dois outros genótipos (em comparação com GA: $p=0,08$, $p=0,06$ e $p=0,17$ para TNF- α , IL-6 e IL-17, respectivamente e, em comparação com AA: $p=0,25$, $p=0,25$ e $p=0,36$ para TNF- α , IL-6 e IL-17, respectivamente).

Esses dados indicam que o SNP em questão, rs187084 não influencia a produção de citocinas em resposta a antígenos do *T. gondii* por PBMCs de indivíduos soropositivos.

4.5.5.2 Polimorfismos no gene de NOD2 e sua interação com a resposta imune anti-*T. gondii*

Foi demonstrado que durante a infecção murina por *T. gondii*, o receptor NOD2 participa do processo de diferenciação de linfócitos Th1, através da estimulação da produção de IL-2 pelas células Th0, o que leva ao comprometimento dessas células para um fenótipo de produção de citocinas do tipo Th1. Apesar da produção normal de IL-12p40 nos animais deficientes para NOD2, a frequência de células produtoras de IFN- γ é diminuída em relação à produção observada em animais com o NOD2 funcional (Shaw; Reimer *et al.*, 2009). Além de sua contribuição no desenvolvimento de linfócitos Th1 no modelo murino, também foi demonstrado que NOD2 tem papel na indução da produção de IL-17A em células T de memória em humanos (van Beelen; Zelinkova *et al.*, 2007).

Neste trabalho, os SNPs selecionados no gene de NOD2 são representativos de toda a extensão do gene de NOD2 e não estão ligados entre si (Figura 23 a e b). Como demonstrado anteriormente, dos três SNPs genotipados (rs3135499, rs2111235 e rs2076753) o genótipo CC em rs3135499 ($p=0,039$, $Z=-2,058$) está significativamente sub-representado nos indivíduos afetados com TO (Tabela 18).

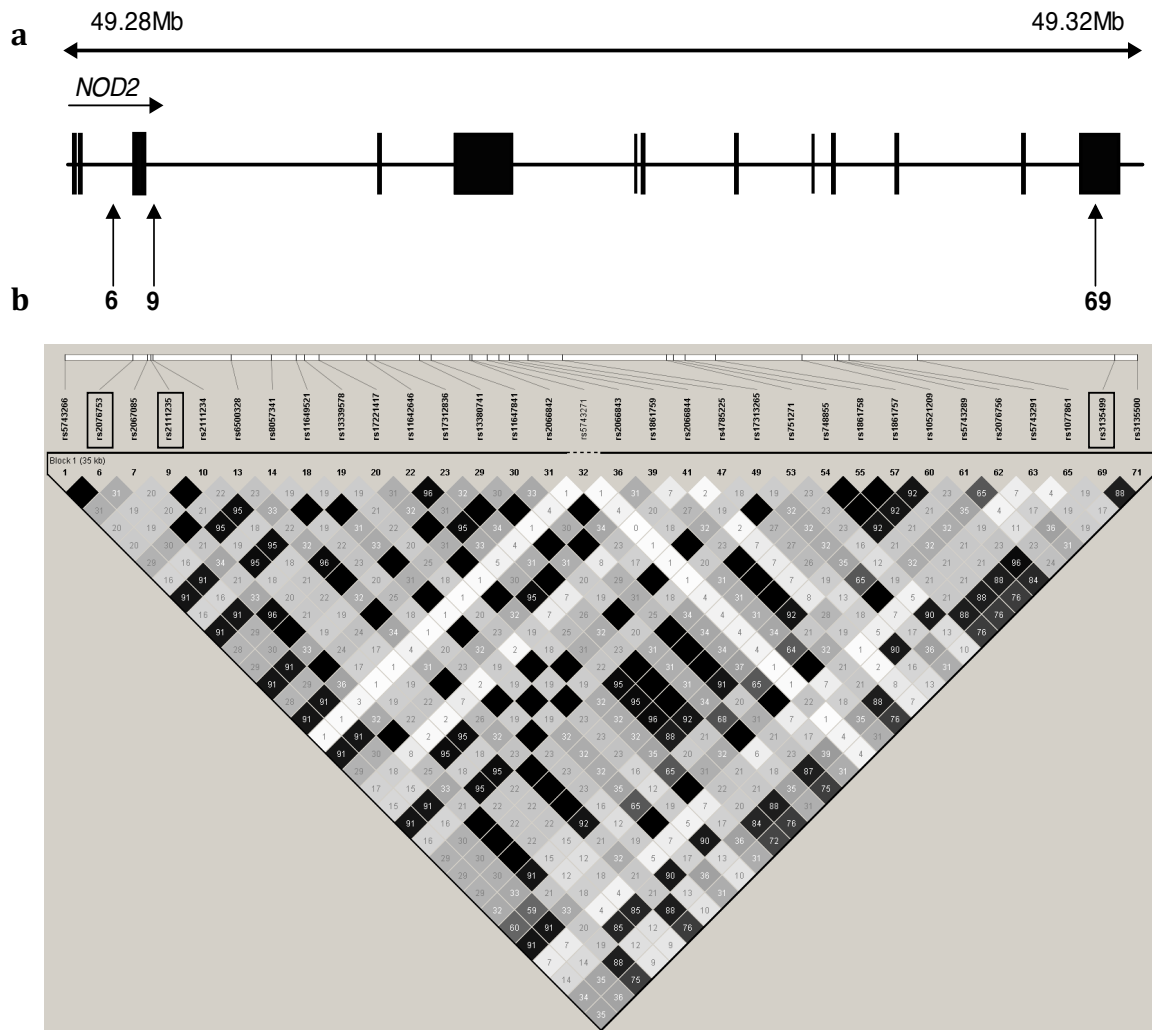


Figura 23: Análises do Haploview para os pares de medidas r^2 de desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs de NOD2 em fundadores não relacionados nas famílias brasileiras. **(a)** Diagrama da estrutura genômica de NOD2 indicando a posição dos 3 SNPs genotipados (apontados pelas setas verticais). Os número 6 indica o rs2076753, 9 o rs2111235 e 69 o rs3135499. Éxons estão representados por retângulos pretos. **(b)** Representação gráfica dos pares de medidas r^2 de LD através dos 3 SNPs de NOD2 genotipados no estudo. Estimativas de LD foram determinadas no programa Haploview v4.2 usando indivíduos não relacionados presentes nas famílias brasileiras. Valores de r^2 estão representados em branco para $r^2=0$, tons de cinza indicam valores intermediários de r^2 entre $0 < r^2 < 1$. Os números dentro dos quadrados representam os valores de r^2 para os pares de LD.

Para avaliar se NOD2 exerce algum papel na resposta imune celular nos indivíduos com TO, a produção de citocinas dos tipos Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2), imunomoduladora (IL-10) e Th17 (IL-17A) foi avaliada nos grupos de pacientes portando os diferentes genótipos para os três SNPs no gene NOD2, previamente genotipados.

Para tanto, PBMCs de indivíduos soropositivos apresentando ou não TO foram cultivadas na presença de STAg por 16 horas ou 5 dias. O sobrenadante de cultura foi coletado e os níveis de citocinas aferido por CBA. Os indivíduos foram então separados

nos três possíveis genótipos para cada um dos SNPs avaliados (Figura 24). Não foram, no entanto, encontradas diferenças na produção de quaisquer citocinas (Th1, Th2 ou Th17) entre os indivíduos portadores dos diferentes genótipos dos SNPs (rs2076753 e rs2111235) não associados com a TO (Tabela 18 e 19 e Figura 23, painéis à direita e centrais).

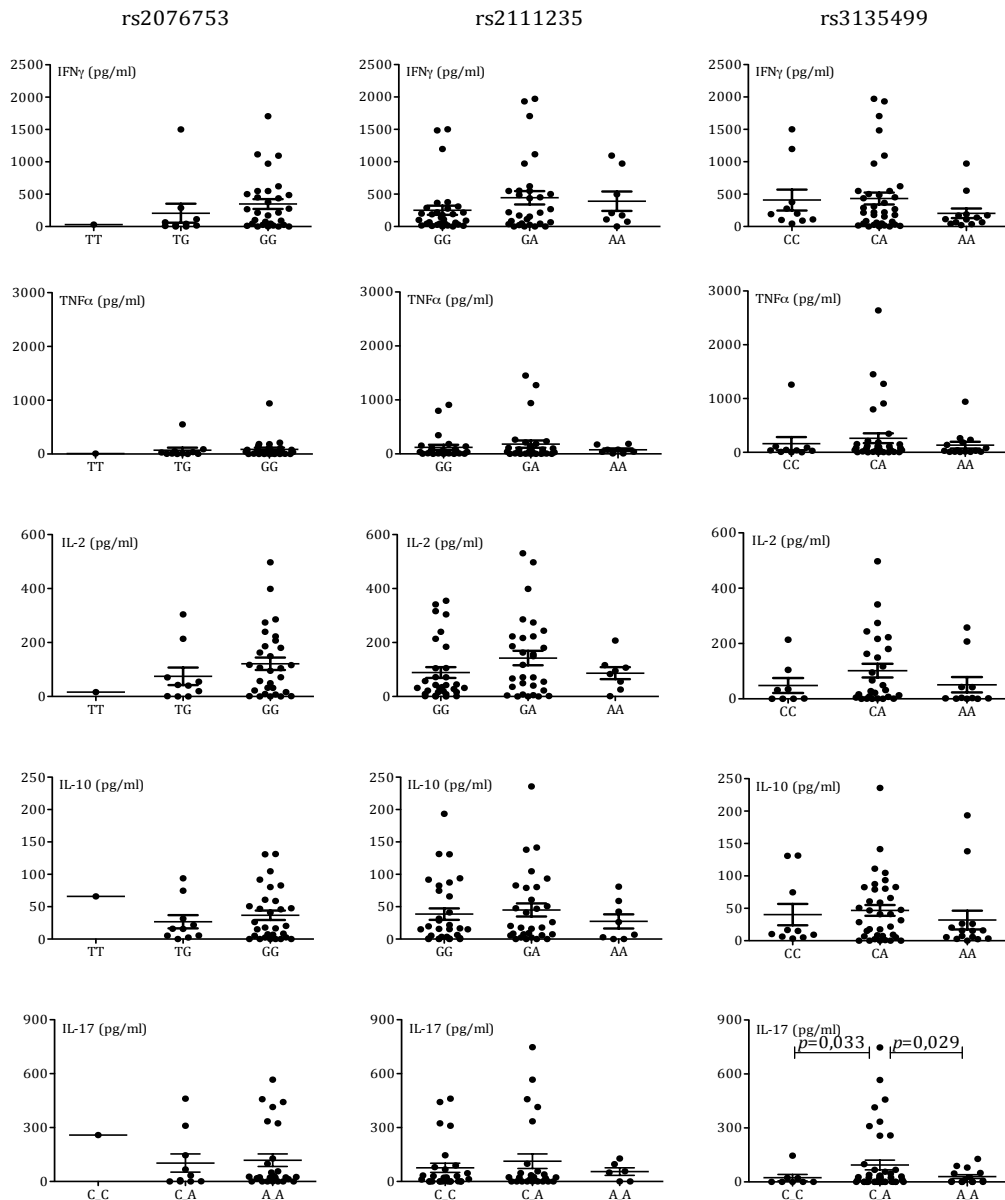


Figura 24: Distribuição da produção de citocinas Th1, imunomodulatória e Th17 em indivíduos soropositivos com ou sem TO (n=84) portadores de diferentes genótipos para os três SNPs avaliados, distribuídos no gene codificador de NOD2. Gráficos mostrando a produção de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2), imunomodulatória (IL-10) e Th17 (IL-17A), para os diferentes genótipos para o SNP rs2076753 (fileira à direita), rs2111235 (fileira central) e rs3135499 (fileira à esquerda). Cada indivíduo é representado por um círculo preto. Os p valores foram calculados utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

Por outro lado, indivíduos portadores do genótipo heterozigoto CA para o SNP rs3135499 apresentam maior produção de citocina IL-17A em comparação com os indivíduos portadores dos genótipos homozigotos (AA ou CC, $p=0,033$ e $p=0,029$, respectivamente) (Figura 24 fileira à direita, último painel).

Esses resultados indicam uma associação entre o gene de NOD2 e a produção de IL-17A, que por sua vez, pode ser relevante para a associação dessa citocina com o desenvolvimento de lesões oculares decorrentes da TO em humanos.

4.5.6 *A resposta imune celular em indivíduos com lesão ativa*

O estudo da resposta de células T CD4⁺ durante a fase ativa da TO é importante para confirmar se o perfil de resposta imune encontrado nos pacientes com a COT é semelhante ao encontrado durante a fase inflamatória.

Dessa forma, a resposta de células T foi avaliada em quatro pacientes com AOT. Esses pacientes foram encaminhados para o Hospital São Geraldo, onde foram avaliados por oftalmologistas especialistas em uveítes, sob orientação do professor Dr. Wesley Campos. Os dados clínicos dos pacientes bem como os achados dos exames de acuidade visual, biomicroscopia e oftalmoscopia, descritos no momento da coleta de sangue podem ser encontrados na Tabela 19.

Os achados descritos na Tabela 19 incluem diferentes parâmetros que, avaliados em conjunto, indicam a ocorrência de processo inflamatório nos pacientes. Os parâmetros analisados foram a presença de células na câmara e vítreo anteriores, aumento do “haze” vítreo, uma medida de opacificação do contorno do nervo óptico e “flare” da câmara anterior ou do vítreo, medida da opacidade do humor aquoso causada pelo extravasamento de proteínas dos vasos sanguíneos inflamados. A deposição de fibrina na córnea encontrada nos pacientes AOT_01 e AOT_02, também é decorrente de processo inflamatório. Portanto, quanto mais elevados o “flare” da câmara anterior, o “haze” vítreo e a estimativa do número de células na câmara e vítreo anteriores, maior o grau de inflamação no olho dos pacientes com AOT.

De uma forma geral, os pacientes apresentam alterações oculares e processo inflamatório compatíveis com a infecção por *Toxoplasma gondii*.

Tabela 19: Achados clínicos dos pacientes com toxoplasmose ocular ativa (AOT) examinados no hospital São Geraldo em Belo Horizonte, MG.

Paciente	Acuidade Visual	Tonometria ²	Biomicroscopia ³	Oftalmoscopia
	OD/OE	OD/OE	OA	OA
AOT_001	0.3/0.0	16/14	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia conjuntival 1+/4+ • Córnea transparente • Flare CA: 1+/4+ • Células CA: 2+/4+ • Fibrina na metade inferior da córnea 	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Placa de RC ativa adjacente a lesão cicatrizada próxima à arcada temporal superior • Segunda lesão cicatrizada próxima à arcada temporal inferior
AOT_002	0.0/1.0	12/13	OE apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia conjuntival 0+/4+ • Flare CA: 2+/4+ • Células CA: 2+/4+ • Fibrina no endotélio • Células VA: 2+/4+ 	OE apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Haze vítreo: 2+/4+ • Nervo óptico com borda fosca. • Placa de RC ativa com 2dd adjacente a lesão cicatrizada
AOT_003	0.7/0.0	17/17	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia conjuntival 1+/4+ • Córnea transparente • Flare CA: 1+/4+ • Células CA: 3+/4+ • Células VA: 1+/4+ 	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Haze vítreo: 3+/4+ • 2 lesões cicatrizadas maculares com RC ativa entre elas
AOT_004	0.3/0.0	NA	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia conjuntival 0+/4+ • Córnea transparente • Flare CA: 1+/4+ • Células CA: 3+/4+ • Células VA: 1+/4+ 	OD apresenta: <ul style="list-style-type: none"> • Haze vítreo: 1+/4+ • Lesão cicatrizada macular temporal com RC ativa adjacente

¹Acuidade visual medida na escala Logmar; ²Pressão intraocular em mmHg; ³Exame de biomicroscopia reportado de acordo com a nomenclatura padronizada por (Jabs; Nussenblatt *et al.*, 2005); OD: olho direito; OE: olho esquerdo; OA: olho afetado. NA: Dados não disponíveis; Células AC: estimativa do número de células na câmara anterior do olho (escala: número de células em um campo de 1mm²: 0 <1, 0.5+ 1-5, 1+ 6-15, 2+ 16-25, 3+ 26-50, 4+ >50); Flare CA: flare da câmara anterior (0 = nenhum, 1+ = pouco, 2+ = moderado, 3+ marcado e 4+ intenso); Células VA: estimativa do número de células no vítreo anterior (segue a mesma escala utilizada em Células CA); Haze vítreo: indica a obstrução de penetração da luz no vítreo (0 = nenhuma, 1+ = pouca, 2+ = moderada, 3+ marcada e 4+ intensa); RC retinocoroidite; dd: diâmetro de disco.

Para avaliar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias como IL-17A, IFN- γ , TNF- α no processo inflamatório que leva à RC decorrente da infecção por *T. gondii*, PBCMs dos quatro pacientes com AOT foram estimuladas por 5 dias na presença de STAg e os níveis dessas citocinas foram medidos por CBA.

Os níveis de IL-17A encontram-se aumentados nas culturas de células provenientes de indivíduos com AOT, frente à estimulação com STAg, em comparação com indivíduos soronegativos. Contudo, nos casos de AOT, os níveis de IFN- γ ou TNF- α no sobrenadante de cultura de PBMCs são semelhantes aos níveis encontrados para indivíduos soropositivos assintomáticos (Figura 25).

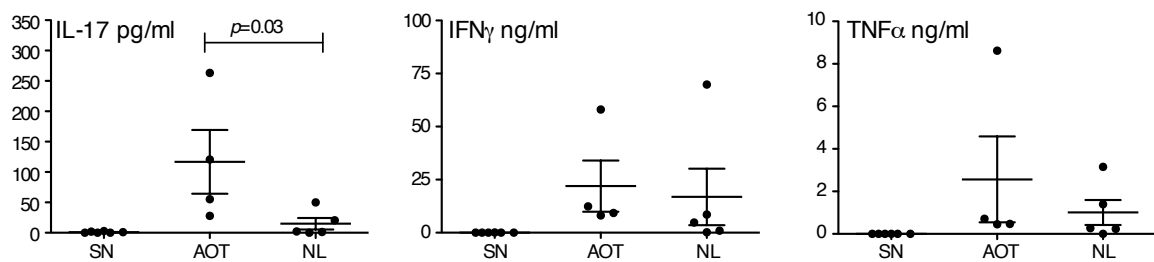


Figura 25: Produção de IL17-A, IFN- γ e TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMCs de indivíduos com e sem AOT. As PBMCs de indivíduos soronegativos (SN, n=6), de indivíduos com AOT (n=4), ou de indivíduos soropositivos sem lesão ocular (NL, n=5) foram cultivadas por 5 dias na presença de STAg e os níveis de citocina no sobrenadante de cultura foi aferido por CBA. No gráfico, cada círculo preto representa um indivíduo. Os p valores foram calculados utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

Para avaliar se indivíduos com AOT também apresentam frequência aumentada de células Th17, PBMCs dos quatro indivíduos com AOT foram cultivadas por 8 horas na presença de STAg. Após a cultura, essas células foram marcadas para as moléculas de superfície CD3, CD4, e CD45RO, para as citocinas IL-17A, TNF- α e IFN- γ e para o fator de transcrição T-bet.

Os indivíduos com AOT apresentam maior frequência de células T CD4⁺CD45RO⁺ produtoras de IL-17A, mas não de TNF- α ou IFN- γ em comparação com indivíduos soropositivos (p -valores de 0,035, 0,064 e 0,555 para células T CD4⁺CD45RO⁺ produtoras de IL-17A, TNF- α e IFN- γ , respectivamente) (Figure 26a). Quando se avalia apenas as células T CD4⁺CD45RO⁺T-bet⁻ produtoras de IL-17A, definidas como linfócitos Th17 (Figure 25b), a maioria delas produz apenas IL-17A. Apesar dessas serem as mais frequentes produtoras de IL-17A nos indivíduos com AOT, células T CD4⁺CD45RO⁺T-bet⁺ que adicionalmente produzem TNF- α ou IFN- γ , também foram encontradas nos pacientes com toxoplasmose ativa.

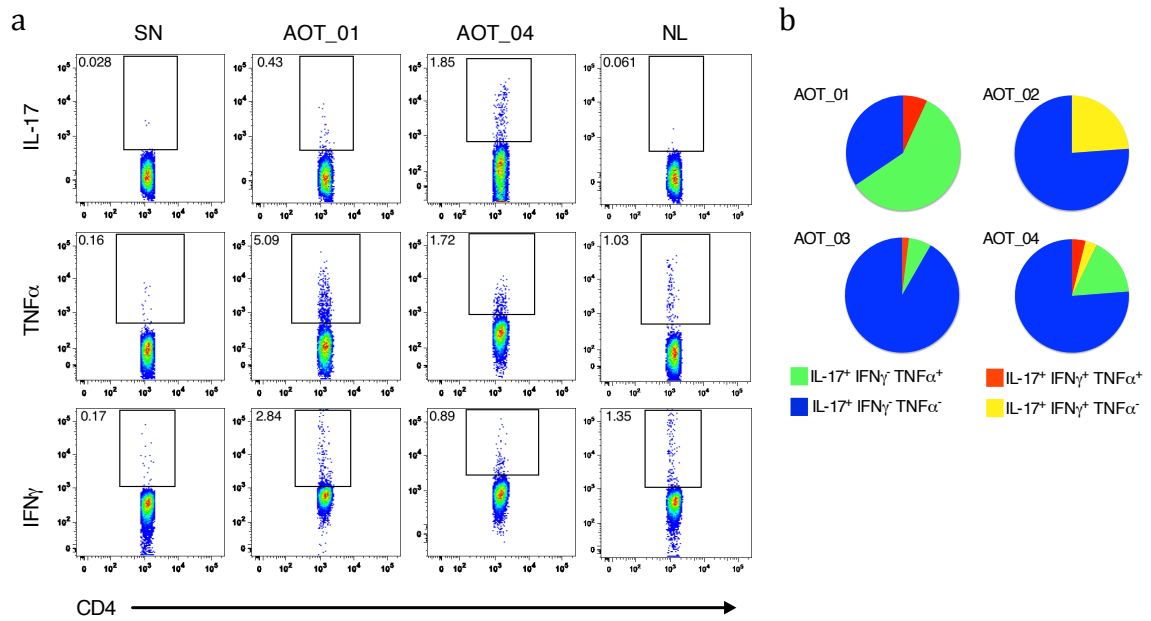


Figura 26: Perfil da resposta de células T CD4⁺CD45RO⁺ produtoras de IL-17A, TNF- α e IFN γ , nos indivíduos com AOT. **(a)** “Density plots” representativos mostrando a frequência de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ produzindo IL-17A, TNF- α ou IFN- γ , de um único indivíduo SN (painéis à esquerda), NL (painéis à direita) ou dois indivíduos com AOT: AOT_01 e AOT_04 (painéis centrais). **(b)** gráficos de pizza mostrando a distribuição dos subgrupos de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ produtores de IL-17A expressando quatro combinações de expressão das citocinas avaliadas (IL-17A, TNF- α e IFN γ) nos quatro pacientes com AOT (AOT_01 a AOT_04). As proporções de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ IL-17A⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁺, IL-17A⁺TNF- α ⁻IFN- γ ⁻, IL-17A⁺TNF- α ⁻IFN- γ ⁺ ou IL-17A⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁻ estão representadas de vermelho, azul, amarelo e verde, respectivamente.

Esses resultados indicam que os linfócitos Th17 podem contribuir para o processo inflamatório que leva à RC.

5 DISCUSSÃO

A prevalência da toxoplasmose varia nas diferentes regiões do mundo, de acordo com características da população, exposição a fatores de risco e condições climáticas favoráveis à manutenção dos oocistos no ambiente. De forma geral, a soroprevalência da toxoplasmose na população das vilas do Vale do Jequitinhonha, de cerca de 43%, está abaixo da reportada nos trabalhos realizados em estados brasileiros (para comparação, ver Tabela 1). No entanto, quando se analisa a prevalência de cada vila separadamente, observa-se que a prevalência encontrada em VdG está dentro da média nacional enquanto que a dos outros vilarejos a taxa de 30 a 40% está abaixo da média.

Vários fatores podem contribuir para a baixa soroprevalência nos vilarejos de SPJ e Caju. Apesar da investigação dos fatores de risco não ter sido objetivo direto desse trabalho, a análise da distribuição da soroprevalência nas diferentes faixas etárias pode auxiliar o entendimento dos principais fatores de risco aos quais determinada população estaria exposta.

Dessa forma, o perfil encontrado na Vila de SPJ, com taxas de prevalência que aumentam com a idade, podem refletir uma maior proporção de infecções decorrentes da infecção adquirida, provavelmente pelo consumo de carne crua ou mal cozida ou mesmo vegetais crus, como ocorre na França (Fromont; Riche *et al.*, 2009). No entanto, sabe-se que os animais de consumo humano que apresentam maior susceptibilidade à formação de cistos teciduais, são ovinos e caprinos, tipicamente pouco consumidos na região do norte de Minas Gerais (Tenter, 2009). Dessa forma, nessa localidade, seria mais provável a transmissão através da ingestão de vegetais crus contaminados diretamente com oocistos.

Em Caju, por sua vez, a prevalência é relativamente constante em indivíduos com idade até 30 anos. A taxa então quase dobra a partir da quarta década de vida. Isso indicaria uma exposição constante aos fatores de risco ao longo dos anos. No entanto, uma vez que a prevalência da infecção é menor em indivíduos com menos de 30 anos, pode-se

presumir que houve melhora nas condições de vida da população há cerca de 30 anos, o que teria acarretado a diminuição da taxa de prevalência nos indivíduos mais novos.

Já o perfil observado na vila de VdG, com altas taxas de prevalência ainda na infância, poderiam refletir uma maior proporção de infecções decorrentes de exposição ao solo, comumente mais frequente entre crianças que em adultos (Jones; Lopez *et al.*, 2001).

Outro ponto importante é que a fonte de água que abastece a região de VdG não recebe nenhum tipo de tratamento, enquanto que em SPJ e Caju a água é floculada e decantada para remoção das partículas em suspensão. A água é então mantida em caixas ou tanques de abastecimento fechados, em local inacessível ao hospedeiro definitivo. Esses cuidados diminuiriam os riscos de contaminação das fontes de água com oocistos. Apesar da provável atuação das diferentes vias de contaminação, faz-se necessária a realização de estudos epidemiológicos nas três vilas para se ter maior precisão das fontes de infecção e dos fatores de risco nessas localidades.

A infecção pelo *T. gondii* é causa frequente de RC posterior decorrente da infecção pelo parasito (Delair; Latkany *et al.*, 2011; Olariu; Remington *et al.*, 2011). A prevalência e a gravidade da TO variam muito e acredita-se que elas estejam sob influência da condição imune e genética do hospedeiro (Garweg e Candolfi, 2009; Mack; Johnson *et al.*, 1999), do genótipo das cepas infectantes (Behnke; Khan *et al.*, 2011), da soroprevalência da toxoplasmose na população em questão e da via de transmissão (Holland, 2004).

Na população do Vale do Jequitinhonha acessada nesse estudo, a manifestação das lesões oculares ocorre em 11,7% dos indivíduos soropositivos. As vilas de SPJ e VdG apresentam taxas semelhantes de manifestação da TO, em torno de 13 a 15%, enquanto que em Caju a manifestação ocorre em apenas 4,4% dos casos.

De maneira geral, a manifestação da doença ocular nos indivíduos que adquirem o parasito pela via congênita é mais frequente que naqueles que a adquirem após o nascimento (Holland, 2003). Dessa forma, a prevalência da TO numa comunidade, irá depender, em parte da proporção relativa de casos de infecção congênita e adquirida. A proporção de infecções congênitas varia geograficamente e depende da idade na qual se tem a primo-infecção por *T. gondii* e da proporção de mulheres que permanecem

soronegativas durante a idade reprodutiva e que permanecem, portanto, em risco de infecção inicial durante a gravidez (Holland, 2009). Por outro lado, a infecção adquirida depende da exposição aos fatores de risco. Apesar de não poder precisar a rota de transmissão pela qual cada paciente se infectou, o aumento do número de casos de TO com a idade, bem como o perfil constante de distribuição da soroprevalência da toxoplasmose em duas das regiões analisadas, permite presumir-se que a maioria dos casos de TO seja decorrente de infecções adquiridas.

Um fato que argumentaria contra essa afirmativa, é que as lesões podem se manifestar mesmo anos após a data da infecção, o que poderia mascarar o número de casos decorrentes da infecção congênita. No entanto, sabe-se que a probabilidade de manifestação da TO diminui drasticamente com o tempo de infecção congênita, sendo mais frequente nos 12 primeiros anos de vida (Holland, 2009). Dessa forma, se a grande maioria dos casos decorresse de infecção congênita, haveria distribuição constante dos casos de TO de acordo com a idade dos indivíduos, o que não foi observado.

Outro ponto importante para auxiliar na identificação da via de infecção que acarretou a toxoplasmose nos indivíduos com TO é a localização das lesões. Apesar de não serem exclusivamente decorrentes da infecção congênita, sabe-se que lesões maculares ocorrem com maior frequência nos indivíduos infectados por essa via (Faucher; Garcia-Meric *et al.*, 2012). Na população do Jequitinhonha, cerca de 20% (31 em 148) das lesões se distribuem na zona 1, onde se localiza a região macular. A baixa prevalência de lesões nessa zona seria mais um indicativo a favor da hipótese de que a maioria dos casos na região são decorrentes de infecção adquirida.

Sabe-se que uma vez com TO, a idade é um dos fatores que influenciam diretamente a gravidade das lesões (Holland, 2009). Vários trabalhos relatam que a idade média de manifestação da AOT é em torno de 25 a 30 anos de idade (Bosch-Driessen; Berendschot *et al.*, 2002; Gilbert; Dunn *et al.*, 1999). Observa-se também que uma vez manifesta a TO, ela tende a ser mais grave nos extremos etários, ou seja, crianças e idosos tendem a apresentar lesões ativas maiores, numerosas e processo inflamatório prolongado (Holland, 2009). Assim, o número e tamanho das lesões, bem como o grau de inflamação durante a RC ativa são indicativos da gravidade dos casos de TO.

Nos moradores do Vale do Jequitinhonha, foi observada média superior a 2,5 lesões/paciente nos extremos etários, que correspondem aos grupos com idade inferior a 10 anos e idosos (acima de 51 anos). Além disso, lesões maiores foram encontradas nos indivíduos idosos, mas não nas crianças. Poderia se presumir que o maior número de lesões em idosos seria atribuído ao efeito cumulativo de muitos anos de infecção e reativação. No entanto, foi demonstrado que indivíduos idosos recém infectados (IgM positivos) também podem apresentar lesões ativas mais numerosas, maiores e processo inflamatório prolongado (Labalette; Delhaes *et al.*, 2002).

Pode-se observar que o maior número de lesões/paciente (média ao redor de 3,5), foi encontrado nos indivíduos entre 30 e 40 anos. Além disso, não foi identificada correlação em relação ao tamanho das lesões e idade dos pacientes. Portanto, a forma como a idade e outros fatores interagem para determinar as taxas de prevalência e manifestação da TO é complexa e mais estudos são necessários para entender o padrão de manifestação observado em uma dada população. Principalmente no que se refere aos fatores de risco aos quais a população foi exposta e à ocorrência de surtos epidêmicos devido a contaminação de coleções de água utilizada para abastecimento da região.

Vale ressaltar, que os casos de TO descritos para a população do Vale do Jequitinhonha tratam-se de lesões cicatrizadas. Foram consideradas também, apenas as lesões classificadas como tipos A e B, uma vez que as lesões do tipo C se distribuem igualmente entre indivíduos soropositivos e soronegativos. Dessa forma, a idade do paciente quando no momento do exame oftalmológico não reflete a idade que esse paciente apresentava quando da manifestação das lesões ativas.

Uma vez identificados os casos de lesões oculares, esses foram encaminhados para a análise genética. É necessário ressaltar que a análise de associação alélica realizada nesse trabalho focou, predominantemente na genotipagem de tagSNPs marcadores de haplótipos, representativos de todo o gene, ao invés de SNPs raros, responsáveis por substituições não sinônimas de aminoácidos na sequência da proteína. Isso porque o número de casos de TO utilizado nesse estudo não apresentou poder estatístico para

detectar associações com variantes funcionais raras, mas somente efeitos significativos causados por alelos comuns distribuídos ao longo do gene.

Visando melhorar o poder de detecção de associações alélicas, a população utilizada foi constituída de famílias provenientes do Vale do Jequitinhonha juntamente com trios provenientes de Campos dos Goytacazes. Isso possibilitou o aumento do poder para polimorfismos com MAF superior a 15% na população. Dessa forma, os resultados obtidos na análise de FBAT demonstram que polimorfismos nos genes de P2RX7, COL2A1, ABCA4, TLR9 e NOD2 influenciam na susceptibilidade à toxoplasmose nas famílias brasileiras estudadas. A utilização da análise de associação alélica baseada em família permitiu a identificação de associações independente da miscigenação da população brasileira ou de aglomerados de casos em famílias específicas como evidenciado nas análises de pedigree.

É importante dizer, no entanto, que o conjunto de trios provenientes de Campos dos Goytacazes foi previamente utilizado para avaliar a associação dos genes P2RX7 e dos TLR 2, 4, 5 e 9 (Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010; Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009) com a TO. Nesses estudos, foi demonstrada a associação dos polimorfismos rs1718119 e rs1621388 no gene de P2RX7 e rs352140 no gene de TLR 9 com o desenvolvimento de RC, pela análise de FBAT, sob o modelo de herança aditiva. Adicionalmente, não foi observada associação de polimorfismos nos genes de TLR2, 4 ou 5 com a TO.

A associação dos polimorfismos no gene de P2XR7 foi confirmada na população estudada nessa tese, utilizando o mesmo tipo de análise adotada anteriormente (Jamieson; Peixoto-Rangel *et al.*, 2010). No entanto, a força de associação entre os SNPs e a TO encontrada aqui foi inferior para ambos os polimorfismos. Ainda no gene P2RX7, também foi encontrada associação com o polimorfismo rs208293, para o modelo de herança de genótipo.

Por outro lado, no que se refere ao gene de TLR9 não foi utilizado nesse trabalho o mesmo polimorfismo reportado por Peixoto-Rangel e colaboradores em 2009 (rs352140). Apesar disso, também foi encontrada associação desse gene com a TO utilizando o polimorfismo rs187084, localizado em provável região promotora.

Em relação aos genes COL2A1 e ABCA4 foram reportadas anteriormente associações em diversos SNPs distribuídos nesses genes, com a toxoplasmose congênita em duas populações provenientes da Europa e Estados Unidos (Jamieson; de Roubaix *et al.*, 2008). No entanto, a associação dos polimorfismos nos genes de ABCA4 e COL2A1 não foram confirmadas na população brasileira, quando realizadas análises de associação segundo o modelo de herança aditiva nas análises de FBAT, assim como reportado por Jamieson e colaboradores, em 2010. No entanto, quando utilizado o modelo de genótipo, foi visto que os genótipos GC e CC em ABCA4 (rs1801574) estão, respectivamente, sub e super representados nos indivíduos infectados. O mesmo ocorre com o polimorfismo rs1635544 no gene de COL2A1, onde o genótipo heterozigoto está mais uma vez, sub representado nos indivíduos afetados, enquanto que o genótipo homozigoto está super representado.

É interessante notar que embora não se saiba como os polimorfismos localizados nos genes COL2A1, que codifica a molécula de colágeno II e ABCA4, que codifica um transportador de lipídios, atuam na região ocular durante casos de RC ativa, esses genes apresentam função estrutural durante o desenvolvimento ocular. Dessa forma, a associação de polimorfismos localizados nesses genes com o desenvolvimento de TO encontrada nas coortes americana e europeia, que contam com casos exclusivos de toxoplasmose congênita, é mais forte do que a associação encontrada na coorte brasileira, onde acredita-se que a maioria dos casos são decorrentes de infecções adquiridas. Por apresentarem função exclusivamente estrutural, durante a TO adquirida, os indivíduos apresentam toda a morfologia ocular já desenvolvida no momento que o parasita alcança o olho.

Outra associação encontrada nessa tese foi entre o polimorfismo rs3135499 no gene que codifica o receptor NOD2 e a TO. A relação da TO com o gene de NOD2 nunca havia sido descrita. Observou-se que o genótipo heterozigoto está super representado em indivíduos afetados, ou seja a heterozigose desse marcador está associada com a doença e não com a proteção do indivíduo. Diferentemente do que ocorre na vantagem do heterozigoto descrita para alguns modelos de doença, esse polimorfismo está localizado em região intrônica e não acarreta, portanto, uma mudança de aminoácido na sequência da proteína. É provável, portanto, que esse SNP esteja em desequilíbrio de ligação com a

real variante genética que causa alteração na funcionalidade ou na expressão do receptor NOD2.

A função de NOD2 na resposta ao *T. gondii* ainda não está totalmente esclarecida, uma vez que a demonstração de que esse receptor estaria envolvido na proteção dos animais infectados promovendo a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1, não foi confirmada em trabalhos posteriores (Caetano; Biswas *et al.*, 2011; Shaw; Reimer *et al.*, 2009). No entanto, não é improvável que esse receptor tenha função na toxoplasmose, uma vez que polimorfismos no gene de NALP1, outro receptor da família dos NLR, também está relacionado ao desenvolvimento de TO em humanos (Witola; Mui *et al.*, 2011). Ainda não foram identificados, porém, os antígenos do parasita que seriam reconhecidos pelo NALP1 ou NOD2. Porém, uma vez que há sobreposição do perfil reconhecimento dos receptores NALP1 e NOD2 (ambos reconhecem MDP) (Hsu; Ali *et al.*, 2008), seria possível que o receptor NOD2 também fosse capaz de reconhecer e responder a antígenos do parasito. A função de NALP1 no reconhecimento do parasito, no entanto, parece ser de indução da produção de citocinas inflamatórias, uma vez que monócitos humanos com o gene de NALP1 silenciado apresentam menor liberação de IL-1 β , IL-18 e IL-12 e, em decorrência disso, não são capazes de eliminar o parasito com a mesma eficiência que células normais (Witola; Mui *et al.*, 2011).

O tamanho da amostra utilizada nesse trabalho não apresenta poder estatístico para detectar associações entre variantes funcionais raras e os casos de TO. No entanto, estudos de doenças complexas que utilizam a técnica de re-sequenciamento em larga escala têm demonstrado que genes relacionados a doenças, previamente identificados em análises iniciais a partir de variantes comuns (como os tagSNPs utilizados nesse estudo), também apresentam variantes raras associadas à doença, identificadas quando amostras suficientemente grandes são utilizadas (Nejentsev; Walker *et al.*, 2009). Dessa forma, é possível que um estudo da TO com maior número de casos, encontraria associação com variantes funcionais nos mesmos genes para os quais foram encontradas associações nesse trabalho, incluindo os genes de TLR9 e NOD2. Isso ajudaria a determinar quais seriam as consequências patológicas quando comparadas variantes funcionais e aquelas que geram a perda de função do gene.

Portanto, os resultados discutidos até aqui proporcionam suporte genético inicial para a hipótese de que os receptores P2RX7, TLR9 e NOD2 bem como as proteínas codificadas pelos genes ABCA4 e COL2A podem exercer função importante na determinação de resistência e susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii* não apenas de forma congênita, mas também após o nascimento.

Uma vez que a função de P2RX7 na resistência à toxoplasmose já foi caracterizada em macrófagos humanos (Lees; Fuller *et al.*, 2010) e a função do transportador de lipídeos ABCA4 e do colágeno codificado pelo gene COL2A parecem ser estruturais, não tendo relação com a resposta imune do hospedeiro, nesse trabalho, foi avaliada a variação da resposta imune nos indivíduos que apresentam genótipos diferentes em relação aos polimorfismos no gene de TLR9 e NOD2 (rs187084 e rs3135499) para os quais foi encontrada associação com a TO.

Em 2000, Yamamoto e colaboradores demonstraram diferenças nos níveis de proliferação celular em pacientes soropositivos assintomáticos e com TO adquirida ou congênita. Nesse trabalho, indivíduos com TO adquirida apresentam elevada proliferação celular em comparação com pacientes com toxoplasmose congênita ou assintomáticos (Yamamoto; Vallochi *et al.*, 2000). No entanto, nessa tese, observa-se que os indivíduos com RC apresentam células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (HLA-DR⁺) com capacidade proliferativa semelhante às dos indivíduos assintomáticos. Também foi encontrada frequência diminuída de células ativadas em indivíduos com COT quando comparados ao grupo de indivíduos assintomáticos.

Em 2006 Fatoohi e colaboradores reportaram achados semelhantes aos descritos nessa tese. Mediante ativação com STAg, foram encontradas maior frequência de células T CD25⁺ em pacientes soropositivos em comparação com indivíduos soronegativos. No entanto, não houve diferença entre a proporção de células ativadas entre os indivíduos com ou sem lesão ou ainda com lesões oculares decorrente de infecção adquirida ou congênita (Fatoohi; Cozon *et al.*, 2006). Apesar de não ser possível afirmar a via de infecção dos casos de TO, acredita-se que a maioria deles seja decorrente de infecção adquirida. Os achados dessa tese, portanto, estariam de acordo com o relatado por Fatoohi e colaboradores em 2006.

A molécula de CD25 é parte do receptor de IL-2, citocina importante na promoção de proliferação dos linfócitos ativados. Por outro lado, a molécula de HLA-DR é expresso constitutivamente na superfície das APC. A expressão de HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ ocorre em resposta a estimulação específica. Dessa forma, pacientes assintomáticos, por apresentarem maior frequência de células T CD4⁺HLA-DR⁺ em comparação com os indivíduos com COT, apresentariam maiores níveis de células T CD4⁺ responsivas a antígenos de *T. gondii*. É importante mencionar que essa diferença não foi encontrada para as células T CD8⁺HLA-DR⁺ e, quando analisado o total de células T ativadas (CD4⁺ ou CD8⁺), não há diferença entre os indivíduos assintomáticos e COT (dados não mostrados). Similarmente, Fatoohi e colaboradores não analisaram as populações de células T CD4⁺CD25⁺ ou T CD8⁺CD25⁺ separadamente. Isso poderia explicar a diferença nos achados relatados nessa tese e no trabalho de Fatoohi.

Uma vez que não foram encontradas diferenças na resposta de células T CD8⁺ entre indivíduos com COT ou assintomáticos, o próximo passo foi o estudo das respostas de células T CD4⁺ auxiliares. Nesse sentido, foi avaliado o papel das respostas Th1, Th2 e Th17 no desenvolvimento das lesões oculares decorrentes de TO.

O papel da resposta Th1 na proteção contra a infecção por *T. gondii* está bem estabelecido no modelo animal. Na ausência de modulação, as células Th1 podem exercer um papel imunopatogênico, e contribuem para o processo inflamatório que resulta na destruição da retina. No entanto, nessa tese, não foi observada maior produção de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) ou regulatória (IL-10) nos indivíduos soropositivos para toxoplasmose, independente do comprometimento ocular. Não foi detectada a produção de citocinas Th2 (IL-4) em culturas de PBMCs provenientes dos pacientes dos diferentes grupos, mediante estímulo com STAg. Também não foram encontradas diferenças na frequência de células T CD4⁺ do tipo Th1 em pacientes com COT, quando comparados com indivíduos soropositivos assintomáticos. Esse achado é coerente com o reportado por Fatoohi e colaboradores, uma vez que também não foram encontradas diferenças na produção de IFN- γ ou IL-10 nos pacientes soropositivos independente do comprometimento ocular. A produção de IL-4 também não foi observada nesse estudo (Fatoohi; Cozon *et al.*, 2006).

Outro mecanismo que pode acarretar o dano tecidual seria a produção de IL-17 pelas células Th17. Sabe-se que essas células estão envolvidas com a quimioatração, de neutrófilos para os locais de infecção, através da produção de CXCL8. Os neutrófilos, no entanto, não são importantes na eliminação do *T. gondii* (Dunay; Fuchs et al., 2010). Dessa forma, a presença de células Th17 na retina promoveria o recrutamento de neutrófilos que atuariam, não a eliminação eficiente do parasito, mas no processo imunopatológico (Kelly; Kolls et al., 2005). Nesse contexto, Lu e colaboradores observaram em 2003 que em animais deficientes em IL-10, uma citocina que regula negativamente a ação das células Th17, há maior infiltrado de neutrófilos na retina mediante a infecção por *T. gondii*. Esses animais apresentam extensa área de necrose na retina, porém com intensa proliferação do parasito. As células Th17 e a produção de IL-17 não foram avaliadas nesse trabalho e o processo inflamatório de destruição dos tecidos foi atribuído apenas à exarcebação da resposta Th1 (Lu; Huang et al., 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que animais com deficiência do receptor de IL-17 desenvolvem um processo inflamatório diminuído no íleo, em comparação com animais normais infectados por via oral com *T. gondii* (Guiton; Vasseur et al., 2010). Além disso, a falta do receptor de IL-27, que reconhece a IL-27, citocina que inibe a diferenciação de Th17 em camundongos, resulta em neuropatologia grave com produção de altos níveis de IL-17, IL-6 e TNF- α durante a infecção pelo parasito (Stumhofer; Laurence et al., 2006). Isso indica um papel da IL-17 na imunopatologia e nos processos inflamatórios desencadeados pela infecção por *T. gondii*.

Em humanos, a IL-17 foi detectada em amostras de humor aquoso de indivíduos com AOT, apesar da fonte células dessa citocina ainda não ter sido identificada (Lahmar; Abou-Bacar et al., 2009). Coerente com esses achados, nessa tese foi encontrado maior nível de IL-17 em culturas de PBMCs provenientes de indivíduos com COT ou AOT. Observou-se também que as principais células T CD4⁺ produtoras de IL-17 nos pacientes com COT não expressam T-bet, fator de transcrição específico de células Th1. Dessa forma, a principal fonte de IL-17 nos pacientes com COT e AOT são células Th17 (CD4⁺T-bet⁻IL-17⁺IFN- γ), uma vez que essas células estão com frequência aumentada nesses indivíduos. Dessa forma, a hipótese seria de que as células Th17 e a citocina IL-17 contribuem para o processo inflamatório que leva ao desenvolvimento da RC decorrente de TO.

A superfície ocular apresenta um ambiente rico em citocinas (i.e., TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-1 β) importantes para a diferenciação de células Th17 (Zheng; Bian *et al.*, 2010; Zheng; de Paiva *et al.*, 2010). De fato, linfócitos Th17 ou níveis de IL-17 também estão envolvidos em doenças oculares incluindo uveítes e esclerites de várias etiologias (Amadi-Obi; Yu *et al.*, 2007; Lahmar; Abou-Bacar *et al.*, 2009). Além disso, essas células têm sido relacionadas a uveítes de caráter auto-imune (Yoshimura; Sonoda *et al.*, 2009). No entanto, a associação das células Th17 na TO ainda não foi demonstrada.

Nessa tese, foi encontrado nível similar de citocinas Th1, bem como frequência similar de células T CD4⁺ produtoras de IL-2, IFN- γ e TNF- α em resposta ao STAg em indivíduos soropositivos independente do comprometimento ocular. Como demonstrado anteriormente, através do controle da replicação do parasito, TNF- α e IFN- γ previnem a disseminação sistêmica de taquizoítos durante a infecção aguda e inibem reativações durante a fase crônica da toxoplasmose no sistema nervoso central (Gazzinelli, R T; Brezin *et al.*, 1994). Em contraste, a frequência de células Th17 produtoras de IL-17 está aumentada em pacientes com COT e principalmente, pacientes com AOT. Adicionalmente, não foi encontrada produção de IL-10 em pacientes com comprometimento ocular. O conjunto desses dados permite a conclusão de que seria possível que linfócitos Th17 contribuíssem para o desenvolvimento de RC em decorrência da toxoplasmose, de forma a promover o processo inflamatório deletério, ao invés de interferir no controle do parasito.

O papel de TLR9 na imunidade em resposta ao parasito *T. gondii* ainda não está esclarecido. Sabe-se que no modelo murino, a infecção oral por *T. gondii* induz a expressão de TLR9 em DC e que a presença desse receptor é essencial para a expansão dessas células nos linfonodos mesentéricos (Minns; Menard *et al.*, 2006). Sabe-se que as DC são essenciais para a apresentação de antígenos e ativação de células T CD8⁺, indispensáveis no controle e eliminação do parasita. Além disso, em decorrência da infecção oral, a ativação de TLR9 proporciona a indução de resposta tipo Th1, tipicamente relacionada ao controle dos níveis do parasita. Por outro lado, essa resposta também foi relacionada à ileite aguda, que acarreta a morte dos animais C57BL6 susceptíveis à infecção. Animais deficientes em TLR9, no entanto, apresentam níveis aumentados de parasitas no intestino, o que é consistente com a menor produção de

IFN- γ observada nesses animais (Minns; Menard *et al.*, 2006). Esses animais, no entanto, não sucumbem à infecção, uma vez que não desenvolvem a resposta Th1 que desencadeia o processo inflamatório excessivo. É importante dizer que a resposta Th17 não foi avaliada nos experimentos realizados por Minns e colaboradores. Trabalhos posteriores, no entanto, demonstraram que a participação da citocina IL-17, produzida tipicamente por células Th17, no processo de inflamação que leva à ileite é limitado (Munoz; Heimesaat *et al.*, 2009).

Apesar do papel de TLR9 estar relativamente bem estabelecido durante a infecção oral no modelo murino, não se sabe se em humanos, esse receptor teria papel importante na indução da resposta Th1 protetora. Nessa tese foi encontrada evidência para a associação do genótipo heterozigoto no SNP rs187084 em TLR9 com a RC decorrente da infecção por *T. gondii*. A associação desse receptor com a TO também foi descrita por Peixoto-Rangel e colaboradores, em 2009. Esses autores genotiparam o polimorfismo rs352140 ($Z=4,323$ e $p=1,5 \times 10^{-5}$), localizado na região codificadora do gene, mas sem acarretar modificação de aminoácido na sequência da proteína (Pro-545-Pro) (Peixoto-Rangel; Miller *et al.*, 2009).

O polimorfismo genotipado aqui está localizado em provável região promotora e poderia influenciar na resposta imune caso influenciasse a transcrição do gene de TLR9 ou estivesse em desequilíbrio de ligação com a variante funcional. Para tanto, foi avaliada a produção de citocinas próinflamatórias ou regulatórias em cultura de PBMCs provenientes de indivíduos soropositivos mediante estímulo com antígenos de *T. gondii*. No entanto, não foram observadas diferenças na produção de citocinas nos indivíduos carregando os diferentes genótipos. Isso pode indicar que, por se tratar de um receptor da imunidade inata, o TLR9 poderia agir no processo inicial direcionando a resposta imune do hospedeiro para o tipo Th1, como descrito no modelo animal (Minns; Menard *et al.*, 2006). Uma vez estabelecida a resposta Th1, os leucócitos circulantes já seriam capazes de prontamente reponder à antígenos do parasito.

Outra explicação plausível seria a de que o polimorfismo avaliado não teria influência na transcrição do gene de TLR9 ou não estaria em desequilíbrio de ligação com a variante funcional e, dessa forma, a função dele na resposta à infecção pelo *T. gondii* seria

irrelevante. Isso, no entanto, não descartaria a idéia de que o receptor TLR9 como um todo teria um papel no reconhecimento do parasito durante a toxoplasmose em humanos.

O papel de NOD2 na TO em humanos ou no modelo animal ainda não foi estabelecido. No entanto, foi demonstrado recentemente que NOD2 é importante mediador na resistência à infecção pelo *T. gondii* em modelo murino (Shaw; Reimer *et al.*, 2009). Animais deficientes para esse gene, apesar de resistirem à infecção aguda, sucumbem no início da fase crônica. Além disso, Shaw e colaboradores também demonstraram que nesses animais, há produção normal de IL-12, mas a resposta Th1 está diminuída durante a infecção por *T. gondii*, uma vez que os animais apresentam baixa frequência de células T 4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-2 (Shaw; Reimer *et al.*, 2009).

Experimentos posteriores realizados pelo nosso grupo, no entanto, não foram capazes de replicar os resultados reportados por Shaw e colaboradores em 2009. Nosso grupo, não observou a diminuição da produção de citocinas Th1 ou aumento da susceptibilidade dos animais deficientes em NOD2 (Caetano; Biswas *et al.*, 2011). Nessa tese, encontramos evidência para a associação do genótipo heterozigoto no SNP rs3135499 em NOD2 com a RC decorrente da infecção por *T. gondii*.

Consistente com o demonstrado por Caetano e colaboradores em 2011 para a toxoplasmose murina, os diferentes genótipos no polimorfismo rs3135499 em NOD2 não estão associados a variações nos níveis de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) ou regulatória (IL-10) produzidas por PBMCs de pacientes soropositivos estimuladas em cultura com STAg. No entanto, apesar de não significativo, indivíduos com o genótipo heterozigoto para o SNP rs3135499 apresentam, de forma geral, maior produção de citocinas, em comparação com os homozigotos. A produção da citocina IL-17 é significativamente maior nos indivíduos heterozigotos, susceptíveis ao desenvolvimento de TO.

Mutações no gene de NOD2 estão associadas a uma série de doenças de cunho genético, como: a doença de Crohn, esclerose múltipla e Síndrome de Blau. A doença de Crohn é caracterizada por inflamação crônica do trato gastrointestinal (Hedegaard; Enevold *et al.*, 2011; Kurokawa; Kikuchi *et al.*, 2003; Naser; Arce *et al.*, 2012). A causa desse

processo patológico intenso ainda é desconhecida, mas as teorias incluem infecção por determinados microrganismos e um desequilíbrio da flora intestinal normal dos pacientes que, de alguma forma, desencadeariam um processo inflamatório auto-imune (Naser; Arce *et al.*, 2012). Polimorfismos que levam à diminuição da função de NOD2 e do gene que codifica o receptor de IL-23 (IL-23R) estão associados ao desenvolvimento da doença de Crohn. Esse receptor é expresso em células Th17 de memória e está envolvido em processos pró-inflamatórios, desencadeados pela produção de IL-17 via ativação de linfócitos Th17 (Naser; Arce *et al.*, 2012).

O receptor NOD2 está também envolvido na produção de IL-17 em células Th17 de memória, via estimulação de células dendríticas (van Beelen; Zelinkova *et al.*, 2007). Nesse processo, a estimulação de DCs com MDP (agonista clássico de NOD2), proporciona aumento da produção de IL-23 e IL-1 β . Por sua vez, a IL-23 produzida pelas DCs promove a liberação de IL-17 por células Th17 de memória (van Beelen; Zelinkova *et al.*, 2007). Dessa forma, durante a infecção por *T. gondii* seria possível o reconhecimento de moléculas do parasito via NOD2 pelas APCs, o que poderia levar à produção de IL-23 e diferenciação das células T em Th17, que então liberariam IL-17.

Polimorfismos no gene de NOD2 também estão associados ao desenvolvimento de esclerose múltipla. Semelhante ao encontrado nessa tese, nos pacientes que sofrem dessa doença, o genótipo heterozigoto para o polimorfismo rs5743291, está associado com maior produção de IL-17, em resposta a auto-estímulos comumente liberados durante o processo inflamatório (Hedegaard; Enevold *et al.*, 2011). Nesse trabalho a produção de outras citocinas, como IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 não foram associadas a variantes específicas no gene de NOD2.

O papel das células Th17 na patogênese da esclerose múltipla tem sido amplamente investigado recentemente. A inflamação do parênquima cerebral aparentemente ocorre quando as células Th17 superam, em número, as células Th1, resultando em elevada produção de IL-17, o que correlaciona com gravidade da doença. Dessa forma, a resposta Th17 exagerada tem consequências deteriorativas nos pacientes com esclerose múltipla.

Por outro lado, a síndrome de Blau é uma desordem autossômica rara caracterizada pela manifestação precoce de artrite granulomatosa, uveíte e vermelhidão da pele (Okafuji;

Nishikomori *et al.*, 2009). Polimorfismos no gene de NOD2 estão associados ao desenvolvimento de uveíte nos pacientes com síndrome de Blau, mesmo na ausência de resposta a componentes bacterianos (Kurokawa; Kikuchi *et al.*, 2003; Raiji; Miller *et al.*, 2011). As variantes normalmente associadas à doença de Crohn estão localizadas em regiões próximas ou que codificam o domínio rico em leucina do receptor NOD2, enquanto que aquelas associadas à síndrome de Blau se localizam no domínio de ligação ao nucleotídeo, importante na ativação do NF- κ B. O polimorfismo associado à TO (rs3135499) encontra-se em região intrônica 2, localizada entre os éxons 2 e 3, que codificam regiões próximas ao domínio de ativação do NF- κ B. Apesar de não haver informações disponíveis na literatura sobre o envolvimento das células Th17 no processo inflamatório observado na síndrome de Blau, no modelo experimental de uveíte auto-imune a intensidade de produção de IL-17 pelas células Th17 está correlacionada à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (Luger; Silver *et al.*, 2008).

Dessa forma, como já bem estabelecido, observou-se, nessa tese, que citocinas produzidas por células Th1 são importantes para a resistência à infecção por *T. gondii*. Adicionalmente, os resultados aqui obtidos levantam a hipótese do envolvimento da IL-17 e, mais precisamente, de células Th17 no surgimento das lesões oculares decorrentes da toxoplasmose. Em pacientes com comprometimento ocular (AOT ou COT), a associação da produção de IL-17 com o polimorfismo no gene de NOD2 indicaria o envolvimento das imunidades inata e adquirida, que em conjunto, teriam papel importante em desencadear o surgimento de lesões oculares decorrentes da infecção por *T. gondii*. Portanto, os dados aqui discutidos constituem o primeiro passo em relação a se propor o envolvimento do receptor NOD2 e das células Th17 no desenvolvimento da TO. Novos trabalhos serão necessários para confirmar os dados aqui obtidos para que seja possível aprofundar o conhecimento disponível em relação ao tema estudado.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi encontrada associação entre polimorfismos no TLR9 e a TO. No entanto, não foram observadas diferenças na produção de citocinas nos indivíduos soropositivos

portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo. Isso pode indicar que esse polimorfismo não estaria ligado a uma variante funcional.

A resposta imune tipo Th1, que envolve a produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α não está relacionada com o desenvolvimento das lesões oculares nos pacientes com AOT ou COT. Da mesma forma, o polimorfismo de NOD2 rs3135499 também não está relacionado a maiores níveis de produção dessas citocinas.

O genótipo heterozigoto para o polimorfismo rs3135499 é mais frequente em indivíduos com TO. Além disso, esses indivíduos também apresentam maior produção de IL-17 e células Th17.

6 CONCLUSÕES

6.1- A soroprevalência da toxoplasmose encontrada nas vilas do Vale do Jequitinhonha foi inferior à normalmente relatada em trabalhos realizados no Brasil. Isso indicaria que há exposição controlada dos moradores do Vale do Jequitinhonha aos fatores de risco à infecção.

6.2- A manifestação da toxoplasmose ocular, no que se restringe ao desenvolvimento da retinocoroidite, ocorreu numa proporção de casos relativamente semelhante ao relatado no restante do país. Além disso, o número crescente de casos de TO com a idade é indício de que a maior parte dos casos seria causada pela infecção adquirida.

6.3- O receptor TLR9 não parece exercer papel na geração do processo patológico que desencadeia a formação das lesões oculares decorrentes da infecção pelo *T. gondii*.

6.4- A resposta tipo Th1 estaria envolvida no mecanismo de controle do *T. gondii* e não parecem estar envolvidas no processo imunopatológico decorrente da TO.

6.5- Nossos dados sugerem uma possível relação entre NOD2 e a produção de IL-17 por linfócitos Th17, que parece influenciar o desenvolvimento da TO.

7 TRABALHOS DESENVOLVIDOS E PUBLICADOS

7.1 ARTIGOS PUBLICADOS

Os dados dessa tese de doutorado foram compilados nos dois artigos científicos listados a seguir:

1- "Association of a NOD2 Gene Polymorphism and T-Helper 17 Cells With Presumed Ocular Toxoplasmosis". **Dutra MS**, Béla SR, Peixoto-Rangel AL, Fakiola M, Cruz AG, Gazzinelli A, Quitès HF, Bahia-Oliveira LM, Peixe RG, Campos WR, Higino-Rocha AC, Miller NE, Blackwell JM, Antonelli LR, Gazzinelli RT. *J Infect Dis*. 2013 Jan;207(1):152-63. doi: 10.1093/infdis/jis640. Epub 2012 Oct 24.

2- "Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice". Andrade WA, Souza MD, Ramos-Martinez E, Nagpal K, **Dutra MS**, Melo MB, Bartholomeu DC, Ghosh S, Golenbock DT, Gazzinelli RT. *Cell Host Microbe*. 2013 Jan. doi: S1931-3128(12)00429-5. 10.1016/j.chom.2012.12.003.

Os trabalhos completos, em versão final podem ser encontrados no ADENDO D. Além desses trabalhos, também foi publicado um trabalho científico no qual participei como co-primeira autora, em colaboração com a estudante de doutorado Samantha Ribeiro Béla.

3- "Impaired innate immunity in mice deficient in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 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 Dec;80(12):4298-308. doi: 10.1128/IAI.00328-12. Epub 2012 Oct 1.

7.2 ARTIGOS EM PREPARAÇÃO

Os artigos listados a seguir foram fruto de colaboração com dois grupos de pesquisa. O primeiro, coordenado pela professora Dra. Andrea Gazzinelli e compreende a análise dos fatores de risco de uma das áreas do Vale do Jequitinhonha. Nesse artigo foram utilizados os dados de sorologia das amostras de pacientes coletadas durante o desenvolvimento dessa tese. O segundo trabalho, coordenado pelo professor Gustavo Velasquez, compreende a análise de fatores biométricos e bioquímicos associados à manutenção dos níveis de glicose e adiposidade. Neste trabalho foram analisados os dados de pedigree coletados durante a minha tese, em relação aos índices de glicose e adiposidade, relacionado ao desenvolvimento de diabetes. Ambos os trabalhos encontram-se em fase final de preparação.

4- "Fatores associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em comunidade rural do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in a rural community in the Jequitinhonha Valley, Brazil" Humberto Ferreira de Oliveira Quites, João Paulo Amaral Haddad, Samantha R. Béla, **Míriam S. Dutra**, Ricardo T. Gazzinelli, Andrea Gazzinelli.

5- "Heritability of phenotypes related to glucose homeostasis and adiposity in rural area of Brazil". Geórgia das Graças Pena, **Míriam S. Dutra**, Rodrigo Oliveira, Gustavo Velasquez-Melendez, Andrea Correia-Gazzinelli.

REFERÊNCIAS

- Aarvak, T., M. Chabaud, E. Kallberg, P. Miossec e J. B. Natvig (1999a). "Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium." *Scand J Immunol* **50**(1): 1-9.
- Aarvak, T., M. Chabaud, P. Miossec e J. B. Natvig (1999b). "IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells." *J Immunol* **162**(3): 1246-1251.
- Aga, M., C. J. Johnson, A. P. Hart, A. G. Guadarrama, M. Suresh, J. Svaren, . . . B. J. Darien (2002). "Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7)." *J Leukoc Biol* **72**(1): 222-232.
- Ajzenberg, D., N. Cogne, L. Paris, M. H. Bessieres, P. Thulliez, D. Filisetti, . . . M. L. Darde (2002). "Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings." *J Infect Dis* **186**(5): 684-689.
- Ajzenberg, D., H. Yera, P. Marty, L. Paris, F. Dalle, J. Menotti, . . . I. Villena (2009). "Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings." *J Infect Dis* **199**(8): 1155-1167.
- Albanesi, C., C. Scarponi, A. Cavani, M. Federici, F. Nasorri e G. Girolomoni (2000). "Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **115**(1): 81-87.
- Albuquerque, M. C., A. L. Aleixo, E. I. Benchimol, A. C. Leandro, L. B. das Neves, R. T. Vicente, . . . 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., D. Jankovic e A. Sher (2004). "Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection." *Immunol Rev* **201**: 26-34.
- Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, . . . C. E. Egwuagu (2007). "TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1." *Nat Med* **13**(6): 711-718.
- Arsenijevic, D., F. D. Bilbao, P. Giannakopoulos, L. Girardier, S. Samec e D. Richard (2001). "A role for interferon-gamma in the hypermetabolic response to murine toxoplasmosis." *Eur Cytokine Netw* **12**(3): 518-527.

- Avelino, M. M., D. Campos, Jr., J. B. Parada e A. M. Castro (2004). "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age." *Braz J Infect Dis* **8**(2): 164-174.
- Aviles, H., J. Stiles, P. O'Donnell, J. Orshal, J. Leid, G. Sonnenfeld e F. Monroy (2008). "Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine toxoplasma infection." *J Parasitol* **94**(6): 1282-1288.
- Bahia-Oliveira, L. M., J. L. Jones, J. Azevedo-Silva, C. C. Alves, F. Orefice e D. G. Addiss (2003). "Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil." *Emerg Infect Dis* **9**(1): 55-62.
- Bahia-Oliveira, L. M., J. A. Silva, A. L. Peixoto-Rangel, M. S. Boechat, A. M. Oliveira, C. L. Massara e R. G. Peixe (2009). "Host immune response to *Toxoplasma gondii* and *Ascaris lumbricoides* in a highly endemic area: evidence of parasite co-immunomodulation properties influencing the outcome of both infections." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 273-280.
- Balasundaram, M. B., R. Andavar, M. Palaniswamy e N. Venkatapathy (2010). "Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients." *Arch Ophthalmol* **128**(1): 28-32.
- Barbosa, I. R., C. M. de Carvalho Xavier Holanda e V. F. de Andrade-Neto (2009). "Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**(4): 377-382.
- Batista, M. V., L. C. Pierrotti, E. Abdala, W. T. Clemente, E. S. Girao, D. R. Rosa, . . . M. A. Shikanai-Yasuda (2011). "Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients." *Trop Med Int Health* **16**(9): 1134-1142.
- Behnke, M. S., A. Khan, J. C. Wootton, J. P. Dubey, K. Tang e L. D. Sibley (2011). "Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(23): 9631-9636.
- Bela, S. R., M. S. Dutra, E. Mui, A. Montpetit, F. S. Oliveira, S. C. Oliveira, . . . R. T. Gazzinelli (2012). "Impaired Innate Immunity in Mice Deficient in Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Leads to Defective Type 1 T Cell Responses, B Cell Expansion, and Enhanced Susceptibility to Infection with *Toxoplasma gondii*." *Infect Immun* **80**(12): 4298-4308.
- Belfort-Neto, R., V. Nussenblatt, L. Rizzo, C. Muccioli, C. Silveira, R. Nussenblatt, . . . R. Belfort, Jr. (2007). "High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil." *An Acad Bras Cienc* **79**(1): 111-114.

- Berger, F., V. Goulet, Y. Le Strat e 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.
- Bezerra, R. A., F. S. Carvalho, L. A. Guimaraes, D. S. Rocha, F. L. Silva, A. A. Wenceslau e G. R. Albuquerque (2011). "Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs." Parasitol Res.
- Bianco, F., A. Colombo, L. Saglietti, D. Lecca, M. P. Abbracchio, M. Matteoli e C. Verderio (2009). "Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes." Purinergic Signal **5**(2): 233-240.
- Blanchet, F., A. Moris, J. P. Mitchell e V. Piguet (2011). "A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4 T cells." Curr Opin HIV AIDS **6**(5): 391-397.
- Boia, M. N., F. A. Carvalho-Costa, F. C. Sodre, G. M. Pinto e M. R. Amendoeira (2008). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauarete, Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **50**(1): 17-20.
- Boothroyd, J. C. e M. E. Grigg (2002). "Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?" Curr Opin Microbiol **5**(4): 438-442.
- Bosch-Driessen, L. E., T. T. Berendschot, J. V. Ongkosuwito e A. Rothova (2002). "Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients." Ophthalmology **109**(5): 869-878.
- Brinkmann, M. M., E. Spooner, K. Hoebe, B. Beutler, H. L. Ploegh e Y. M. Kim (2007). "The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling." J Cell Biol **177**(2): 265-275.
- Buffolano, W. (2008). "Congenital toxoplasmosis: the state of the art." Parassitologia **50**(1-2): 37-43.
- Caetano, B. C., A. Biswas, D. S. Lima, Jr., L. Benevides, T. W. Mineo, C. V. Horta, . . . K. S. Kobayashi (2011). "Intrinsic expression of Nod2 in CD4+ T lymphocytes is not necessary for the development of cell-mediated immunity and host resistance to *Toxoplasma gondii*." Eur J Immunol **41**(12): 3627-3631.
- Carellos, E. V., G. M. Andrade e R. A. Aguiar (2008). "[Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals]." Cad Saude Publica **24**(2): 391-401.
- Carme, B., F. Bissuel, D. Ajzenberg, R. Bouyne, C. Aznar, M. Demar, . . . M. L. Darde (2002). "Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana." J Clin Microbiol **40**(11): 4037-4044.

- Cavalcante, G. T., D. M. Aguilar, L. M. Camargo, M. B. Labruna, H. F. de Andrade, L. R. Meireles, . . . S. M. Gennari (2006). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil." *J Parasitol* **92**(3): 647-649.
- Cerqueira, R. L., M. Kawarabayashi, A. C. Guimaraes, P. M. Nakamura, S. N. Ferraz, P. L. Pinto e H. F. de Andrade, Jr. (1998). "Santo Inacio revisited: protozoan diseases in an isolated village in northeastern Brazil after twenty years." *Am J Trop Med Hyg* **59**(5): 736-740.
- Charles, E., S. Joshi, J. D. Ash, B. A. Fox, A. D. Farris, D. J. Bzik, . . . I. J. Blader (2010). "CD4 T-cell suppression by cells from *Toxoplasma gondii*-infected retinas is mediated by surface protein PD-L1." *Infect Immun* **78**(8): 3484-3492.
- Chimelli, L. (2011). "A morphological approach to the diagnosis of protozoal infections of the central nervous system." *Patholog Res Int* **2011**: 290853.
- Coelho, R. A., M. Kobayashi e 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.
- Commodaro, A. G., R. N. Belfort, L. V. Rizzo, C. Muccioli, C. Silveira, M. N. Burnier Jr e R. Belfort Jr (2009). "Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 345-350.
- Contreras, M., H. Schenone, P. Salinas, L. Sandoval, A. Rojas, F. Villarroel e F. Solis (1996). "Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **38**(6): 431-435.
- Cooney, R., J. Baker, O. Brain, B. Danis, T. Pichulik, P. Allan, . . . A. Simmons (2010). "NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation." *Nat Med* **16**(1): 90-97.
- Cordeiro, C. A., P. R. Moreira, M. S. Andrade, W. O. Dutra, W. R. Campos, F. Orefice e A. L. Teixeira (2008a). "Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(5): 1979-1982.
- Cordeiro, C. A., P. R. Moreira, G. C. Costa, W. O. Dutra, W. R. Campos, F. Orefice e A. L. Teixeira (2008b). "Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis." *Mol Vis* **14**: 1845-1849.
- Cordeiro, C. A., P. R. Moreira, G. C. Costa, W. O. Dutra, W. R. Campos, F. Orefice e A. L. Teixeira (2008c). "TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis." *Br J Ophthalmol* **92**(7): 986-988.
- Correa, G., C. Marques da Silva, A. C. de Abreu Moreira-Souza, R. C. Vommaro e R. Coutinho-Silva (2010). "Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of

- Toxoplasma gondii tachyzoites from infected macrophages." *Microbes Infect* **12**(6): 497-504.
- Couvreur, J. e P. Thulliez (1996). "[Acquired toxoplasmosis of ocular or neurologic site: 49 cases]." *Presse Med* **25**(9): 438-442.
- Dabritz, H. A. e P. A. Conrad (2010). "Cats and Toxoplasma: implications for public health." *Zoonoses Public Health* **57**(1): 34-52.
- de Moura, L., L. M. Bahia-Oliveira, M. Y. Wada, J. L. Jones, S. H. Tuboi, E. H. Carmo, . . . D. O. Garrett (2006). "Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene." *Emerg Infect Dis* **12**(2): 326-329.
- Debierre-Grockiego, F., N. Azzouz, J. Schmidt, J. F. Dubremetz, H. Geyer, R. Geyer, . . . R. T. Schwarz (2003). "Roles of glycosylphosphatidylinositols of Toxoplasma gondii. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages." *J Biol Chem* **278**(35): 32987-32993.
- Debierre-Grockiego, F., M. A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, M. G. Resende, . . . R. T. Schwarz (2007). "Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii." *J Immunol* **179**(2): 1129-1137.
- Delair, E., P. Latkany, A. G. Noble, P. Rabiah, R. McLeod e A. Brezin (2011). "Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis." *Ocul Immunol Inflamm* **19**(2): 91-102.
- Denkers, E. Y. e 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. Scharon-Kersten, H. Charest, B. A. Butcher, P. Caspar, . . . A. Sher (1997). "Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to Toxoplasma gondii." *J Immunol* **159**(4): 1903-1908.
- do Amaral, R. P., A. E. de Saidneuy, W. L. Ribeiro e J. de Andrade (2008). "Serological profile of potential solid organ donors in Santa Catarina, Brazil." *Transplant Proc* **40**(3): 665-667.
- Dubey, J. P. (1977). "Taxonomy of Sarcocystis and other Coccidia of cats and dogs." *J Am Vet Med Assoc* **170**(8): 778, 782.
- Dubey, J. P. (2009). "History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii." *Int J Parasitol* **39**(8): 877-882.
- Dunay, I. R., A. Fuchs e 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.

- Dzierszynski, F., M. Pepper, J. S. Stumhofer, D. F. LaRosa, E. H. Wilson, L. A. Turka, . . . D. S. Roos (2007). "Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells." *Infect Immun* **75**(11): 5200-5209.
- Edelhofer, R. e H. Prossinger (2010). "Infection with *Toxoplasma gondii* during pregnancy: seroepidemiological studies in Austria." *Zoonoses Public Health* **57**(1): 18-26.
- Ekman, A. K. e L. O. Cardell (2010). "The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils." *Immunology* **130**(1): 55-63.
- Elinav, E., T. Strowig, J. Henao-Mejia e R. A. Flavell (2011). "Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins." *Immunity* **34**(5): 665-679.
- Fatoohi, F., G. J. Cozon, M. Wallon, L. Kodjikian e F. Peyron (2006). "Systemic T cell response to *Toxoplasma gondii* antigen in patients with ocular toxoplasmosis." *Jpn J Ophthalmol* **50**(2): 103-110.
- Faucher, B., P. Garcia-Meric, J. Franck, P. Minodier, P. Francois, S. Gonnet, . . . R. Piarroux (2012). "Long-term ocular outcome in congenital toxoplasmosis: a prospective cohort of treated children." *J Infect* **64**(1): 104-109.
- Faustin, B., L. Lartigue, J. M. Bruey, F. Luciano, E. Sergienko, B. Bailly-Maitre, . . . J. C. Reed (2007). "Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation." *Mol Cell* **25**(5): 713-724.
- Ferreira Ade, M., R. W. Vitor, A. C. Carneiro, G. P. Brandao e M. N. Melo (2004). "Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR)." *Infect Genet Evol* **4**(2): 131-142.
- Ferreira, R. A., A. B. Oliveira, M. F. Ribeiro, W. L. Tafuri e R. W. Vitor (2006). "*Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine." *Exp Parasitol* **113**(2): 125-129.
- Franchi, L., N. Warner, K. Viani e G. Nunez (2009). "Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense." *Immunol Rev* **227**(1): 106-128.
- Fritz, J. H. e S. E. Girardin (2005). "How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals." *J Endotoxin Res* **11**(6): 390-394.
- Fromont, E. G., B. Riche e M. Rabilloud (2009). "*Toxoplasma* seroprevalence in a rural population in France: detection of a household effect." *BMC Infect Dis* **9**: 76.

Garweg, J. G. e E. Candolfi (2009). "Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 211-220.

Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever e 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., S. Bala, R. Stevens, M. Baseler, L. Wahl, J. Kovacs e A. Sher (1995). "HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines." *J Immunol* **155**(3): 1565-1574.

Gazzinelli, R. T., A. Brezin, Q. Li, R. B. Nussenblatt e C. C. Chan (1994). "*Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma." *Exp Parasitol* **78**(2): 217-229.

Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, S. Hieny, G. M. Shearer e 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, . . . 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., S. Hieny, T. A. Wynn, S. Wolf e A. Sher (1993). "Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6115-6119.

Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, . . . 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.

Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharon-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, . . . A. Sher (1996). "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha." *J Immunol* **157**(2): 798-805.

Gilbert, R. E., D. T. Dunn, S. Lightman, P. I. Murray, C. E. Pavesio, P. D. Gormley, . . . M. R. Stanford (1999). "Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications." *Epidemiol Infect* **123**(2): 283-289.

Gilbert, R. E., K. Freeman, E. G. Lago, L. M. Bahia-Oliveira, H. K. Tan, M. Wallon, . . . E. Petersen (2008). "Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(8): e277.

- Gilbert, R. E. e M. R. Stanford (2000). "Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection?" *Br J Ophthalmol* **84**(2): 224-226.
- Giraldo, M., H. Cannizzaro, M. A. Ferguson, I. C. Almeida e R. T. Gazzinelli (2000). "Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis." *J Clin Microbiol* **38**(4): 1453-1460.
- Glasner, P. D., C. Silveira, D. Kruszon-Moran, M. C. Martins, M. Burnier Junior, S. Silveira, . . . R. Belfort Junior (1992). "An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil." *Am J Ophthalmol* **114**(2): 136-144.
- Goldszmid, R. S., I. Coppens, A. Lev, P. Caspar, I. Mellman e A. Sher (2009). "Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells." *J Exp Med* **206**(2): 399-410.
- Goncalves, M. A., C. Matos Cde, L. C. Spegiorin, D. C. Oliani, A. H. Oliani e L. C. Mattos (2010). "Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, Sao Paulo state, Brazil." *Braz J Infect Dis* **14**(6): 601-605.
- Grigg, M. E., S. Bonnefoy, A. B. Hehl, Y. Suzuki e J. C. Boothroyd (2001). "Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries." *Science* **294**(5540): 161-165.
- Grigg, M. E. e J. C. Boothroyd (2001). "Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene." *J Clin Microbiol* **39**(1): 398-400.
- Grigg, M. E. e Y. Suzuki (2003). "Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*." *Microbes Infect* **5**(7): 685-690.
- Guiton, R., V. Vasseur, S. Charron, M. T. Arias, N. Van Langendonck, D. Buzoni-Gatel, . . . I. Dimier-Poisson (2010). "Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice." *J Infect Dis* **202**(3): 427-435.
- Hayashi, S., C. C. Chan, R. T. Gazzinelli, N. T. Pham, M. K. Cheung e F. G. Roberge (1996). "Protective role of nitric oxide in ocular toxoplasmosis." *Br J Ophthalmol* **80**(7): 644-648.
- Hedegaard, C. J., C. Enevold, F. Sellebjerg, K. Bendtzen e C. H. Nielsen (2011). "Variation in NOD2 augments Th2- and Th17 responses to myelin basic protein in multiple sclerosis." *PLoS One* **6**(5): e20253.
- Hill, D. e J. P. Dubey (2002). "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention." *Clin Microbiol Infect* **8**(10): 634-640.

- Hofhuis, A., W. van Pelt, Y. T. van Duynhoven, C. D. Nijhuis, L. Mollema, F. R. van der Klis, . . . 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.
- Holden, M. J., R. J. Haynes, S. A. Rabb, N. Satija, K. Yang e J. R. Blasic, Jr. (2009). "Factors affecting quantification of total DNA by UV spectroscopy and PicoGreen fluorescence." *J Agric Food Chem* **57**(16): 7221-7226.
- Holland, G. N. (1999). "Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis." *Am J Ophthalmol* **128**(4): 502-505.
- Holland, G. N. (2003). "Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease." *Am J Ophthalmol* **136**(6): 973-988.
- Holland, G. N. (2004). "Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management." *Am J Ophthalmol* **137**(1): 1-17.
- Holland, G. N. (2009). "Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 351-357.
- Holland, G. N., W. C. Buhles, Jr., B. Mastre e H. J. Kaplan (1989). "A controlled retrospective study of ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinopathy. Use of a standardized system for the assessment of disease outcome. UCLA CMV Retinopathy. Study Group." *Arch Ophthalmol* **107**(12): 1759-1766.
- Holland, G. N., K. G. Lewis e G. R. O'Connor (2002). "Ocular toxoplasmosis: a 50th anniversary tribute to the contributions of Helenor Campbell Wilder Foerster." *Arch Ophthalmol* **120**(8): 1081-1084.
- Hori, J., J. L. Vega e S. Masli (2010). "Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye." *Ocul Immunol Inflamm* **18**(5): 325-333.
- Horvath, S., X. Xu e N. M. Laird (2001). "The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations." *Eur J Hum Genet* **9**(4): 301-306.
- Hou, B., A. Benson, L. Kuzmich, A. L. DeFranco e F. Yarovinsky (2011). "Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 278-283.
- Howe, D. K., S. Honore, F. Derouin e L. D. Sibley (1997). "Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis." *J Clin Microbiol* **35**(6): 1411-1414.

- Howe, D. K., B. C. Summers e L. D. Sibley (1996). "Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*." *Infect Immun* **64**(12): 5193-5198.
- Hsu, L. C., S. R. Ali, S. McGillivray, P. H. Tseng, S. Mariathasan, E. W. Humke, . . . M. Karin (2008). "A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7803-7808.
- Hunn, J. P., C. G. Feng, A. Sher e J. C. Howard (2011). "The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens." *Mamm Genome* **22**(1-2): 43-54.
- Inagaki, A. D., L. A. Oliveira, M. F. Oliveira, R. C. Santos, R. M. Araujo, J. A. Alves, . . . M. M. Mussi-Pinhata (2009). "[Seroprevalence of antibodies for toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, syphilis and HIV among pregnant women in Sergipe]." *Rev Soc Bras Med Trop* **42**(5): 532-536.
- Innes, E. A. (2010). "A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*." *Zoonoses Public Health* **57**(1): 1-7.
- Jabs, D. A., R. B. Nussenblatt, J. T. Rosenbaum e G. Standardization of Uveitis Nomenclature Working (2005). "Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop." *Am J Ophthalmol* **140**(3): 509-516.
- Jamieson, S. E., H. Cordell, E. Petersen, R. McLeod, R. E. Gilbert e J. M. Blackwell (2009). "Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 162-169.
- Jamieson, S. E., L. A. de Roubaix, M. Cortina-Borja, H. K. Tan, E. J. Mui, H. J. Cordell, . . . J. M. Blackwell (2008). "Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis." *PLoS One* **3**(6): e2285.
- Jamieson, S. E., A. L. Peixoto-Rangel, A. C. Hargrave, L. A. Roubaix, E. J. Mui, N. R. Boulter, . . . J. M. Blackwell (2010). "Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis." *Genes Immun* **11**(5): 374-383.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, . . . A. Sher (2007). "Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection." *J Exp Med* **204**(2): 273-283.

- John, B., T. H. Harris, E. D. Tait, E. H. Wilson, B. Gregg, L. G. Ng, . . . C. A. Hunter (2009). "Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with *Toxoplasma gondii*." *PLoS Pathog* **5**(7): e1000505.
- Johnson, L. L. e 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, K. Sanders-Lewis e M. Wilson (2007). "Toxoplasma gondii infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade." *Am J Trop Med Hyg* **77**(3): 405-410.
- Jones, J. L., A. Lopez, M. Wilson, J. Schulkin e R. Gibbs (2001). "Congenital toxoplasmosis: a review." *Obstet Gynecol Surv* **56**(5): 296-305.
- Kawai, T. e S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- Kawai, T. e S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* **34**(5): 637-650.
- Kaye, A. (2011). "Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants." *J Pediatr Health Care* **25**(6): 355-364.
- Kelly, M. N., J. K. Kolls, K. Happel, J. D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, . . . I. A. Khan (2005). "Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection." *Infect Immun* **73**(1): 617-621.
- Khan, A., J. P. Dubey, C. Su, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal e L. D. Sibley (2011). "Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America." *Int J Parasitol* **41**(6): 645-655.
- Khan, A., B. Fux, C. Su, J. P. Dubey, M. L. Darde, J. W. Ajioka, . . . L. D. Sibley (2007). "Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(37): 14872-14877.
- Khan, A., C. Jordan, C. Muccioli, A. L. Vallochi, L. V. Rizzo, R. Belfort, Jr., . . . L. D. Sibley (2006). "Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil." *Emerg Infect Dis* **12**(6): 942-949.
- Khan, I. A., S. Y. Thomas, M. M. Moretto, F. S. Lee, S. A. Islam, C. Combe, . . . A. D. Luster (2006). "CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection." *PLoS Pathog* **2**(6): e49.
- Kijlstra, A. e E. Jongert (2009). "Toxoplasma-safe meat: close to reality?" *Trends Parasitol* **25**(1): 18-22.

- Kim, Y. M., M. M. Brinkmann, M. E. Paquet e H. L. Ploegh (2008). "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes." *Nature* **452**(7184): 234-238.
- Knapp, M. (1999). "Using exact P values to compare the power between the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test and the sib transmission/disequilibrium test." *Am J Hum Genet* **65**(4): 1208-1210.
- Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez e R. A. Flavell (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." *Science* **307**(5710): 731-734.
- Korbel, D. S., O. C. Finney e E. M. Riley (2004). "Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens." *Int J Parasitol* **34**(13-14): 1517-1528.
- Kurokawa, T., T. Kikuchi, K. Ohta, H. Imai e N. Yoshimura (2003). "Ocular manifestations in Blau syndrome associated with a CARD15/Nod2 mutation." *Ophthalmology* **110**(10): 2040-2044.
- Labalette, P., L. Delhaes, F. Margaron, B. Fortier e J. F. Rouland (2002). "Ocular toxoplasmosis after the fifth decade." *Am J Ophthalmol* **133**(4): 506-515.
- Lago, E. G., G. S. Conrado, C. S. Piccoli, R. L. Carvalho e A. L. Bender (2009). "Toxoplasma gondii antibody profile in HIV-infected pregnant women and the risk of congenital toxoplasmosis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**(4): 345-351.
- Lahmar, I., A. Abou-Bacar, T. Abdelrahman, M. Guinard, H. Babba, S. Ben Yahia, . . . E. Candolfi (2009). "Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis." *J Infect Dis* **199**(8): 1239-1249.
- Laird, N. M., S. Horvath e X. Xu (2000). "Implementing a unified approach to family-based tests of association." *Genet Epidemiol* **19 Suppl 1**: S36-42.
- Lange, K., J. S. Sinsheimer e E. Sobel (2005). "Association testing with Mendel." *Genet Epidemiol* **29**(1): 36-50.
- LaRosa, D. F., J. S. Stumhofer, A. E. Gelman, A. H. Rahman, D. K. Taylor, C. A. Hunter e L. A. Turka (2008). "T cell expression of MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3855-3860.
- Lebech, M., S. O. Larsen e E. Petersen (1993). "Prevalence, incidence and geographical distribution of Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women in Denmark." *Scand J Infect Dis* **25**(6): 751-756.
- Lee, M. S. e Y. J. Kim (2007). "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk." *Annu Rev Biochem* **76**: 447-480.

- Lees, M. P., S. J. Fuller, R. McLeod, N. R. Boulter, C. M. Miller, A. M. Zakrzewski, . . . 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.
- Lehmann, T., P. L. Marcet, D. H. Graham, E. R. Dahl e J. P. Dubey (2006). "Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11423-11428.
- Lejeune, M., J. M. Miro, E. De Lazzari, F. Garcia, X. Claramonte, E. Martinez, . . . G. Spanish *Toxoplasma gondii* Study (2011). "Restoration of T cell responses to *Toxoplasma gondii* after successful combined antiretroviral therapy in patients with AIDS with previous toxoplasmic encephalitis." *Clin Infect Dis* **52**(5): 662-670.
- Lenertz, L. Y., M. L. Gavala, Y. Zhu e P. J. Bertics (2011). "Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions." *Immunol Res* **50**(1): 22-38.
- Lie, Y. S. e C. J. Petropoulos (1998). "Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays." *Curr Opin Biotechnol* **9**(1): 43-48.
- Lister, M. F., J. Sharkey, D. A. Sawatzky, J. P. Hodgkiss, D. J. Davidson, A. G. Rossi e K. Finlayson (2007). "The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation." *J Inflamm (Lond)* **4**: 5.
- Liu, C. H., Y. T. Fan, A. Dias, L. Esper, R. A. Corn, A. Bafica, . . . 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.
- Lopes, F. M., R. Mitsuka-Bregano, D. D. Goncalves, R. L. Freire, C. J. Karigyo, G. F. Wedy, . . . I. T. Navarro (2009). "Factors associated with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Parana, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 378-382.
- Lopes, W. D., T. R. Santos, S. da Silva Rdos, W. M. Rossanese, F. A. de Souza, J. D. de Faria Rodrigues, . . . A. J. Costa (2010). "Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, Sao Paulo State, Brazil." *Res Vet Sci* **88**(1): 104-106.
- Lu, F., S. Huang e L. H. Kasper (2003). "Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis." *Infect Immun* **71**(12): 7159-7163.
- Lu, F., S. Huang e L. H. Kasper (2004). "CD4+ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis." *Infect Immun* **72**(9): 4966-4972.

- Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, . . . R. R. Caspi (2008). "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category." *J Exp Med* **205**(4): 799-810.
- Lum, F., J. L. Jones, G. N. Holland e T. J. Liesegang (2005). "Survey of ophthalmologists about ocular toxoplasmosis." *Am J Ophthalmol* **140**(4): 724-726.
- Lyons, R. E., J. P. Anthony, D. J. Ferguson, N. Byrne, J. Alexander, F. Roberts e C. W. Roberts (2001). "Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6." *Infect Immun* **69**(4): 2589-2595.
- Mack, D. G., J. J. Johnson, F. Roberts, C. W. Roberts, R. G. Estes, C. David, . . . R. McLeod (1999). "HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection." *Int J Parasitol* **29**(9): 1351-1358.
- Marischen, L., D. Wesch, H. H. Oberg, P. Rosenstiel, A. Trad, M. Shomali, . . . D. Kabelitz (2011). "Functional expression of NOD2 in freshly isolated human peripheral blood gammadelta T cells." *Scand J Immunol* **74**(2): 126-134.
- Martinon, F., K. Burns e J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**(2): 417-426.
- Melo, M. B., P. Kasperkovitz, A. Cerny, S. Konen-Waisman, E. A. Kurt-Jones, E. Lien, . . . R. T. Gazzinelli (2010). "UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001071.
- Messier, V., B. Levesque, J. F. Proulx, L. Rochette, M. D. Libman, B. J. Ward, . . . B. Dixon (2009). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada)." *Zoonoses Public Health* **56**(4): 188-197.
- Mets, M. B., E. Holfels, K. M. Boyer, C. N. Swisher, N. Roizen, L. Stein, . . . R. McLeod (1996). "Eye manifestations of congenital toxoplasmosis." *Am J Ophthalmol* **122**(3): 309-324.
- Meylan, E., J. Tschopp e M. Karin (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." *Nature* **442**(7098): 39-44.
- Miller, C. M., A. M. Zakrzewski, R. J. Ikin, N. R. Boulter, M. Katrib, M. P. Lees, . . . N. C. Smith (2011). "Dysregulation of the inflammatory response to the parasite, *Toxoplasma gondii*, in P2X7 receptor-deficient mice." *Int J Parasitol* **41**(3-4): 301-308.
- Miller, N. L., J. K. Frenkel e J. P. Dubey (1972). "Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds." *J Parasitol* **58**(5): 928-937.

- Mineo, J. R., M. E. Camargo e A. W. Ferreira (1980). "Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis." Infect Immun **27**(2): 283-287.
- Minns, L. A., L. C. Menard, D. M. Foureau, S. Darche, C. Ronet, D. W. Mielcarz, . . . 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.
- Mun, H. S., F. Aosai, K. Norose, M. Chen, L. X. Piao, O. Takeuchi, . . . A. Yano (2003). "TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection." Int Immunol **15**(9): 1081-1087.
- Munoz, M., M. M. Heimesaat, K. Danker, D. Struck, U. Lohmann, R. Plickert, . . . O. Liesenfeld (2009). "Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17." J Exp Med **206**(13): 3047-3059.
- Naser, S. A., M. Arce, A. Khaja, M. Fernandez, N. Naser, S. Elwasila e S. Thanigachalam (2012). "Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis." World J Gastroenterol **18**(5): 412-424.
- Nejentsev, S., N. Walker, D. Riches, M. Egholm e J. A. Todd (2009). "Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes." Science **324**(5925): 387-389.
- Norose, K., A. Kikumura, A. D. Luster, C. A. Hunter e T. H. Harris (2011). "CXCL10 is required to maintain T-cell populations and to control parasite replication during chronic ocular toxoplasmosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(1): 389-398.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-1067.
- O'Connell, J. R. e D. E. Weeks (1998). "PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis." Am J Hum Genet **63**(1): 259-266.
- Okafuji, I., R. Nishikomori, N. Kanazawa, N. Kambe, A. Fujisawa, S. Yamazaki, . . . T. Nakahata (2009). "Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis." Arthritis Rheum **60**(1): 242-250.
- Olariu, T. R., J. S. Remington, R. McLeod, A. Alam e J. G. Montoya (2011). "Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants." Pediatr Infect Dis J **30**(12): 1056-1061.
- Olbrich Neto, J. e D. A. Meira (2004). "[Soroprevalence of HTLV-I/II, HIV, siphylis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu - Sao Paulo - Brazil: risk factors for HTLV-I/II infection]." Rev Soc Bras Med Trop **37**(1): 28-32.

- Pappas, G., N. Roussos e 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.
- Passos, S. T., J. S. Silver, A. C. O'Hara, D. Sehy, J. S. Stumhofer e C. A. Hunter (2010). "IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis." *J Immunol* **184**(4): 1776-1783.
- Peixoto-Rangel, A. L., E. N. Miller, L. Castellucci, S. E. Jamieson, R. G. Peixe, S. Elias Lde, . . . 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.
- Pena, H. F., S. M. Gennari, J. P. Dubey e C. Su (2008). "Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil." *Int J Parasitol* **38**(5): 561-569.
- Pereira-Chioccola, V. L., J. E. Vidal e C. Su (2009). "Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients." *Future Microbiol* **4**: 1363-1379.
- Pergola, G., A. Cascone e M. Russo (2010). "Acute pericarditis and myocarditis by *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man: a case report." *Infez Med* **18**(1): 48-52.
- Pifer, R., A. Benson, C. R. Sturge e 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.
- Plattner, F., F. Yarovinsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher e 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.
- Pollock, N. L. e R. Callaghan (2011). "The lipid translocase, ABCA4: seeing is believing." *FEBS J* **278**(18): 3204-3214.
- Portela, R. W., J. Bethony, M. I. Costa, A. Gazzinelli, R. W. Vitor, F. M. Hermeto, . . . R. T. Gazzinelli (2004). "A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A." *J Infect Dis* **190**(1): 175-183.
- Porto, A. M., M. M. Amorim, I. C. Coelho e L. C. Santos (2008). "[Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women attended at a teaching-hospital in Recife]." *Rev Assoc Med Bras* **54**(3): 242-248.
- Prigione, I., S. Chiesa, P. Taverna, R. Ceccarelli, R. Frulio, F. Morandi, . . . 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 e 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.
- Raiji, V. R., M. M. Miller e L. K. Jung (2011). "Uveitis in Blau syndrome from a de novo mutation of the NOD2/CARD15 gene." *J AAPOS* **15**(2): 205-207.
- Reiche, E. M., H. K. Morimoto, G. N. Farias, K. R. Hisatsugu, L. Geller, A. C. Gomes, . . . T. Matsuo (2000). "[Prevalence of American trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, at the Regional University Hospital Norte do Parana]." *Rev Soc Bras Med Trop* **33**(6): 519-527.
- Ribeiro, A. C., M. S. Mutis e 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.
- Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, . . . A. Aderem (2005). "The evolution of vertebrate Toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9577-9582.
- Roberts, F., M. B. Mets, D. J. Ferguson, R. O'Grady, C. O'Grady, P. Thulliez, . . . R. McLeod (2001). "Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant." *Arch Ophthalmol* **119**(1): 51-58.
- Rogers, N. M., C. A. Peh, R. Faull, M. Pannell, J. Cooper e 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.
- Rose, P. S., H. P. Levy, R. M. Liberfarb, J. Davis, Y. Szymko-Bennett, B. I. Rubin, . . . C. A. Francomano (2005). "Stickler syndrome: clinical characteristics and diagnostic criteria." *Am J Med Genet A* **138A**(3): 199-207.
- Russo, M. (1994). "[Toxoplasmosis in pregnancy. Prevention, diagnosis, and therapy]." *Recenti Prog Med* **85**(1): 37-48.
- Saavedra, R., F. de Meuter, J. L. Decourt e 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.
- Sabbah, A., T. H. Chang, R. Harnack, V. Frohlich, K. Tominaga, P. H. Dube, . . . S. Bose (2009). "Activation of innate immune antiviral responses by Nod2." *Nat Immunol* **10**(10): 1073-1080.

- Saeij, J. P., J. P. Boyle e 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, . . . 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.
- Segundo, G. R., D. A. Silva, J. R. Mineo e M. S. Ferreira (2004a). "A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlandia, MG, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(1): 13-17.
- Segundo, G. R., D. A. Silva, J. R. Mineo e M. S. Ferreira (2004b). "Congenital toxoplasmosis in Uberlandia, MG, Brazil." J Trop Pediatr **50**(1): 50-53.
- Shaw, M. H., T. Reimer, C. Sanchez-Valdepenas, N. Warner, Y. G. Kim, M. Fresno e G. Nunez (2009). "T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*." Nat Immunol **10**(12): 1267-1274.
- Sibley, L. D. (2003). "*Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style." Traffic **4**(9): 581-586.
- Sibley, L. D. e J. W. Ajioka (2008). "Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps." Annu Rev Microbiol **62**: 329-351.
- Sibley, L. D. e J. C. Boothroyd (1992). "Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage." Nature **359**(6390): 82-85.
- Silveira, C., R. Belfort, Jr., M. Burnier, Jr. e R. Nussenblatt (1988). "Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families." Am J Ophthalmol **106**(3): 362-364.
- Silveira, C., R. Belfort, Jr., C. Muccioli, M. T. Abreu, M. C. Martins, C. Victora, . . . G. N. Holland (2001). "A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil." Am J Ophthalmol **131**(3): 351-354.
- Silveira, C., R. Ferreira, C. Muccioli, R. Nussenblatt e R. Belfort, Jr. (2003). "Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier." Am J Ophthalmol **136**(2): 370-371.
- Slatkin, M. (2008). "Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future." Nat Rev Genet **9**(6): 477-485.

- Soares, J. A., L. S. Nasser, S. F. Carvalho e A. P. Caldeira (2011). "[Ocular findings in children with congenital toxoplasmosis]." *Arq Bras Oftalmol* **74**(4): 255-257.
- Sobral, C. A., M. R. Amendoeira, A. Teva, B. N. Patel e C. H. Klein (2005). "Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations." *Am J Trop Med Hyg* **72**(1): 37-41.
- Spalding, S. M., M. R. Amendoeira, C. H. Klein e L. C. Ribeiro (2005). "Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil." *Rev Soc Bras Med Trop* **38**(2): 173-177.
- Sroka, S., N. Bartelheimer, A. Winter, J. Heukelbach, L. Ariza, H. Ribeiro, . . . O. Liesenfeld (2010). "Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil." *Am J Trop Med Hyg* **83**(3): 528-533.
- Steinfeldt, T., S. Konen-Waisman, L. Tong, N. Pawlowski, T. Lamkemeyer, L. D. Sibley, . . . J. C. Howard (2010). "Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*." *PLoS Biol* **8**(12): e1000576.
- Streilein, J. W., B. R. Ksander e A. W. Taylor (1997). "Immune deviation in relation to ocular immune privilege." *J Immunol* **158**(8): 3557-3560.
- Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, . . . C. A. Hunter (2006). "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system." *Nat Immunol* **7**(9): 937-945.
- Subauste, C. S., M. Wessendarp, R. U. Sorensen e L. E. Leiva (1999). "CD40-CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*: patients with hyper IgM syndrome have a defective type 1 immune response that can be restored by soluble CD40 ligand trimer." *J Immunol* **162**(11): 6690-6700.
- Suzuki, Y., X. Wang, B. S. Jortner, L. Payne, Y. Ni, S. A. Michie, . . . 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.
- Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, . . . 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.
- Taila, A. K., A. S. Hingwe e L. E. Johnson (2011). "Toxoplasmosis in a patient who was immunocompetent: a case report." *J Med Case Reports* **5**(1): 16.
- Takeda, K. e S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* **17**(1): 1-14.

- Tenter, A. M. (2009). "Toxoplasma gondii in animals used for human consumption." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 364-369.
- Tenter, A. M., A. R. Heckerroth e L. M. Weiss (2000). "Toxoplasma gondii: from animals to humans." *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1217-1258.
- Trager, E. H., R. Khanna, A. Marrs, L. Siden, K. E. Branham, A. Swaroop e J. E. Richards (2007). "Madeline 2.0 PDE: a new program for local and web-based pedigree drawing." *Bioinformatics* **23**(14): 1854-1856.
- Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase e H. Takada (2007). "Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines." *Mol Immunol* **44**(12): 3100-3111.
- van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, . . . E. C. de Jong (2007). "Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells." *Immunity* **27**(4): 660-669.
- Varella, I. S., M. B. Wagner, A. C. Darela, L. M. Nunes e R. W. Muller (2003). "[Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women]." *J Pediatr (Rio J)* **79**(1): 69-74.
- Vasconcelos-Santos, D. V., D. O. Machado Azevedo, W. R. Campos, F. Orefice, G. M. Queiroz-Andrade, E. V. Carellos, . . . U. C. T. B. Group (2009). "Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates." *Ophthalmology* **116**(11): 2199-2205 e2191.
- Vaz, R. S., V. Thomaz-Soccol, E. Sumikawa e A. T. Guimaraes (2010). "Serological prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women from Southern Brazil." *Parasitol Res* **106**(3): 661-665.
- Velasco-Castrejon, O., B. Salvatierra-Izaba, J. L. Valdespino, A. M. Sedano-Lara, S. Galindo-Virgen, C. Magos, . . . J. Sepulveda (1992). "[Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico]." *Salud Publica Mex* **34**(2): 222-229.
- Velasquez-Melendez, G., F. C. Parra, A. Gazzinelli, S. Williams-Blangero e R. Correa-Oliveira (2007). "Genetic determinants of risk factors for cardiovascular disease in a population from rural Brazil." *Hum Biol* **79**(2): 179-190.
- Villena, I., T. Ancelle, C. Delmas, P. Garcia, A. P. Brezin, P. Thulliez, . . . T. National Reference Centre for (2010). "Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system." *Euro Surveill* **15**(25).
- Wallon, M., P. Gaucherand, M. Al Kurdi e F. Peyron (2002). "[Toxoplasma infections in early pregnancy: consequences and management]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **31**(5): 478-484.

- Wang, X., H. Kang, T. Kikuchi e Y. Suzuki (2004). "Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease." *Infect Immun* **72**(8): 4432-4438.
- Watanabe, T., A. Kitani, P. J. Murray e W. Strober (2004). "NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses." *Nat Immunol* **5**(8): 800-808.
- Williams-Blangero, S. e J. Blangero (2006). "Collection of pedigree data for genetic analysis in isolate populations." *Hum Biol* **78**(1): 89-101.
- Witola, W. H., E. Mui, A. Hargrave, S. Liu, M. Hypolite, A. Montpetit, . . . 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.
- Yamamoto, J. H., A. L. Vallochi, C. Silveira, J. K. Filho, R. B. Nussenblatt, E. Cunha-Neto, . . . L. V. Rizzo (2000). "Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens." *J Infect Dis* **181**(6): 2018-2022.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, . . . A. Sher (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." *Science* **308**(5728): 1626-1629.
- Yoshimura, T., K. H. Sonoda, N. Ohguro, Y. Ohsugi, T. Ishibashi, D. J. Cua, . . . A. Yoshimura (2009). "Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis." *Rheumatology (Oxford)* **48**(4): 347-354.
- Zheng, X., F. Bian, P. Ma, C. S. De Paiva, M. Stern, S. C. Pflugfelder e D. Q. Li (2010). "Induction of Th17 differentiation by corneal epithelial-derived cytokines." *J Cell Physiol* **222**(1): 95-102.
- Zheng, X., C. S. de Paiva, D. Q. Li, W. J. Farley e S. C. Pflugfelder (2010). "Desiccating stress promotion of Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(6): 3083-3091.
- Zhu, J. e W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* **112**(5): 1557-1569.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do projeto “Receptores da imunidade inata que reconhecem o *T. gondii*”, no Comitê de Ética do CPqRR



MEMORANDO N° 28/2008 CEP – CPqRR/ FIOCRUZ

Belo Horizonte, 20 de Outubro de 2008

Ao
Dr. Rodrigo Correa Oliveira
Pesquisador Responsável pelo PROTOCOLO N° 11/2006

De: Dr. João Carlos Pinto Dias – Coordenador do Comitê de Ética/ CPqRR

Assunto: Aprovação de Emenda do Protocolo N° 11/2006 CEP – CPqRR
(CAAE: 0005.0.245.000-06)

Informamos que a proposta de emenda do projeto intitulado “*Receptores da Imunidade Inata que reconhecem o T. gondii*”, (versão 1.0 de Setembro de 2008), PARECER N° 12/2006 - CEP/CPqRR, pesquisador responsável Dr. Rodrigo Correia Oliveira, após os devidos esclarecimentos foi homologada pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou, sendo considerada pertinente ao projeto.

Atenciosamente,



João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEP-CPqRR

Dr. João Carlos Pinto Dias
COORDENADOR
COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO B - Termo de esclarecimento apresentado aos pacientes para coleta de sangue nas populações do vale do Jequitinhonha

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

Título do projeto de pesquisa: RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA QUE RECONHECEM O *TOXOPLASMA GONDII*

Nome do Investigador Principal:

Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Dsci
Rodrigo Correa-Oliveira, PhD

Nome do Indivíduo: _____

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa que estamos realizando para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da toxoplasmose. Atualmente estão sendo publicadas pesquisas médicas que demonstram que as manifestações da toxoplasmose podem ser diferentes de acordo com as respostas imunológicas do organismo de cada indivíduo. Você foi escolhido para participar da pesquisa porque você ou seu filho(a) tem toxoplasmose e, neste caso, a informação do seu sangue vai servir para entendermos melhor a doença.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é determinar os mecanismos pelos quais a infecção com o *Toxoplasma* causa doença em humanos. O melhor entendimento de como o ser humano se torna susceptível ou resistente a infecção pode nos levar a descobrir novas formas de prevenir a toxoplasmose.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é estritamente voluntária. A recusa de participar deste estudo não irá resultar em nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Para se retirar imediatamente do estudo você poderá entrar em contato com o Dr. Ricardo T. Gazzinelli (31-3349-7774). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante o desenvolvimento deste projeto que possa afetar sua disponibilidade de participar do estudo.

Procedimento

A sua participação nesta pesquisa envolverá o exame oftalmológico e a coleta de sangue. Para ser incorporado a este estudo, você deverá assinar o Termo de Consentimento. Você não deverá ter nenhuma doença conhecida. Você não deve estar sob tratamento médico e não pode ser gestante. Nós gostaríamos de coletar de 50ml de seu sangue, um processo que levará em torno de dois minutos. O sangue coletado será levado para o nosso laboratório de estudo, onde será extraído o DNA (ácido desoxirribonucleico) que, submetido a testes, possibilitará o melhor entendimento da toxoplasmose humana.

Riscos

Os riscos que você corre doando pequenas quantidades de sangue são praticamente nulos. Você não deve sentir nenhum desconforto causado pela coleta. Se você tiver qualquer dano como resultado direto da sua participação nesta pesquisa, o tratamento será disponibilizado gratuitamente pelo serviço do Centro de Pesquisas René Rachou.

Benefícios

Não há nenhum benefício direto por estar participando deste estudo. Entretanto, sua participação deve nos ajudar a entender como o parasito *Toxoplasma gondii* causa doença em humanos. No futuro, terapias melhores podem ser criadas como resultado do conhecimento adquirido neste estudo.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional por você estar participando deste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto de pesquisa serão todos feitos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre seus exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações, as suas amostras de saliva não serão identificadas e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. Seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo. Nenhuma informação obtida desta pesquisa será incluída no histórico médico do paciente.

Questões

Por favor, sinta-se à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Ricardo T. Gazzinelli (31-3349-7774), o investigador principal deste projeto. Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você desejar discutir o estudo ou os seus direitos na pesquisa com alguém que não está associado com o projeto proposto, você poderá entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31) 3409-4592; 3409-4027. O COEP funciona na Avenida Antônio Carlos 6627, Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer, foram explicados para mim. Eu também fui avisado que eventos imprevisíveis podem ocorrer e tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Criança ou jovem (menor de 18 anos)

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, concordo com a sua participação, como voluntário(a), no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado(a)

que a sua participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

Adulto (maior de 18 anos)

Eu, _____, RG nº _____, concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a minha participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data:
Assinatura do Indivíduo

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O Investigador Principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data:
Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO C -Termo de consentimento apresentado aos pacientes submetidos a coleta de sangue e humor aquoso no hospital São Geraldo em Belo Horizonte

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA O DOENTE

Título do projeto: “Utilização de espécimes oculares na propedêutica das uveítes”

Eu, Anna Christina Higino Rocha e outros pesquisadores, estamos convidando você a participar do estudo chamado “Utilização de espécimes oculares na propedêutica das uveítes”. Antes de tomar a decisão, é importante que você entenda porque a pesquisa está sendo feita e o que ela envolverá.

Você tem uma doença que se chama uveíte, que é uma inflamação do olho em que o sintoma mais encontrado é a piora da visão (podendo chegar até mesmo a cegueira). Essa doença precisa de tratamento rápido e adequado para evitar ou diminuir os danos à visão.

A gravidade da uveíte depende da causa, que frequentemente é infecciosa (bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos). As uveítes infecciosas podem evoluir para a cegueira e o tratamento rápido e adequado pode evitar tal complicação.

No entanto, em algumas situações não é possível identificar o agente causador apesar de todos os esforços (realização dos exames de rotina, o qual nós já fizemos). Nesses casos, por atraso no tratamento ou por falta de tratamento adequado, o paciente estará sujeito a complicações mais graves da doença. Assim, é necessária a realização de biópsia para identificar a causa da doença. Algumas vezes, serão necessárias cirurgias para tratar complicações da uveíte (catarata, cirurgia de glaucoma, transplante de córnea, virectomia e outras).

A pesquisa utilizará o material que será retirado durante a biópsia ou cirurgia sem aumentar o risco para você.

A decisão de participar é totalmente sua. Se você decidir participar, mesmo assim, terá a liberdade de retirar-se a qualquer momento e sem dar explicações; sem que isso afete o padrão de atendimento que você recebe. Se decidir suspender sua participação, deverá avisar seu médico imediatamente. Para sua própria segurança, seu médico realizará um exame de encerramento do estudo.

Os procedimentos indicados serão realizados mesmo que você não queira participar do estudo.

Você será submetido aos seguintes exames:

- Exame de sangue: hemograma, plaquetas, sorologia para toxoplasmose, VDRL, hemaglutinação para *Treponema pallidum*, e outros que se fizerem necessários;
- Teste tuberculínico (teste na pele);
- Raio X de tórax;
- Avaliação com pneumologista e/ou reumatologista quando se fizer necessário;
- Exame do olho por lâmpada de fenda (avaliação de sua córnea, íris, câmara anterior e cristalino);
- Medição da sua pressão ocular;

- Avaliação de acuidade visual (leitura de letras em uma tabela);
- Exame de fundo de olho sob midríase (dilatação das pupilas);
- Retinografia colorida e angiofluoresceinografia de acordo com critérios médicos.

Você não receberá pagamento ou qualquer tipo de compensação financeira por participar deste estudo.

Você deverá comparecer aos exames ou avisar, em caso de impossibilidade, para que eles sejam remarcados.

Deverá usar os medicamentos recomendados. Não há restrições alimentares. Você não deverá usar nenhuma outra medicação sem antes consultar seu médico.

Ao fim do estudo, seu médico manterá um controle clínico conforme a sua necessidade.

Em caso de complicações, você receberá o primeiro atendimento no Serviço de Urgência do Hospital São Geraldo e a seguir, encaminhado ao Serviço de Uveítes do mesmo Hospital para acompanhamento.

Seu oftalmologista saberá que você está participando deste estudo. Seu médico manterá seus registros (diagrama hospitalares e documentos relacionados a este estudo) em sigilo.

Os resultados do estudo poderão ser publicados ou revelados para as outras pessoas de maneira que não o identifiquem. Autoridades regulatórias, auditores, membros do Comitê de Ética poderão inspecionar seus registros relacionados ao estudo em qualquer momento.

Uma cópia dos dados também será mantida no hospital.

Esperamos que estas informações resolvam a maioria de suas dúvidas. Se você tiver mais perguntas ou se não entender as informações abaixo, sinta-se livre para perguntar a seu médico ou contatar:

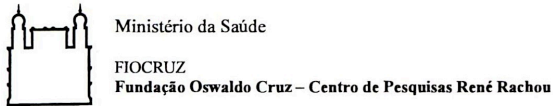
- Médica do estudo: Dra. Anna Christina Higino Rocha. Av. Alfredo Balena, 190. Hospital São Geraldo, Serviço de Uveítes. Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG. CEP: 30130-100. Telefone: (31) 3409-9620.
- Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais: Av. Antônio Carlos, Unidade Administrativa II (Prédio da FUNDEP), sala 2005. Pampulha, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592.

Nome do Paciente

Nome do Médico

Belo Horizonte, ____/____/____.

ANEXO D – Ficha de avaliação oftalmológica utilizada pelos médicos oftalmologistas para avaliar os pacientes do Vale do Jequitinhonha



EXAME OFTALMOLÓGICO

Nome:	Casa:	ID:
Médico:	Data do exame: / /	

1. Visão testada Sim Não

Em caso afirmativo:

A visão foi considerada

Olho direito

Olho esquerdo

Normal

Reduzida

Normal

Reduzida

Método utilizado _____

2. Qual era a acuidade visual?

Exame não realizado

Olho direito

Ambos os olhos

Olho esquerdo

Olho direito

Olho esquerdo

3. As pupilas foram dilatadas?

Sim

Não

Sim

Não

4. Qual o método oftalmoscópico utilizado?

Indireto

Direto

Indireto

Direto

5. O fundo de olho foi facilmente visualizado?

Sim

Não

Sim

Não

Em caso negativo, indique a razão:

Exame difícil

Opacidade corneana

Opacidade vítrea

Em caso afirmativo, PREENCHA O QUADRO NO VERSO.

6. Alguma lesão retinocoroidiana foi detectada?

Sim

Não

Sim

Não

Em caso afirmativo:

Qual a localização das lesões?

Pólo posterior

Periferia

Pólo posterior

Periferia

7. Alguma lesão retinocoroidiana ativa?

Sim

Não

Sim

Não

8. Favor desenhar TODAS as lesões nos diagramas abaixo. Marque com uma seta as lesões ativas (A) e lesões inativas (I), além do tamanho da lesão através de diâmetros disciais (DD):

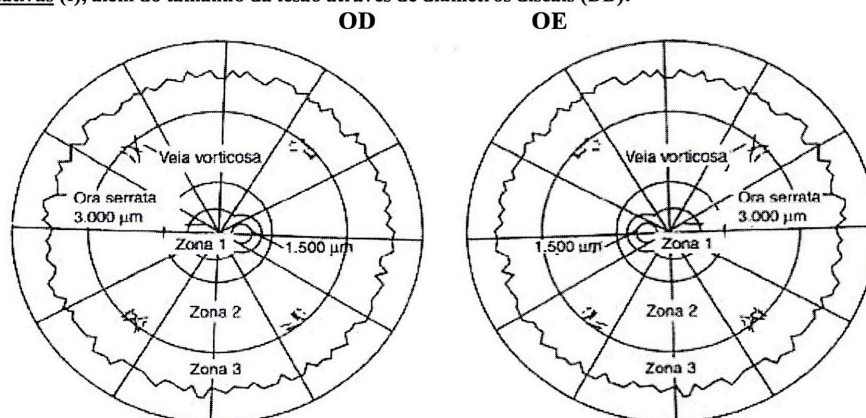


Figura 1: Divisão do fundo de olho em zonas (Holland e Buhles et al., 1989).

Zona 1: abrange a área compreendida pelas arcadas vasculares temporais, numa extensão de cerca de 3.000µm da fóvea ou de cerca de 1.500µm das margens do disco ótico. **Zona 2:** estende-se anteriormente a partir da zona 1 até o equador, identificado pelas bordas anteriores das ampolas das veias vorticosas. **Zona 3:** estende-se anteriormente a partir da zona 2 até a *ora serrata*.

9. Alguma outra anormalidade oftalmológica foi detectada? Sim Não Dado desconhecido

Em caso afirmativo, favor especificar: _____

10. Em caso de criança:

a) Em sua opinião, esta criança possui manifestações oculares de toxoplasmose?

Definitivamente sim Provavelmente Possível, mas improvável Definitivamente não

b) A criança alguma vez teve perda súbita da visão ou início súbito de dor ocular com duração de dias ou semanas?

Sim Não Não sabe Se SIM, quantos episódios? _____

Favor informar a data de início de cada episódio

(Mês/ano) ___/____

___/____

___/____

EXAME DE FUNDO DE OLHO					
	Olho direito		Olho esquerdo		Especifique
Hemorragia retiniana	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Descolamento de retina	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Disco					
Papiledema	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Atrofia ótica	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Papilite	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Justapapilar:					
Lesão ativa	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Cicatriz C.R. ^a	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Mácula					
Retinite ativa	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Cicatriz C.R. ^a	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Envolvimento da fóvea	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	_____
Vasos	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anormal	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anormal	_____
Periferia	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anormal	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anormal	_____
Retinite ativa	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Cicatriz C.R. ^a	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente	_____
Nova lesão	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	_____
Localização	<input type="checkbox"/> Macular		<input type="checkbox"/> Macular		_____
	<input type="checkbox"/> Periférica		<input type="checkbox"/> Periférica		_____
	<input type="checkbox"/> Peripapilar		<input type="checkbox"/> Peripapilar		_____
Número	_____		_____		_____
Satélite	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		_____
Idade da nova lesão	_____		_____		_____
Esteróides necessários	<input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim		_____
Score de gravidade^b	_____		_____		_____

^a C.R. = Coriorretiniana

^b Score de gravidade: 0 = visão normal, sem lesões; 1 = visão normal, lesões não maculares; 2 = visão normal, lesões maculares; 3 = visão prejudicada, lesões não maculares; 4 = visão prejudicada, lesões maculares; 4,5 = visão prejudicada, incapacidade de visualizar o pólo posterior em virtude de catarata ou de outra etiologia; e 5 = percepção luminosa não observável (descolamento de retina, eletrorretinograma grosseiramente anormal).

ANEXO E – Protocolo de extração de DNA segundo o método de Fenol-Clorofórmio utilizado para obtenção do DNA dos pacientes do Vale do Jequitinhonha

EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

- 1) Acrescentar a 200 μ L de sangue total: 10 μ L saponina 1% e 1000 μ L PBS (autoclavado). Incubar a 37°C por 5 min. Centrifugar 2000g por 15 min e desprezar o sobrenadante.
- 2) Lavar pelo menos 3 vezes (ou até o sobrenadante ficar claro) com 1000 μ L PBS e centrifugar a 2000g por 15 min.
- 3) Ao precipitado acrescentar solução de lise (200 μ L) composta por: 2 μ L Tris-HCl (pH 8.0) 1M, 2 μ L EDTA (pH 8.0) 500mM, 16 μ L NaCl 2,5M, 10 μ L SDS 10%, 2 μ L Proteinase K (20mg/mL) e 168 μ L água autoclavada. Incubar então a 37° C por 3h ou durante a noite. Inativar proteinase a 95°C por 10min.
- 4) Acrescentar 250 μ L de fenol equilibrado, misturar delicadamente por 10 minutos. Centrifugar a 10.000g por 5 min. Remover a fase aquosa (superior) para um novo tubo (1,5 mL).
- 5) Acrescentar 250 μ L fenol-clorofórmio (1:1). Centrifugar a 10.000g por 5 min. Remover a fase aquosa (superior) para um novo tubo ou remover o fenol-clorofórmio (fase inferior) e desprezá-lo, conservando a fase aquosa no "mesmo tubo". Acrescentar 250 μ L de clorofórmio. Centrifugar a 10.000g por 5 min. Remover a fase aquosa (superior) para um novo tubo ou remover o fenol-clorofórmio (fase inferior) e desprezá-lo, conservando a fase aquosa no "mesmo tubo".
- 6) Acrescentar 25 μ L de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 600 μ L de etanol gelado (100%), incubar a -20°C por ao menos 2h ou overnight. Centrifugar a 14.000g por 20 min, a 4°C, remover o sobrenadante. Acrescentar 600 μ L de etanol gelado 80%. Centrifugar a 14.000g por 20 min a 4°C. Remover o sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente.
- 7) Dissolver o precipitado (branco) em 100 μ L de água destilada.

ANEXO F – Protocolo de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro de pacientes

PROTOCOLO ELISA IgG ANTI-HUMANO

- 1) Sensibilizar placa (Imulon 2) com antígeno F3 (concentração de 1mg/ml). O antígeno deve ser diluído em 10ml de Tampão Carbonato 0,05M, pH9,6, distribuir 100µl por poço. Incubar durante a noite a 4°C. Lavar 3 vezes com PBS-T 0,15M/0,05%.
- 3) Bloquear com: Tampão BSA 2% por 2 horas a 37°C. Lavar 3 vezes com PBS-T 0,15M/0,05%.
- 4) Sorologia: Amostras de soro diluídas 1:100 em 100µl de PBS-T BSA 2%. Incubar por 1 hora a 37°C. Lavar 6 vezes com PBS-T 0,15M/0,05%
- 5) Conjugado – parte 1 (observar as diluições indicadas pelo fabricante). Anti- IgG biotilado (1:20000). Diluição em PBS-T BSA 2%. Incubar 1 hora a 37°C.
- 6) Conjugado- parte 2 (observar as diluições de trabalho enviadas pelo fabricante). Streptavidina- peroxidase (1:1000). Diluição em PBS-T BSA 2%. Incubar por 30 minutos a 37°C. Lavar 6 vezes com PBS-T 0,15M/0,05%
- 7) Revelação 100µl de TMB 10X + 30ml de H₂O₂ em 10ml de Tampão Citrato Fosfato pH 5,0. Parada com 50µl de ácido sulfúrico 1/20 (diluído em água). Ler as absorbâncias em 450nm.

Tampão Carbonato 0,1M pH 9,6:

NaHCO₃: 1,05g, Na₂CO₃: 1,32g. Ajustar o pH para 9,6 em 200ml de água. Ajustar o volume para 250ml com água deionizada. Alicotar e armazenar a -20°C.

Tampão Citrato - Fosfato 0,1M para substrato da Peroxidase:

NaH₂PO₄: 0,6g, Na₃C₆H₅O₇*2H₂O: 1,47g. Ajustar pH para 5,0 em 80ml de água. Ajustar volume para 100ml com água deionizada. Filtrar (0,45µm), alíquotar e estocar no -20°C.

ADENDOS

ADENDO A - Características detalhadas de todos os anticorpos utilizados no procedimento de citometria

Molécula alvo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Número de catálogo
CD3	FITC	UCTH1	eBioscience	11-0038
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048
CD4	APC	OKT4	eBioscience	17-0048
CD4	APC-eFluor® 780	RPA-T4	eBioscience	47-0049
CD4	PerCPCy5.5	RPA-T4	eBioscience	45-0049
CD8	FITC	OKT8	eBioscience	11-0086
HLA-DR	PE	LN3	eBioscience	12-9956
CD45RO	PerCP-eFluor® 710	UCHL1	eBioscience	46-0457
TNF- α	PE	MAb11	eBioscience	12-7349
TNF- α	Alexa Fluor® 700	MAb11	eBioscience	56-7349
IL-17A	PE	eBio64DEC17	eBioscience	12-7179
IL-17A	Alexa Fluor® 647	eBio64DEC17	eBioscience	51-7179
IFN- γ	PECy7	4SB3	eBioscience	25-7319
T-bet	PE	eBio4B10	eBioscience	12-5825
IL-2	APC	MQ117H12	BD	551383

ADENDO B – Tabela descritiva das lesões cicatrizadas encontradas nos indivíduos soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* do Vale do Jequitinhonha, MG (Continua).

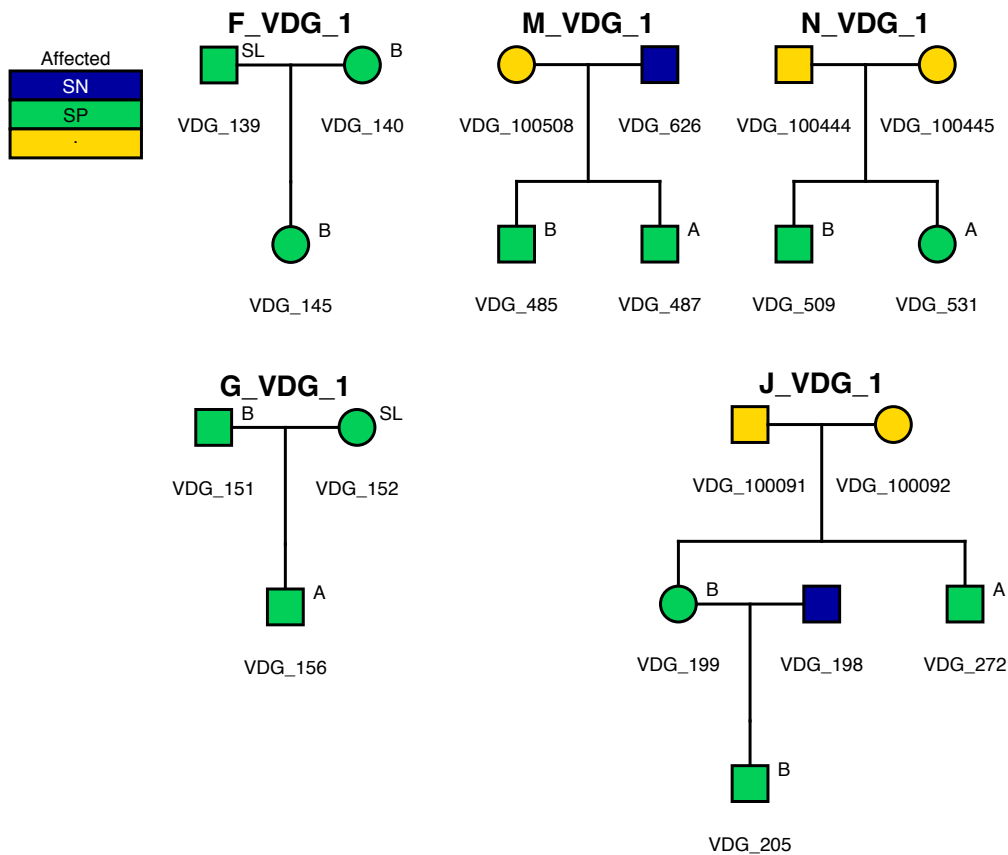
Caso	Idade	Sexo	Nº de lesões	Localização e tipo de lesão					
				Olho Direito			Olho esquerdo		
				Zn 1	Zn 2	Zn 3	Zn 1	Zn 2	Zn 3
1	50	M	3			1 (B)	2 (B)		
2	65	F	1					1 (A)	
3	97	M	1				1 (B)		
4	49	M	1				1 (B)		
5	20	F	6		1 (A)		1 (A)	1 (A) 3 (B)	
6	38	M	1			1 (A)			
7	32	M	2					1 (B)	1 (B)
8	74	F	8	1 (A)		1 (B)	4 (B)	2 (B)	
9	76	F	1					1 (A)	
10	78	F	2	1 (A)	1 (B)				
11	65	F	1						1 (B)
12	62	M	1 (B)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	10	F	4			4 (B)			
14	42	M	4	1 (B)		3 (B)			
15	55	F	1				1 (A)		
16	10	F	1		1 (B)				
17	38	F	1 (B)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	34	M	4						4 (B)
19	17	F	1				1 (B)		
20	68	F	1	1 (B)					
21	20	F	2			1 (B)			1 (B)
22	41	F	1		1 (B)				
23	14	M	1					1 (B)	
24	84	F	1					1 (B)	
25	41	F	1		1 (A)				
26	36	F	3			2 (B)			1 (A)
27	17	M	1		1 (B)				
28	76	M	3		2 (B)			1 (B)	
29	18	F	1		1 (B)				
30	57	F	1		1 (B)				
31	43	M	3		2 (B)			1 (B)	
32	13	F	2		1 (A)				1 (B)
33	64	F	1					1 (B)	
34	20	M	1				1 (B)		
35	65	F	2					1 (B)	1 (B)

ADENDO B – Conclusão

Caso	Idade	Sexo	Nº de lesões	Localização e tipo de lesão					
				Olho Direito			Olho esquerdo		
				Zn 1	Zn 2	Zn 3	Zn 1	Zn 2	Zn 3
36	11	F	1		1 (A)				
37	69	F	2		1 (A)			1 (A)	
38	67	M	1			1 (B)			
39	40	F	11		1 (A) 3 (B)	1 (A) 1 (B)		4 (B)	1 (B)
40	32	F	2					2 (B)	
41	23	F	1					1 (A)	
42	62	M	2		1 (A)			1 (B)	
43	46	F	1					1 (A)	
44	49	M	1					1 (A)	
45	21	F	3			1 (B)			2 (B)
46	23	F	1				1 (B)		
47	18	F	1						1 (B)
48	50	M	2		1 (A)	1 (A)			
49		F	5	1 (B)			1 (B)		3 (B)
50	65	M	2					1 (B)	1 (B)
51	74	F	6	1 (B)	2 (B)	1 (B)		1 (B)	1 (B)
52	63	F	2		2 (A)				
53	62	M	1				1 (B)		
54	62	M	3		1 (A)			2 (B)	
55	73	M	3	1 (B)		1 (B)	1 (B)		
56	70	F	1					1 (B)	
57	79	F	1		1 (A)				
58	49	F	1						1 (B)
59	16	F	1					1 (B)	
60	14	F	1				1 (A)		
61	62	M	6				1 (A)	2 (B)	3 (B)
62	92	F	9	1 (B)	4 (B)		1 (A)	1 (B)	2 (B)
63	21	F	1					1 (B)	
64	71	M	3	1 (B)	2 (B)				
65	56	M	1						1 (B)
66	59	M	1						1 (B)
67	14	F	2	1 (B)			1 (B)		
68	39	F	2				1 (B)	1 (B)	

¹Localização das lesões de acordo com a divisão do olho em três zonas de acordo com o proposto por Holland; Buhles e colaboradores em 1989. A ficha de exame oftalmológico de cada paciente foi utilizada para determinação da localização das lesões.

ADENDO C – Pedigrees simplificados multicaso das famílias provenientes da vila de Virgem das Graças do Vale do Jequitinhonha.



Adendo C: Pedigrees simplificados multicaso das famílias da vila de Virgem das Graças no Vale do Jequitinhonha. Cada pedigree é identificado pelas iniciais da vila (VDG) antecedida por uma letra do alfabeto (i.e J_VDG_1). Cada indivíduo, por sua vez, é identificado pelo seu nome de identificação específico, caracterizado pela inicial da vila (VDG) e um número arbitrário a ele atribuído. Indivíduos em azul escuro estão os indivíduos soronegativos (SN), em verde, indivíduos soropositivos (SP) com ou sem lesão e em amarelo, indivíduos com sorologia não determinada. O tipo de lesão encontrada em cada paciente (A ou B) está inserido à direita, logo acima do símbolo do indivíduo. Pacientes soropositivos sem lesão estão identificados pelas letras "SL".

ADENDO D – Artigos publicados como resultado dessa tese de doutorado

Association of a NOD2 Gene Polymorphism and T-Helper 17 Cells With Presumed Ocular Toxoplasmosis

Miriam S. Dutra,^{1,2} Samantha R. Béla,^{1,2} Alba L. Peixoto-Rangel,³ Michaela Fakiola,⁶ Ariane G. Cruz,² Andrea Gazzinelli,⁴ Humberto F. Quites,⁴ Lilian M. G. Bahia-Oliveira,³ Ricardo G. Peixe,³ Wesley R. Campos,⁵ Anna C. Higino-Rocha,⁵ Nancy E. Miller,^{6,a} Jenefer M. Blackwell,^{6,7} Lis R. Antonelli,¹ and Ricardo T. Gazzinelli^{1,2,8}

¹Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR—Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil; ²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Cambridge Institute for Medical Research and Department of Medicine, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, United Kingdom; ⁵Escola de Enfermagem ⁶Uveitis Division, Centro Brasileiro de Ciências Visuais, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁷Centre for Child Health Research, Telethon Institute for Child Health Research, University of Western Australia, Perth; and ⁸University of Massachusetts Medical School, Worcester

Retinochoroiditis manifests in patients infected with *Toxoplasma gondii*. Here, we assessed 30 sibships and 89 parent/case trios of presumed ocular toxoplasmosis (POT) to evaluate associations with polymorphisms in the *NOD2* gene. Three haplotype-tagging single-nucleotide polymorphisms (tag-SNPs) within the *NOD2* gene were genotyped. The family-based association test showed that the tag-SNP rs3135499 is associated with retinochoroiditis ($P = .039$). We then characterized the cellular immune response of 59 cases of POT and 4 cases of active ocular toxoplasmosis (AOT). We found no differences in levels of interferon γ (IFN- γ) and interleukin 2 produced by T-helper 1 cells when comparing patients with AOT or POT to asymptomatic individuals. Unexpectedly, we found an increased interleukin 17A (IL-17A) production in patients with POT or OAT. In patients with POT or AOT, the main cellular source of IL-17A was CD4⁺CD45RO⁺T-bet⁻IFN- γ ⁻ T-helper 17 cells. Altogether, our results suggest that *NOD2* influences the production of IL-17A by CD4⁺ T lymphocytes and might contribute to the development of ocular toxoplasmosis.

Keywords. NOD2; IL-17; Th17; T lymphocytes; ocular toxoplasmosis; *Toxoplasma gondii*.

Lifelong infection with the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* affects one-third of the human population globally [1]. Although toxoplasmosis is asymptomatic in the majority of cases, *T. gondii* infection is the most common cause of posterior uveitis worldwide [2, 3]. Its importance is even greater

in Brazil, where the prevalence and severity of ocular disease is higher than that in the rest of the world [4–6]. The immune responses induced by *T. gondii* infection are initiated by the activation of innate immune cells and the induction of proinflammatory cytokines through activation of Toll-like receptors and development of T-helper 1 cells, exclude lymphocytes [7, 8]. A profile that includes Th1 cytokines, such as interferon- γ (IFN- γ) and interleukin 5, interleukin 6 (IL-6), and interleukin 17A (IL-17A) has also been associated with acute ocular toxoplasmosis in humans [9, 10]. However, the innate immune receptors that interact directly with *T. gondii* molecules triggering local inflammation in the eye remain to be identified.

The nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) is an intracellular pattern-recognition receptor grouped in the NOD-like receptor family of proteins [11]. NOD2 is known to recognize bacterial

Received 3 March 2012; accepted 17 July 2012; electronically published 24 October 2012.

^aDeceased.

Presented in part: XXXV Congress of the Brazilian Society of Immunology, Porto Alegre, Brazil, 3–6 November 2010 [abstract P1005]; 11th International Congress on Toxoplasmosis, Ottawa, Canada, 25–29 June 2011 [abstract B17].

Correspondence: Dr. Ricardo Gazzinelli, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima 1517, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil (ritoga@cpqrr.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases 2013;207:152–63

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jis640

peptidoglycan and to be expressed in different cell types, including neutrophils, monocytes, macrophages, and dendritic cells [12, 13]. Activation of NOD2 triggers the release of NF- κ B, which induces the production of proinflammatory mediators, upregulation of major histocompatibility complex class II, and activation of antigen-specific CD4⁺ T-cell responses, including memory T cells [12, 14]. In mice, *T. gondii* infection was shown to activate NOD2, providing a T cell–intrinsic signal necessary for generating Th1-mediated immunity [15].

In the present study, we evaluated the involvement of the NOD2 receptor in susceptibility to ocular toxoplasmosis. For this purpose, we genotyped 3 haplotype-tagging single-nucleotide polymorphisms (tag-SNPs) within the *NOD2* gene and tested for their association with the ocular disease [16]. Since NOD2 appears to be involved in eliciting both Th1 and T-helper 17 cell immune responses, we also characterized the response of *T. gondii*–specific CD4⁺ T cells in terms of cytokine production. We report that the tag-SNP rs3135499 is associated with presumed ocular toxoplasmosis (POT). Interestingly, the levels of IL-17A produced by parasite antigen–specific CD4⁺CD45RO⁺T-bet[–]IFN- γ Th17 lymphocytes were higher in patients with POT or active ocular toxoplasmosis (AOT). These individuals also present a high frequency of CD4⁺CD45RO⁺T-bet[–]IFN- γ cells that produce IL-17A. Thus, altogether, our results suggest the involvement of NOD2 and Th17 lymphocytes in the development of ocular toxoplasmosis.

Table 1. Baseline Characteristics of the Minas Gerais Cohort and Rio de Janeiro Cohort Used in Family Based Allelic Association Test

Cohort	Value
Minas Gerais	
No. of families	13
No. of nuclear families	61
No. of families with 1 affected generation	51
No. of families with 2 affected generations	10
No. of families with 1 affected offspring	54
No. of families with 2 affected offspring	6
Total no. of affected individuals	66
Total no. of individuals	141
Rio de Janeiro	
No. of nuclear families	30
No. of families with one affected offspring	28
No. of families with two affected offspring	2
No. of sibships	30
No. of sibships with 1 affected offspring	25
No. of sibships with 2 affected offspring	4
No. of sibships with 3 affected offspring	1
Total no. of affected individuals	68
Total no. of individuals	160

MATERIALS AND METHODS

Cohorts and Patients

Genetic analysis was performed in a combined cohort (Table 1) of parent/offspring and sibship trios from Vale do Jequitinhonha, in Minas Gerais state (the MG cohort), and from Campos dos Goytacazes, in Rio de Janeiro state (the RJ cohort). The seroprevalence of toxoplasmosis in these cohorts is 43% and 53% [17], respectively. The MG cohort comprises 66 cases of POT distributed in 61 families. The RJ cohort comprise 68 cases of POT distributed in 30 nuclear families and 30 sibships with at least one affected child and is described elsewhere [18]. The 2 cohorts were combined to increase the power to detect allelic associations with the genotyped SNPs. DNA was extracted from 301 individuals in total. Immunophenotyping assays were performed for individuals from the MG cohort only. Individuals were separated into four groups, including: seropositive asymptomatic or displaying POT or AOT and seronegative controls. All patients provided written informed consent prior to inclusion, and all procedures were performed in person, in accordance with institutional and National Institutes of Health guidelines.

Clinical Phenotypes for POT and AOT

Fundus examination was performed in seropositive individuals from the MG and RJ cohorts, under the same criteria by a group of ophthalmologists, coordinated by Dr Wesley Campos. The posterior retinal/retinochoroidal-scarred, healed lesions were classified as A or B (Figure 1) according to their morphological aspects, as described elsewhere [19]. Briefly, class A lesions present well-marked boundaries, usually surrounded by a pigmented halo and extensive destruction of the retina and choroid. Class B lesions are characterized by a surrounding hypopigmented halo and a smaller degree of tissue destruction, both of which fulfill the morphological criteria of presumed *T. gondii* infection. Individuals presenting with POT were examined at the time of survey and 6–10 months after the first examination. No difference was observed in any aspect of the lesions during the period. The additional AOT cases displayed healed, scarred lesions and active retinochoroiditis located adjacently to the previous lesion, as well as high avidity anti-*T. gondii* immunoglobulin G and no immunoglobulin M (Supplementary Table 1), all of which are consistent with reactivation of ocular toxoplasmosis. These patients also underwent visual acuity evaluation, tonometry, biomicroscopy, and ophthalmoscopy [20].

Serodiagnosis for Toxoplasmosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

High binding microtiter plates Immulon-2 (Dynatech Laboratories, CT) were coated with 1 μ g/mL of F3, an extract

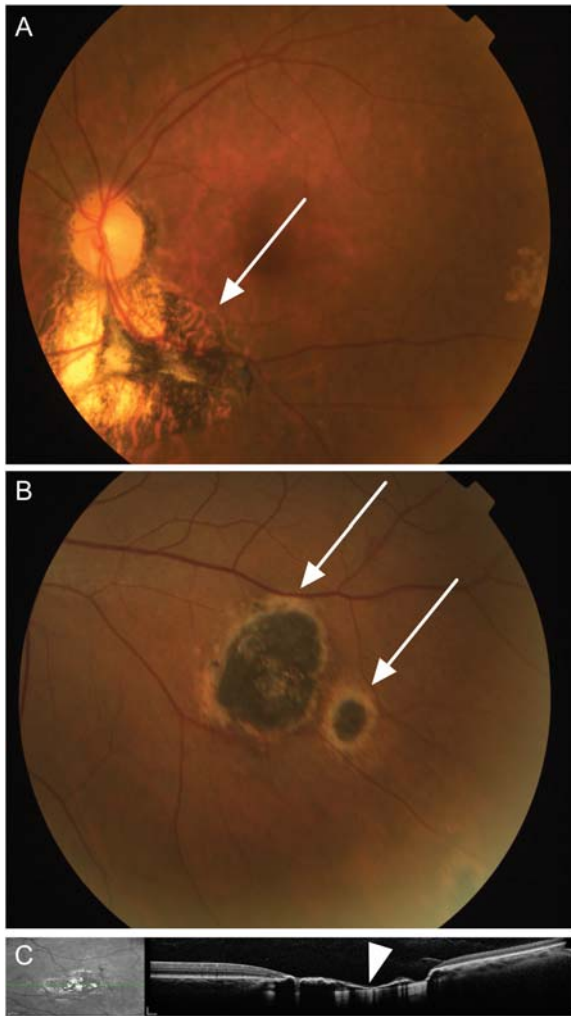


Figure 1. Ocular examination in the Minas Gerais cohort. *A*, A representative retinography of an individual with a type A scarred lesion (arrow), highly suggestive of toxoplasmosis, characterized by sharply demarcated pigmented borders and a hypopigmented central portion with extensive destruction of the retina and choroid. *B*, A representative retinography of type B scarred ocular lesions (arrows), suggestive of toxoplasmosis, characterized by a hyperpigmented central area surrounded by a hypopigmented halo with smaller degree of tissue destruction. *C*, Spectral domain optical coherence tomography of an ocular lesion (left), showing disorganization of the retinal layers and thinning of the retina (arrow head, right).

enriched for the surface components of *T. gondii* tachyzoites and developed as previously described [21].

Genotyping and Family-Based Allelic Association Tests

The tag-SNPs in the *NOD2* gene were selected from the Hapmap project, release 27 (<http://www.hapmap.org>), using 5 kb of flanking sequence on each side of the gene. To select the tag-SNPs, the tagger tool [22] within Haploview software v4.2 [23] was used, setting a minor allele frequency cutoff of 0.2 in

CEU and YRI populations and an r^2 threshold of 0.8. Genotyping was performed using the Taqman (Applied Biosystems, CA) technology for *NOD2* SNPs at rs2076753 (intronic), rs2111235 (intronic), and rs3135499 (3' untranslated region). The tag-SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in genetically unrelated founders in the Brazilian families ($P > .05$). The power to detect association in the trios/sibships is 70.8%, at an odds ratio of 1.5 and a nominal P value of .05. Family-based allelic association tests were performed within the family based association test [16], which is based on the transmission disequilibrium test but allows for analyses under different genetic models and with incomplete parental data [16, 24]. Analyses were performed using a genotype model and under the null hypothesis of "no linkage and no association." Nominal P values are presented.

T-Cell Immunophenotyping and Intracellular Cytokine Measurement

In the immunological study, 105 individuals from the MG cohort were used and included 21 anti-*T. gondii*-seronegative individuals, 59 cases of POT, and 25 cases of asymptomatic toxoplasmosis (Supplementary Table 2). Additional 4 cases of AOT were also analyzed.

PBMCs were prepared from heparinized venous blood from adult volunteers by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Sigma Aldrich). All cultures were performed using Roswell Park Memorial Institute 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, NY) and penicillin (200 U/mL) in the presence or absence of stimulus at 37°C in 5% CO₂. Cells were stimulated for 20 hours with anti-CD3 (1.0 µg/mL) and anti-CD28 (0.5 µg/mL) (BD Biosciences, CA) or with soluble tachyzoite antigens (STAg) prepared from the RH strain of *T. gondii* (10 µg/mL). For that propose, tachyzoites were obtained by peritoneal washing of infected SWISS mice, and STAg was produced as previously described [21, 25]. In the last 8 hours of culture, brefeldin A (GolgiPlug Protein Transport Inhibition, BD Biosciences) was added to each well. After incubation, cells were washed and stained for surface molecules for 15 minutes at room temperature. The cells were washed, permeabilized (Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences), and fixed in 200 µL of phosphate-buffered saline–2% paraformaldehyde. At least 90 000 gated events were acquired for analysis using FACSCalibur with Cellquest or LSR II with Diva (BD Biosciences). The antibodies used for staining were immunoglobulin controls, anti-CD3(UCTH1)-FITC, anti-CD4(OKT4)-FITC or –APC, anti-CD4(RPA-T4)-APC-eFluor780 or PerCPCy5.5, anti-CD45RO(UCHL1)-PerCP-eFluor710, anti-TNF-α(MAb11)-PE, anti-IL-17A(eBio64DEC17)-PE, anti-IL-17A(eBio64CAP17)-AlexaFluor647, anti-IFN-γ(4SB3)-PECy7, anti-TNF-α(MAb11)-AlexaFluor700, and anti-T-bet(eBio4B10)-PE, all from eBioscience; and anti-IL-2 (MQ117H12)-APC (BD Biosciences). FlowJo (v8.8.6) and

GraphPad Prism (v5.0b) were used for data analysis and graphic presentation.

Proliferation Assay

For the proliferation assay, cells were stained with 1.25 μM CFSE at 1×10^7 cells/mL for 8 minutes. Cells were then equally distributed into 3 wells containing STAg, anti-CD3/anti-CD28, or medium in the absence of stimulus. The cells were cultured at 37°C in 5% CO₂. After 5 days of culture, the cells were stained with the following antibodies: anti-HLADR (LN3)-PE, anti-CD8(OKT8)-PerCP, and anti-CD4(OKT4)-APC, as described above.

Determination of Cytokine Levels

To determine the IL-17A, interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), IFN- γ , interleukin 10 (IL-10), and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels, the BD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit was used according to manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 PBMCs/well were cultured with STAg, with anti-CD3/anti-CD28, or with no stimulus for 12 hours at 37°C in 5% CO₂. The supernatants were collected and kept at -20°C. The concentration of cytokines was calculated using the BD FCAP Array software (v1.0.1).

Statistical Analyses

Statistical analyses for the in vitro assays were performed using the unpaired Student *t* test with Welch's correction, for parametric data, or the Mann-Whitney *U* test, for nonparametric data.

RESULTS

SNP rs3135499 in the *NOD2* Gene Is Associated With Ocular Toxoplasmosis

To test the hypothesis that polymorphisms at *NOD2* might influence susceptibility to ocular toxoplasmosis in the Brazilian cohorts (Table 1), we genotyped 3 tag-SNPs distributed throughout the human *NOD2* gene (Figure 2) in 91 parent/offspring trios and 30 sibships with cases of POT. The selected SNPs had an *r*² threshold of 0.8, a minor allele frequency of >0.2, and were in Hardy-Weinberg equilibrium in the unrelated parents. By use of the family based association test [16], we found evidence for association between ocular toxoplasmosis and the SNP rs3135499 (2-sided *P* = .039; Table 2). Under a genotype model of inheritance, the homozygous genotype CC is associated with protection against the development of ocular toxoplasmosis (*Z* statistic = -2.06). An unknown causal SNP in strong linkage disequilibrium with this marker could account for the observed association with the ocular disease.

Activation and Cytokine Production by CD4⁺ T Lymphocytes From Patients With Scarred Toxoplasmic Retinochoroiditis

Earlier studies suggest that T cells from patients with ocular toxoplasmosis display an altered responsiveness to *T. gondii* antigens [26]. Thus, we investigated this question by using PBMCs from seropositive individuals from the MG cohort who did or did not have POT. On STAg stimulation, the HLA-DR⁺CD4⁺ T lymphocytes from seropositive individuals with POT (30.6% \pm 3.0%) or no eye lesions (NL; 35.9 \pm 4.9) presented similar proliferative response, as assessed by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution. To assess the production of cytokines in the 3 different groups of subjects, total PBMCs were cultured in the presence of STAg for 12 hours. PBMCs from seropositive individuals produced significantly higher amounts of IFN- γ , IL-2, and IL-10, compared with seronegative individuals (Figure 3A). The levels of these cytokines were similar among the seropositive individuals (the POT and NL groups), regardless of retinochoroiditis.

We next evaluated the frequency of STAg-specific CD4⁺ T cells simultaneously producing IFN- γ , IL-2, or TNF- α in individuals with POT. Seropositive individuals had significantly higher frequencies of IFN- γ /TNF- α /IL-2-producing cells (named multifunctional), IL-2/IFN- γ -producing cells, and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells, compared with seronegative individuals. However, these frequencies did not differ between NL and POT seropositive groups (Figure 3B). The proportions of single, double, and triple producers were similar between the NL and POT individuals (Figure 3C). These results indicate that, considering the cytokine production and frequency of multifunctional T cells, the Th1 response specific for *T. gondii* antigens are similar between NL and POT patients.

Unimpaired Function of Th1 Lymphocytes From *T. gondii*-Infected Individuals Bearing the Susceptible *NOD2* rs3135499 Genotype

It has been shown that during *T. gondii* infection, *NOD2* plays a role in the differentiation of Th1 lymphocytes by triggering the production of IL-2 by naive T cells and leading to their commitment toward the Th1 phenotype. Despite the normal production of interleukin 12p40 in *NOD2*^{-/-} mice, the frequency of IFN- γ -producing Th1 cells is lower than in wild-type mice [15]. Since we found evidence for association between the *NOD2* rs3135499 SNP and POT, we then analyzed the cytokine profile produced by CD4⁺ T cells from individuals with and individuals without POT. PBMCs derived from individuals bearing the possible genotypes for the rs3135499 locus produced similar levels of the Th1 cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α , and IL-10) (Figure 3D). Altogether, our results indicate that the rs3135499 SNP in the *NOD2* gene is not associated with an altered function of Th1 lymphocytes.

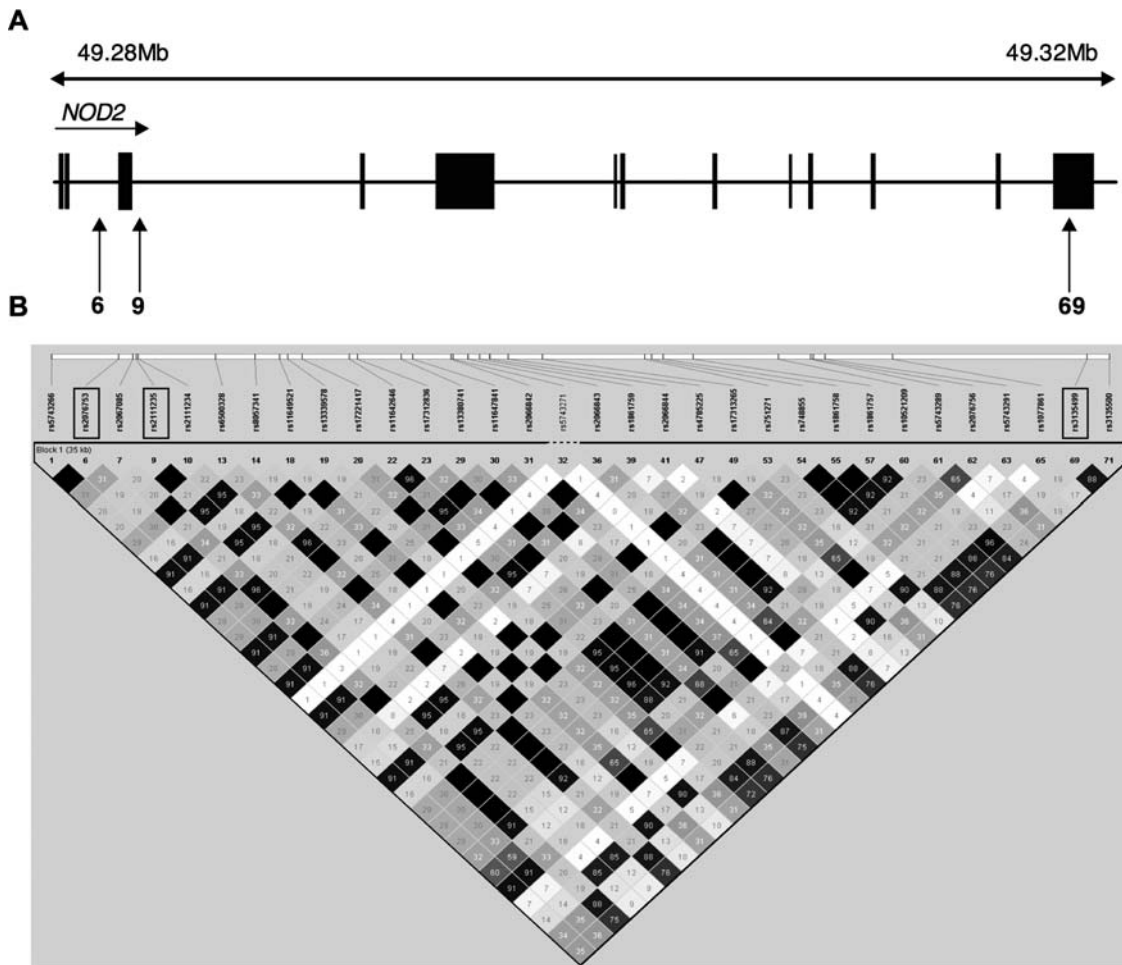


Figure 2. Haploview analysis for r^2 pairwise measures of linkage disequilibrium between *NOD2* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in unrelated family founders in Brazil. *A*, The *NOD2* genomic structure, indicating the position of the 3 genotyped tag-SNPs (vertical arrows). In the diagram, 6 indicates the SNP rs2076753, 9 indicates the SNP rs211235, and 69 indicates the SNP rs3135499. Exons are represented as black rectangles. *B*, Linkage disequilibrium plots showing pairwise r^2 linkage disequilibrium measures across the 3 *NOD2* SNPs genotyped in the study. Linkage disequilibrium estimates were determined in Haploview software v4.2, using unrelated individuals from the Brazilian families. r^2 values are represented in white for $r^2 = 0$, with intermediate values for $0 < r^2 < 1$ indicated by shades of grey. The numbers within the squares represent the r^2 scores for pairwise linkage disequilibrium.

Polymorphism rs3135499 in the *NOD2* Gene Is Associated With Enhanced Production of IL-17A by *T. gondii*-specific CD4⁺ T Lymphocytes

Apart from the contribution of *NOD2* to the development of Th1 lymphocytes, it has also been shown that *NOD2* plays a role in inducing the production of IL-17A by human memory T cells [14]. Thus, the levels of IL-17A were analyzed in supernatant of PBMCs cultured for 5 days in the presence of STAg. PBMCs from individuals with POT produced significantly higher amounts of IL-17A, compared with individuals in the NL group (Figure 4A). We then analyzed the production of IL-17A within the different genotypes for the 3 tag-SNPs in the *NOD2* gene. The seropositive individuals were classified into 3 groups on the basis of 3

possible genotypes for each SNP (Figure 4B). There was no significant difference in the production of IL-17A among the genotypes for the 2 tag-SNPs (rs2076753 and rs211235) not associated with the ocular disease (Table 2 and Figure 4C). On the contrary, we found higher production of IL-17A in individuals bearing the heterozygous genotype for the rs3135499 tag-SNP, comparison to both homozygotes ($P = .029$ compared to AA; $P = .033$ compared to CC). Among the individuals bearing the CA genotype, individuals with POT produced higher levels of IL-17A (POT group, $87.1 \text{ pg/ml} \pm 28.7 \text{ pg/ml}$; NL group, $24.8 \text{ pg/ml} \pm 7.8 \text{ pg/ml}$; $P = .045$). These results suggest a possible role for polymorphisms at the *NOD2* gene and IL-17A production with the development of ocular disease in human toxoplasmosis.

Table 2. Results of Family Based Allelic Association Tests (FBAT) Between NOD2 Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Presumed Ocular Toxoplasmosis in Samples from Brazilian Patients

SNP Characteristic				FBAT Parameter ^b							
Name	Location	Physical Position ^a	MAF	Genotype	Genotype Frequency	No. of Families ^c	S	E(S)	Var(S)	Z ^d	P ^e
NOD2rs1315499	3' UTR	50766127	0.45	CC	0.211	19	3.00	7.17	4.09	-2.06	.039
				CA	0.487	53	34.00	28.38	13.09	1.55	.121
				AA	0.302	44	18.00	19.45	10.25	-0.45	.651
NOD2rs2111235	Intron 1	50733969	0.32	GG	0.488	40	17.00	17.73	9.53	-0.24	.814
				GA	0.381	46	27.00	23.55	11.67	1.01	.312
				AA	0.131	19	5.00	7.73	4.42	-1.30	.194
NOD2rs2076753	Intron 2	50733374	0.24	TT	0.044	4	2.00	1.50	0.875	0.535	.593
				TG	0.383	26	11.00	12.20	6.174	-0.483	.629
				GG	0.573	26	14.00	13.30	6.049	0.285	.776

Abbreviations: E(S), expected transmission of the allele; MAF, minor allele frequency; S, observed transmission of the allele; UTR, untranslated region; Var(S), variance.

^a Physical positions of markers, in base pairs, are given according to Build 37.3 of the human genome; alleles in the positive strand are shown for all markers. All 3 SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in unaffected founders of the families.

^b Single point FBAT analysis under a genotype model of inheritance for associations between *NOD2* polymorphisms and ocular toxoplasmosis in the Brazilian cohort (Rio de Janeiro trios and Minas Gerais cohort taken together).

^c No. of families informative for FBAT.

^d A positive Z score indicates association with disease (overtransmission of the genotype under consideration in cases), and a negative Z score indicates the nonassociated or protective genotype.

^e Bold indicates a significant association at a nominal P value of $\leq .05$.

Enhanced Frequency of Th17 Lymphocytes in Patients Susceptible to Ocular Toxoplasmosis

We then defined the cellular source of IL-17A in PBMCs from individuals with POT. It has been shown that Th17 can produce cytokines other than IL-17A, including TNF- α and limited amounts of IFN- γ [27]. They can be distinguished from Th1 cells by the expression of T-bet, a Th1 cell-specific transcription factor [28]. After 20 hours of incubation with or without STAg, PBMCs were stained for different cell surface markers (CD4, CD27, and CD45RO), the transcription factor (T-bet), and cytokines (IFN- γ and IL-17A). Individuals from seropositive groups presented higher frequency of CD4⁺ T cells producing only IFN- γ , only IL-17A, or both IFN- γ /IL-17A, compared with seronegative individuals (Figure 4D and 4E). The main source of IL-17A in individuals with POT was CD4⁺/T-bet⁻/IFN- γ ⁻ (Th17) cells (Figure 4F). Interestingly, the proportion of the Th17 lymphocytes was significantly higher in individuals with POT, compared with asymptomatic seropositive individuals (Figure 4E). These results indicate that Th17 lymphocytes and IL-17A may be involved in the development of the ocular lesions during acute, inflammatory phases of *T. gondii* infection.

IL-17A Production and Th17 Lymphocytes Are Also Augmented in Individuals With Active Toxoplasmic Retinochoroiditis

To address the question that IL-17A could be involved in the inflammatory process leading to active retinochoroiditis, we also evaluated the production of IL-17A in 4 individuals

displaying AOT (Supplementary Table 1). STAg-stimulated PBMCs from subjects with AOT produced significantly higher levels of IL-17A, compared with those from asymptomatic individuals (Figure 5A). In addition, subjects with AOT presented a higher frequency of CD4⁺CD45RO⁺ T cells producing IL-17A but not TNF- α and IFN- γ , compared with the asymptomatic seropositive group ($P=.035$, .064, and .555 for CD4⁺CD45RO⁺ T cells producing IL-17A, TNF- α , and IFN- γ , respectively) (Figure 5B). Looking specifically at the IL-17A-producing CD4⁺CD45RO⁺T-bet⁻ T cells, defined as Th17 lymphocytes (Figure 5C), the majority were only IL-17A producers. Although these cells were the most frequent, CD4⁺CD45RO⁺T-bet⁺ T cells that also produced TNF- α or IFN- γ were found in patients with active lesions. These results indicate that together with Th1 cells, Th17 cells may contribute to the inflammatory process leading to toxoplasmic retinochoroiditis.

DISCUSSION

T. gondii is the main infectious cause of human posterior retinochoroiditis, the most frequent clinical manifestation of congenital and acquired toxoplasmosis [2, 29]. The disease is typically presented as unilateral focus of retinochoroiditis, in the presence of adjacent chorioretinal scars, usually associated with intraocular inflammation followed by levels of necrotizing retinopathy [3]. The severity and prevalence of the disease

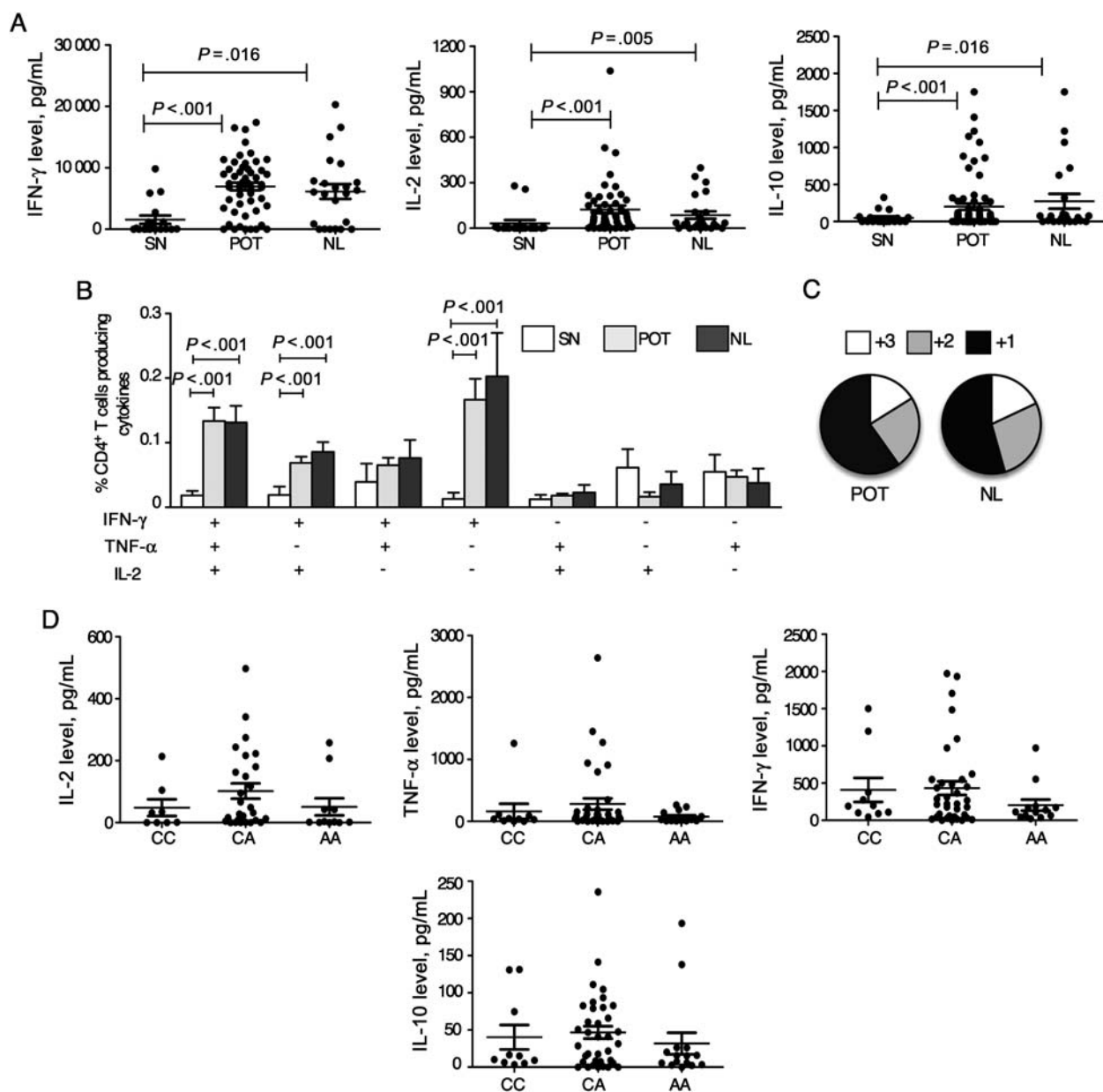


Figure 3. Unimpaired function of T-helper cell 1 lymphocytes from *Toxoplasma gondii*-infected individuals bearing the susceptible *NOD2* rs3135499 genotype. **A**, Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were harvested from seronegative (SN) individuals and patients with chronic toxoplasmosis with ocular scars (POT) or no eye lesions (NL). PBMCs were then cultured for 8 hours in the presence or absence of parasite antigen (STAg), and cytokine levels were measured in the culture supernatants by a cytometric bead array assay. **B**, PBMCs were cultured for 20 hours in the presence or absence of STAg and stained for CD4 and the cytokines interleukin 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor α (TNF- α). Bars represent mean frequencies (\pm standard error of the mean) of CD4⁺ T cells producing any of the 7 possible combinations of the cytokines IL-2, IFN- γ , and TNF- α in the SN group (white bars), POT group (grey bars), and NL group (black bars). **C**, Fraction of the total response comprising cells expressing all 3 cytokines (3), any 2 cytokines (2), or any 1 cytokine (1). **D**, Production of IFN- γ , IL-2, TNF- α , and interleukin 10 (IL-10) is plotted against the 3 possible genotypes for each of the rs3135499 SNPs for which we found evidence for association with ocular toxoplasmosis.

vary greatly and is believed to be under the influence of the status of host immune system [9], the genotype of infective parasite strains [30], and the host genetic background [31]. In this sense, polymorphisms in genes of the innate immune system, such as *TLR9* (which encodes a protein that recognizes

unmethylated CpG motives [18]), *NALP-1* (which encodes a member of the NOD-like receptor family involved in inflammasome formation [32]), and *P2X7* (which encodes a purinergic receptor for adenosine triphosphate that is also important for inflammasome formation [33]), have been associated with

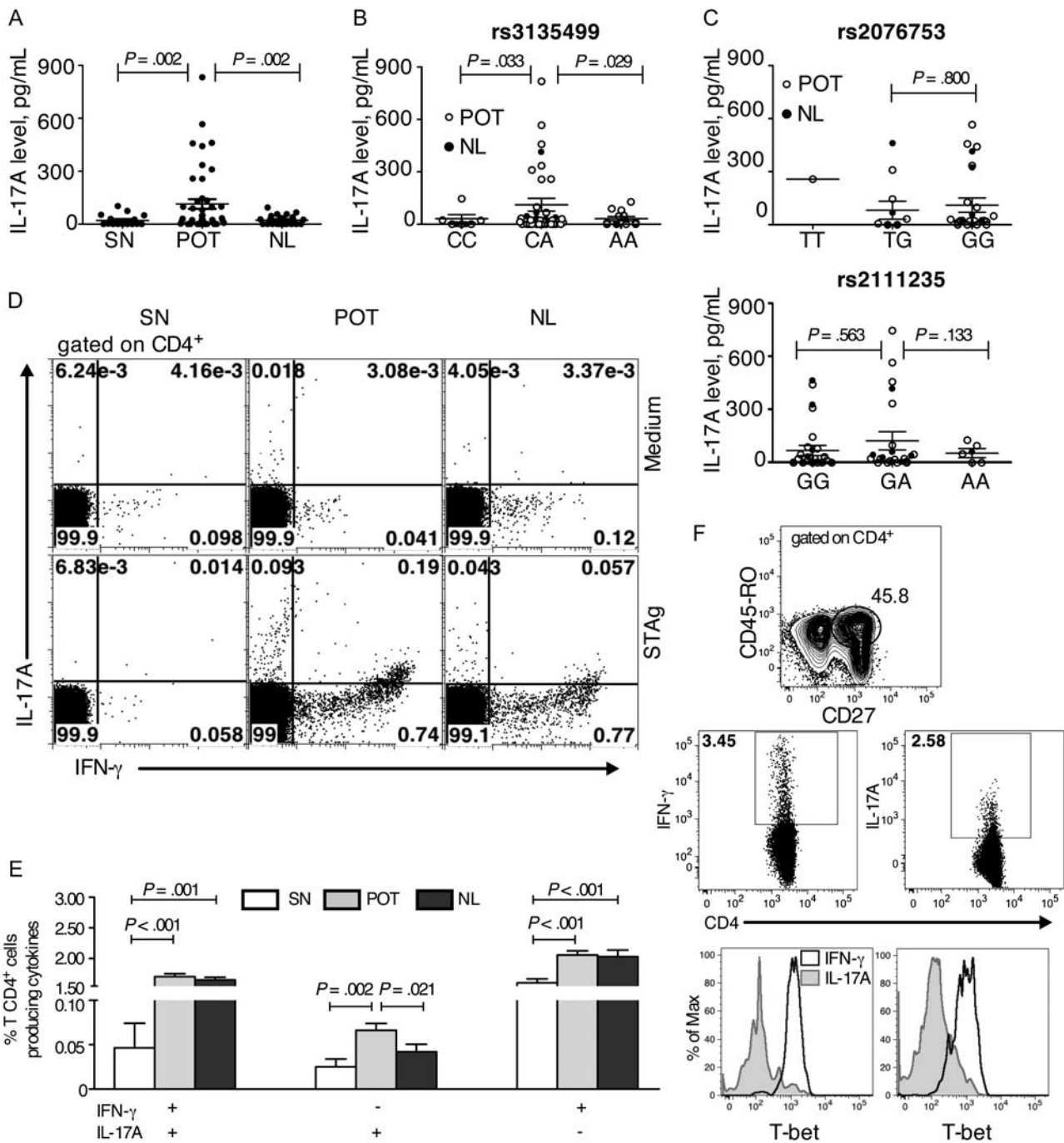


Figure 4. Individuals with the heterozygous genotype for the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs3135499 in the *NOD2* gene produce higher levels of interleukin 17A (IL-17A) and have a high frequency of *Toxoplasma gondii*-specific T-helper cell 17 (Th17) lymphocytes. *A*, Production of IL-17A by antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from groups of individuals who were seronegative (SN), had presumed ocular toxoplasmosis (POT), or were asymptomatic (NL). *B*, Production of IL-17A plotted against the 3 possible genotypes for SNP rs3135499 that we found evidence of an association with ocular toxoplasmosis ($P = .039$). *C*, Production of IL-17A plotted against the 3 possible genotypes for the SNPs rs2076753 (top panel) and rs2111235 (bottom panel), both of which were not associated with the ocular disease. Seropositive individuals in the POT and NL groups are presented as white and black dots, respectively. PBMCs from the individuals were stimulated with or without parasite antigen (STAg) for 20 hours and stained either for CD4, IL-17A, and IFN- γ (*D* and *E*); or for CD3, CD4, CD45RO, CD27, T-bet, IL-17A, and interferon γ (IFN- γ ; *F*). *D*, Distribution of CD4⁺ T cells producing IL-17A, IFN- γ , or both after culture in the absence (top row) or presence (bottom row) of STAg. Each density plot shows concatenated files of 2 SN (left panels), 4 POT (middle panels), and 3 NL (right panels) patients. *E*, Mean frequencies (\pm standard error of the mean) of CD4⁺T cells that produce the possible combinations of IFN- γ and IL-17A. *F*, Panel on the top shows the CD27⁺CD45RO⁺ gate on the CD4⁺ T lymphocytes and middle panels show IFN- γ -producing CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ and IL-17A-producing CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺IL-17A⁺ T cells in PBMCs from a single subject displaying POT. Bottom panels show representative histograms of T-bet expression in IFN- γ - and IL-17A-producing CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ T cells from 2 of 6 POT patients.

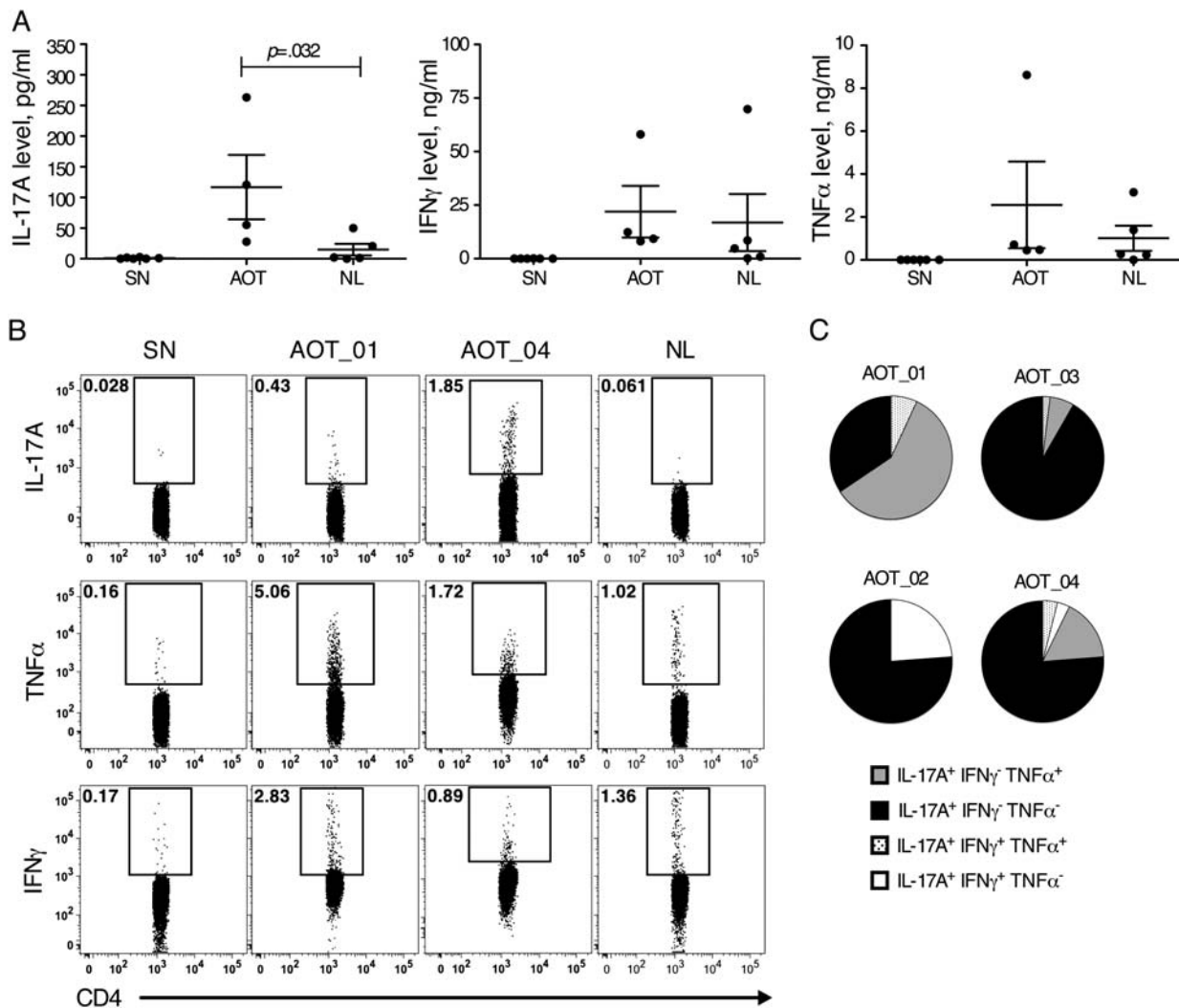


Figure 5. Interleukin 17A (IL-17A)-producing CD4⁺ T cells are also present in a higher frequency in individuals with active ocular toxoplasmosis. *A*, IL-17A, interferon γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor α (TNF- α) production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from active ocular toxoplasmosis (AOT) lesions cultured in the presence or absence of parasite antigen (STAg). *B*, Frequencies of antigen-stimulated CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes expressing IL-17A, TNF- α , or IFN- γ from 1 patient in the seronegative group (SN; top panels), 1 in the asymptomatic group (NL; bottom panels), or 2 in the AOT group (AOT_01 and AOT_04; middle panels). *C*, Distribution of subgroups of IL-17A-producing CD4⁺ T lymphocytes expressing the 4 different sets of cytokines, combining TNF- α , IFN- γ , and IL-17A in 4 patients with AOT. The proportions of CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes that are IL-17A⁺IFN- γ ⁻TNF- α ⁺, IL-17A⁺IFN- γ ⁻TNF- α ⁻, IL-17A⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁻, and IL-17A⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ are represented in dotted pattern, black, white and grey, respectively.

susceptibility to manifestations of congenital infection and ocular toxoplasmosis. Here, we found evidence for association of 1 SNP in the *NOD2* gene with toxoplasmic retinochoroiditis. The observed association could be due to strong linkage disequilibrium between rs3135499 and the true causal variant in the *NOD2* gene, which encodes an innate immune receptor, that influences cytokine production by T lymphocytes [13, 15, 34].

A recent report demonstrates that *NOD2* is an important mediator of host resistance to infection with *T. gondii* [15]. *NOD2*-deficient mice resist during the acute stage of infection

but succumb at the beginning of the chronic phase. Shaw and collaborators demonstrated that *NOD2*^{-/-} mice show normal IL-12 production, but impaired Th1 responses during *T. gondii* infection, with a lower frequency of CD4⁺ T cells producing IFN- γ and IL-2 [15]. However, experiments performed by our group show that decreased cytokine production and enhanced susceptibility is not observed in *NOD2*^{-/-} mice infected with the ME49 strain of *T. gondii* [35]. Consistently with our findings in the rodent model of toxoplasmosis, the different alleles of the 3 SNPs of *NOD2* gene were not

associated with changes in the levels of IL-2, IFN- γ , TNF- α , and IL-10 produced by antigen-stimulated PBMCs or CD4⁺ T lymphocytes from patients chronically infected with *T. gondii*, regardless of the presence of ocular disease. Nevertheless, we found higher levels of IL-17A produced by PBMCs from patients with POT or AOT. Furthermore, we observed that the frequency of parasite antigen-specific Th17 (CD4⁺T-bet⁻IL-17A⁺IFN- γ ⁻) lymphocytes was increased in PBMCs from patients with retinochoroiditis. We hypothesize that Th17 and IL-17A contribute to the inflammatory process and development of ocular toxoplasmosis.

The role of Th17 and IL-17A in rodent and human toxoplasmosis was addressed by a few studies. After oral infection with *T. gondii*, mice lacking the IL-17A receptor develop a diminished inflammatory process in the ileum, compared with wild-type mice, after oral infection with *T. gondii* [36]. Additionally, in mice infected with *T. gondii*, the lack of interleukin 27 signaling, a cytokine that inhibits Th17 differentiation, results in severe neuropathology associated with production of high levels of IL-17A, IL-6, and TNF- α [37]. This indicates a role for IL-17A in the immunopathology and inflammatory processes triggered by *T. gondii* infection. In humans, IL-17A has been detected in aqueous humour specimens from individuals with AOT, although the source of IL-17A has not yet been identified [10].

Importantly, NOD2 has been implicated in IL-17A production by memory T cells. In human dendritic cells primed with bacteria, stimulation with muramyl dipeptide enhanced the production of IL-23 and IL-1 β triggered by activation of Toll-like receptor 2 (TLR2). In turn, IL-23 promoted IL-17A release by memory T cells [14]. It is noteworthy that glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *T. gondii* tachyzoites were also shown to activate TLR2 [38]. *T. gondii* molecules that are recognized by NOD2 receptor are yet to be identified. Additionally, the ocular surface has an environment enriched with cytokines (ie, TGF- β , IL-6, IL-23, and IL-1 β) that are important for the Th17 cell differentiation [39, 40]. In fact, Th17 lymphocytes or IL-17A are also known to be involved in ocular diseases, including uveitis and scleritis of various etiologies [10, 41]. Furthermore, mutations in the NOD2 gene are also causative of uveitis in individuals with Blau syndrome, an autosomal dominant condition that presents as granulomatous inflammation affecting the eyes, skin, and joints [42]. In experimental autoimmune uveitis, the intensity of IL-17A production by Th17 cells correlates with susceptibility to disease [43].

It has been shown both in vitro and in the mouse model that the infective parasite strain is an important factor influencing the T-cell development, cytokine responses, and mouse resistance to experimental infection with *T. gondii* [44]. Thus, considering the high frequency of virulent parasites strains and acquired ocular toxoplasmosis found in Brazil [6, 45], it is

tempting to speculate that the observed variability of the immune responses and the association of inflammatory Th17 lymphocytes with ocular disease are influenced by the infective parasite strains. However, the translation of findings in the rodent model to human toxoplasmosis is elusive, especially considering that functional TLR11 [46] and the whole family of genes encoding IFN- γ -inducible GTPases [47], which are critical elements in host resistance to infection in mice, are mostly absent in humans.

Nevertheless, cytokines produced by T cells are of critical importance for host resistance to infection with *T. gondii*, both in the murine model and in humans [25, 48, 49]. By controlling parasite replication, TNF- α and IFN- γ prevent systemic dissemination of tachyzoites during acute infection and prevent the reactivation of chronic toxoplasmosis in the central nervous system [48]. In this study, we found similar level of Th1 cytokines and similar frequencies of CD4⁺ T cells producing IL-2, IFN- γ , and TNF- α in response to STAg in seropositive individuals, regardless of the presence of ocular disease. In contrast, the frequency of IL-17A-producing Th17 cells was augmented in patients with POT or AOT. Hence, it is possible that Th17 lymphocytes contribute to the development of ocular disease by promoting a deleterious inflammatory process, rather than by interfering with parasite control. Consistently, inflammation has been recognized as a critical process that mediates the ocular lesions in patients infected with *T. gondii* [50]. Together, our results demonstrate an association between NOD2 and the production of IL-17A by inflammatory Th17 lymphocytes and the development of ocular toxoplasmosis.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We are most grateful to Dr Fernando Orefice, Dr Mario Carlos Lemos, Dr Sydney Rocha Lemos, Dr Gustavo Hering, and Dr Juliana Orefice, who also contributed to this study by obtaining histories from and performing physical and eye examinations on individuals who participated in this study; Ms Maria Bernadete Santerio Inocencio, for collecting the blood from the patients with AOT; Dr Ricardo W. Vitor, from the Department of Parasitology of the Universidade Federal de Minas Gerais, who kindly provided the RH parasite strain from which the STAg was obtained; and the patients and their families, for participating and for permitting us to follow their progress.

Financial support. This work was supported in part by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (R01 AI071319-01), the National Institute of Science and Technology for Vaccines (INCTV/CNPq/FAPEMIG), the Carlos Chagas Filho Research Support Foundation FAPERJ (E-26/112.045/2008 and E-26/110.869/2009),

and the National Council for Scientific and Technological Development–CNPq (scholarships to M. S. D. and S. R. B) R. T. G. and L. R. A. are research fellows from CNPq.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol* **2009**; 39:895–901.
- Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J* **2011**; 30:1056–61.
- Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol* **2004**; 137:1–17.
- Portela RW, Bethony J, Costa MI, et al. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. *J Infect Dis* **2004**; 190:175–83.
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* **1992**; 114:136–44.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**; 2:e277.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* **1998**; 11:569–88.
- Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* **2006**; 6:895–906.
- Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**; 104:211–20.
- Lahmar I, Abou-Bacar A, Abdelrahman T, et al. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J Infect Dis* **2009**; 199:1239–49.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **2001**; 276:4812–8.
- Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* **2010**; 16:90–7.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **2005**; 307:731–4.
- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **2007**; 27:660–9.
- Shaw MH, Reimer T, Sanchez-Valdepenas C, et al. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol* **2009**; 10:1267–74.
- Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype–phenotype associations. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9:301–6.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* **2003**; 9:55–62.
- Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, et al. Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**; 104:1187–90.
- Bahia-Oliveira LM, Silva JA, Peixoto-Rangel AL, et al. Host immune response to *Toxoplasma gondii* and *Ascaris lumbricoides* in a highly endemic area: evidence of parasite co-immunomodulation properties influencing the outcome of both infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**; 104:273–80.
- Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT; Standardization of Uveitis Nomenclature Working G. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* **2005**; 140:509–16.
- Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Penido ML, Gazzinelli RT. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther* **2006**; 17:415–26.
- de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* **2005**; 37:1217–23.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **2005**; 21:263–5.
- Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* **2000**; 19(Suppl 1): S36–42.
- Gazzinelli RT, Bala S, Stevens R, et al. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. *J Immunol* **1995**; 155:1565–74.
- Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, et al. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* **2000**; 181:2018–22.
- Church LD, Filer AD, Hidalgo E, et al. Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor-alpha co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression. *Arthritis Res Ther* **2010**; 12:R184.
- Miller SA, Weinmann AS. Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment. *Immunol Rev* **2010**; 238:233–46.
- Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brezin A. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm* **2011**; 19:91–102.
- Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley LD. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108:9631–6.
- Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* **1999**; 29:1351–8.
- Witola WH, Mui E, Hargrave A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun* **2011**; 79:756–66.
- Jamieson SE, Peixoto-Rangel AL, Hargrave AC, et al. Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun* **2010**; 11:374–83.
- Werts C, le Bourhis L, Liu J, et al. Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* **2007**; 37:2499–508.
- Caetano BC, Biswas A, Lima DS Jr, et al. Intrinsic expression of Nod2 in CD4+ T lymphocytes is not necessary for the development of cell-mediated immunity and host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* **2011**; 41:3627–31.
- Guiton R, Vasseur V, Charron S, et al. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis* **2010**; 202:427–35.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* **2006**; 7:937–45.
- Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **2007**; 179:1129–37.

39. Zheng X, de Paiva CS, Li DQ, Farley WJ, Pflugfelder SC. Desiccating stress promotion of Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2010**; 51:3083–91.
40. Zheng X, Bian F, Ma P, et al. Induction of Th17 differentiation by corneal epithelial-derived cytokines. *J Cell Physiol* **2010**; 222:95–102.
41. Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* **2007**; 13:711–8.
42. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, et al. Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum* **2009**; 60:242–50.
43. Luger D, Silver PB, Tang J, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* **2008**; 205:799–810.
44. Melo MB, Jensen KD, Saeij JP. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* **2011**; 27:487–95.
45. Ferreira Ade M, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multi-locus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* **2006**; 6:22–31.
46. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **2005**; 308:1626–9.
47. Hunn JP, Feng CG, Sher A, Howard JC. The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome* **2011**; 22:43–54.
48. Gazzinelli RT, Brezin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol* **1994**; 78:217–29.
49. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **1994**; 153:2533–43.
50. London NJ, Hovakimyan A, Cubillan LD, Siverio CD Jr, Cunningham ET Jr. Prevalence, clinical characteristics, and causes of vision loss in patients with ocular toxoplasmosis. *Eur J Ophthalmol* **2011**; 21:811–9.

Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice

Warrison A. Andrade,^{1,2} Maria do Carmo Souza,¹ Espiridion Ramos-Martinez,^{1,6} Kamalpreet Nagpal,¹ Miriam S. Dutra,^{2,3} Mariane B. Melo,^{1,5} Daniella C. Bartholomeu,² Sankar Ghosh,⁴ Douglas T. Golenbock,^{1,3} and Ricardo T. Gazzinelli^{1,2,3,*}

¹University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

³Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR-Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

⁴Department of Microbiology and Immunology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032, USA

⁵Present address: Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

⁶Present address: Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 06726, México

*Correspondence: ritoga@cpqrr.fiocruz.br

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>

SUMMARY

“Triple-defective” (3d) mice carrying a mutation in UNC93B1, a chaperone for the endosomal nucleic acid-sensing (NAS) Toll-like receptors TLR3, TLR7, and TLR9, are highly susceptible to *Toxoplasma gondii* infection. However, none of the single or even the triple NAS-TLR-deficient animals recapitulated the 3d susceptible phenotype to experimental toxoplasmosis. Investigating this further, we found that while parasite RNA and DNA activate innate immune responses via TLR7 and TLR9, TLR11 and TLR12 working as heterodimers are required for sensing and responding to *Toxoplasma* profilin. Consequently, the triple TLR7/TLR9/TLR11-deficient mice are highly susceptible to *T. gondii* infection, recapitulating the phenotype of 3d mice. Humans lack functional *TLR11* and *TLR12* genes. Consistently, human cells produce high levels of proinflammatory cytokines in response to parasite-derived RNA and DNA, but not to *Toxoplasma* profilin, supporting a more critical role for NAS-TLRs in human toxoplasmosis.

INTRODUCTION

Natural infection with *Toxoplasma gondii* has been described in more than 300 mammal and 30 avian species. While felines are the definitive hosts, mice—the cats’ prey—are the natural intermediate hosts and main reservoirs of this coccidian parasite. Even though humans are considered “accidental” intermediate hosts, one-third of the world population carries a chronic and asymptomatic infection with *T. gondii* (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). However, in immune-compromised individuals, the dormant parasite becomes highly virulent, leading to reactivation of the chronic infection and causing severe disease and lethality (Weiss and Dubey, 2009).

Host resistance to *T. gondii* infection is primarily dependent on T-cell-mediated immunity, and most attention has been focused on IFN γ -producing CD4⁺ T helper type 1 (Th1) and CD8⁺ T effector lymphocytes that are critical for the resolution of acute illness and to prevent reactivation of latent infection (Denkers and Gazzinelli, 1998). In addition, activation of MyD88, an universal adaptor for all Toll-like receptors (TLRs) (except TLR3) (Gazzinelli and Denkers, 2006; Takeuchi and Akira, 2010), is essential for the optimal production of IL-10, IL-12, TNF- α , and IFN γ , all of which are important mediators of host survival during primary infection with *T. gondii* (Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008). While the three latter cytokines (Gazzinelli et al., 1994; Suzuki, 1999) are critical to control parasite growth through activation of effector mechanisms such as inducible GTPases (Howard et al., 2011), IL-10 prevents an excessive inflammatory response that is lethal to the host (Gazzinelli et al., 1996).

As for the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that activate TLRs during *T. gondii* infection, important pieces of the puzzle are still missing. Several parasite products, including glycosylphosphoinositol (GPI) anchors, and heat shock protein were shown to activate TLR2 and TLR4. Yet, mice lacking such TLRs have a rather mild or no phenotype upon *T. gondii* infection (Aosai et al., 2006; Debierre-Grockiego et al., 2007). Importantly, the *T. gondii* profilin-like protein (TgPRF) was shown to activate TLR11, and gene-target disruption of *TLR11* results in a partial defect of IL-12 production and increased number of cysts in the brain from mice infected with *T. gondii* (Plattner et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). However, none of these mice recapitulate the profound phenotype observed in *MyD88* knockout (KO) mice infected with *T. gondii* (Melo et al., 2010; Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008), suggesting that other members of the TLR family are involved.

The “triple D” (3d) mouse expresses an UNC93B1 missense mutant that is incapable of binding the nucleic-acid sensing (NAS) TLRs (i.e., TLR3, TLR7, and TLR9) (Brinkmann et al., 2007; Tabeta et al., 2006), and therefore, to mediate their translocation from the endoplasmic reticulum (ER) and consequent activation into the endolysosomes (Kim et al., 2008). We have

A TLR9KO MOs + TLR9-GFP

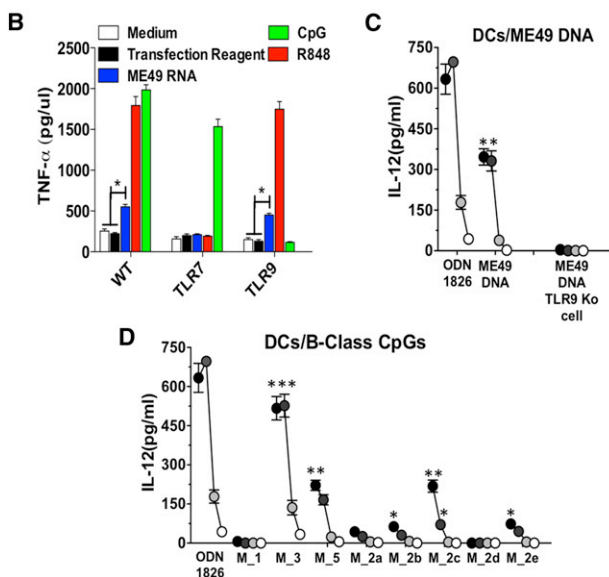
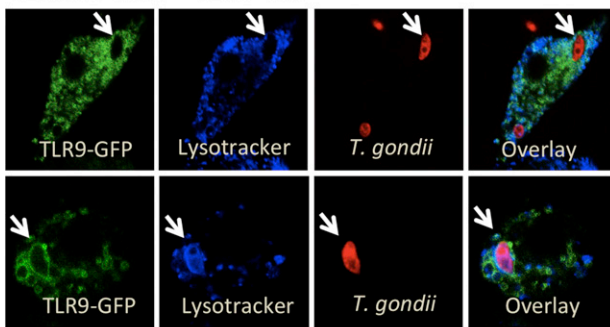


Figure 1. *T. gondii* RNA and DNA Activate Host Cells via TLRs

(A) Confocal microscopy of immortalized *TLR9*^{-/-} macrophages stably expressing TLR9-GFP and infected with CMTPX-stained *T. gondii*. Acidic compartments were stained with LysoTracker White-Blue. Arrows indicate internalized parasites.

(B) Immortalized WT, TLR7 KO, and TLR9 KO macrophages were stimulated with *T. gondii* RNA at 2 μg/ml complexed with DOTAP (Roche). CpG ODN (3 μM) and R848 (2 μM) were used as positive controls.

(C) DCs were stimulated with *T. gondii* DNA complexed with DOTAP at 10, 5, 1, and 0.1 μg/ml. CpG ODN 1826 was used as positive control at the same concentrations.

(D) DCs were stimulated with CpG ODN 1826 as positive control and *T. gondii*-derived oligonucleotides containing B-class mouse-like stimulatory CpG motifs at 3 μM (black circles), 1 μM (dark gray), 0.3 μM (light gray), and 0.1 μM (white circles). Cytokine levels were measured in the tissue culture supernatants at 24 hr after stimulation.

(B–D) Data are represented as mean ± SD of three independent experiments (*0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001). See also Table S1.

shown that 3d mice are highly susceptible to infection with *T. gondii*, presenting a profound impairment of IL-12 and consequent delay in IFN γ production (Melo et al., 2010). In the current study, we further defined the role of endosomal TLRs during infection with *T. gondii*. Our data indicate that TLR7 and TLR9 recognize *Toxoplasma* RNA and DNA, respectively. On the other hand, we found that both TLR11 and TLR12 are required

for UNC93B1-dependent cellular responses to TgPRF. We also report that the triple TLR7/TLR9/TLR11-deficient mice are highly susceptible to *T. gondii* infection, recapitulating the phenotype of 3d mice. It is noteworthy that while the mouse genome encodes 13 TLRs, the human genome lacks functional *TLR11*, *TLR12*, and *TLR13* (Roach et al., 2005). Consistently, human cells produce high levels of proinflammatory cytokines, including IL-12 and TNF- α , in response to parasite-derived RNA and DNA, but not to TgPRF. Hence, our results support the hypothesis that NAS-TLRs play an important role in human toxoplasmosis.

RESULTS

RNA and DNA Derived from *T. gondii* Tachyzoites Activate Host Cells via TLRs

NAS-TLRs are important cognate receptors for viruses, bacteria, and different protozoan parasites (Alexopoulou et al., 2001; Bartholomeu et al., 2008; Benson et al., 2009; Caetano et al., 2011; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2000; Parroche et al., 2007). Here, we exposed immortalized macrophages expressing transgenic TLR9-GFP with Red CMTPX-labeled tachyzoites. TLR9-GFP colocalized with intracellular parasites in the endolysosomal compartment, but not in the parasitophorous vacuole (PV), which is lysoTracker negative (Figure 1A). We also demonstrate that RNA (Figure 1B) and DNA (Figure 1C) extracted from highly purified tachyzoites stimulate immortalized macrophages or DCs, in a TLR7- or TLR9-dependent manner, respectively. Table S1 (available online) lists a series of (total number of 92) immunostimulatory mouse B class-like CpG motifs encoded in the *Toxoplasma* genome. They are potent activators of DCs via TLR9 (Figure 1D).

Combined Deficiency of NAS-TLRs Does Not Recapitulate the High Susceptibility of 3d Mice Infected with *T. gondii*

We found that none of the single TLR3, TLR7, or TLR9 KO mice were more susceptible to infection with *T. gondii* (Melo et al., 2010). Thus, we hypothesize that a combined deficiency of NAS-TLRs would explain the dramatic phenotype observed in the 3d mice. However, none of the double TLR3/TLR7, TLR7/TLR9, TLR7/TLR8, or even the triple TLR3/TLR7/TLR9-deficient mice had an impaired IL-12 and IFN γ production (Figure 2A and data not shown), or were highly susceptible to *T. gondii* infection. Despite this apparently normal IL-12/IFN- γ response, few of the triple TLR3/TLR7/TLR9 KO mice succumbed during an early stage of infection (Figure 2B), which was associated with an increased parasitism in peritoneal cells and spleens (Figure 2C), as well as in the brain (Figure 2D).

Expression of Endosomal TLRs in DCs from Mice Infected with *T. gondii*

Because resistance to experimental infection with *T. gondii* was only slightly affected in the TLR3/TLR7/TLR9 KO mice, we investigated the role of other TLRs, whose function is also dependent on UNC93B1. We generated a molecular tree of mouse TLRs (Phylogeny.fr), which indicated that TLR12 is closely associated to TLR11 and TLR13, that are also endosomal TLRs (Shi et al., 2011; Zhang et al., 2004) (Figure S1). Amino acid sequence

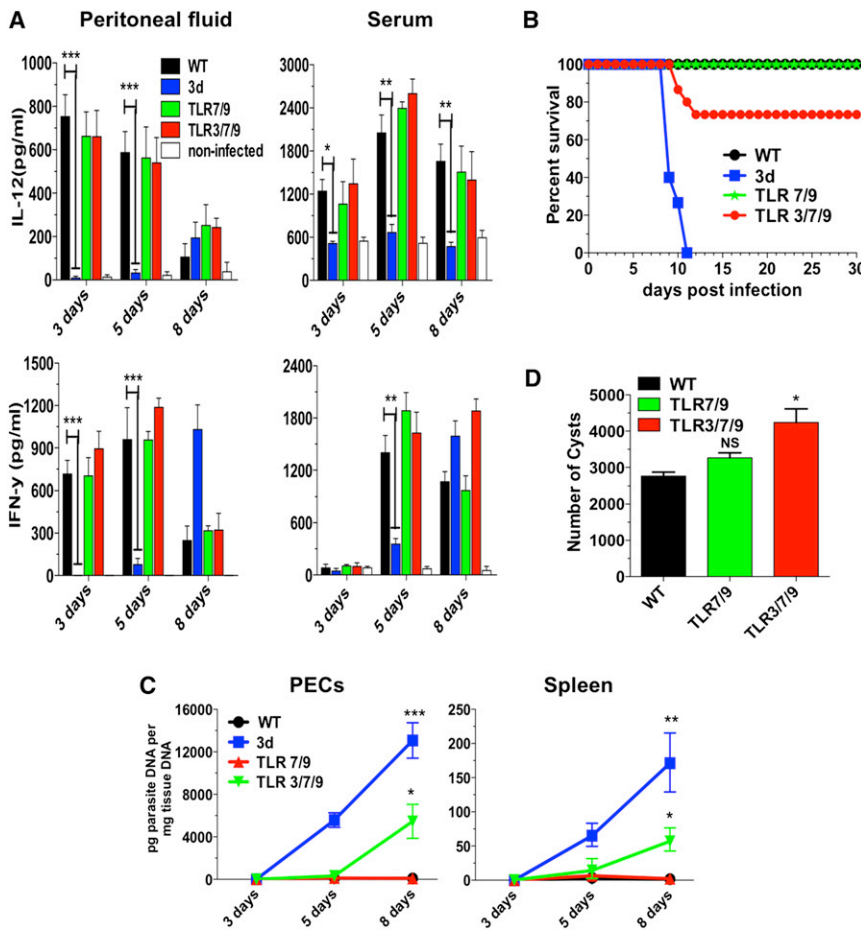


Figure 2. Mice Deficient in TLR3/TLR7/TLR9 Are Only Partially Susceptible to *T. gondii* Infection

Mice were infected intraperitoneally with 25 cysts of *T. gondii* ME49 strain.

(A) Levels of IL-12p40 and IFN γ were measured in the peritoneal cavity exudate and sera at different times postinfection.

(B) Combined survival data from WT (n = 20), 3d (n = 16), TLR7/9 (n = 20), and TLR3/7/9 (n = 20) mice from four independent experiments.

(C) Quantitative real-time PCR analysis was performed on the indicated tissues collected from animals infected with *T. gondii*. Data are the mean of three independent experiments.

(D) Cysts counts in the brain determined at 30 days postinfection are the mean from four experiments. (A–D) Data are represented as mean \pm SD. Asterisks indicate that difference is statistically significant, when comparing different mouse lineages infected with *T. gondii*, (NS, not significant; *0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001).

alignment for TLR11 and TLR12 shows a high degree (35%) of sequence identity, suggesting the possibility that both of them may recognize TgPRF.

As both macrophages and DCs are important sources of IL-12 during *T. gondii* infection in mice, we evaluated the expression of the endosomal TLRs mRNAs in CD11b⁺, CD11c⁺/CD8⁻, and CD11c⁺/CD8⁺ cells. As shown in Figure 3A, mRNAs of TLR3, TLR9, TLR11, and TLR12 were expressed in higher levels in the CD11c⁺/CD8⁺ cells, consistent with the hypothesis that this DC subset is the main source of IL-12 in mice infected with *T. gondii* (Mashayekhi et al., 2011; Yarovinsky et al., 2005). However, a recent study (Goldszmid et al., 2012) indicates that the main IL-12 source in the peritoneal cavity of infected mice is the CD11c⁺CD8⁻ DCs, which we found to express high levels of TLR3, TLR7, and TLR9, and minimal levels of TLR11 or TLR12. Thus, we speculate that IL-12 production by CD11c⁺CD8⁻ DCs and CD11c⁺CD8⁺ DCs is triggered by parasite TgPRF and nucleic acids, respectively. Macrophages also expressed mRNA for the various endosomal TLRs, but in a lesser amount than DCs.

To evaluate whether TLR11 and TLR12 are associated with other endosomal TLRs, HEK293T cells were transiently cotransfected with different Flag-tagged TLRs and TLR11-HA, and TLR11 immunoprecipitated as bait. As shown (Figure 3B), TLR3, TLR7, TLR11, and TLR12, but not TLR4, coimmunoprecipitated with TLR11. UNC93B1 has been reported to physically

interact with TLR3, TLR7, TLR9, TLR11, and TLR13 (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008; Pifer et al., 2011; Tabeta et al., 2006). Thus, the interpretation of these results is that when pulling down TLR11, coimmunoprecipitation of TLR3, TLR7, TLR11, and TLR12 is observed because all the endosomal TLRs are bound to UNC93B1.

Next, we purified CD11c⁺ cells from the spleens of 3d as well as double TLR7/TLR9, triple TLR3/TLR7/TLR9, and single

TLR11 KO mice. DCs from 3d mice were responsive to LPS, but not to R848 (TLR7 agonist), CpG ODN (TLR9 agonist), STAg, ME49, or recombinant TgPRF (rTgPRF). The lack of TLR11, but not TLR3/TLR7/TLR9, had a major impact on IL-12 production by splenic DCs exposed to STAg, ME49, or rTgPRF. Nevertheless, compared to rTgPRF, DCs from TLR11 KO or TLR12 KO mice still produced significant amounts of IL-12 when exposed to either STAg or ME-49 (Figures 3C and 3D). As expected, DCs from TLR3/TLR7/TLR9 KO mice did not respond to R848 or CpG ODN, whereas DCs from TLR11 KO mice produced high levels of IL-12 in response to these TLR agonists (Figure 3C). Treatment with Proteinase K, but not with RNase or DNase, destroyed the ability of rTgPRF to activate CD11c⁺ cells (Figure 3D).

Colocalization and Heterodimerization of TLR11 and TLR12

Macrophages were genetically engineered to stably express color-tagged TLR11 or TLR12 and used to analyze their subcellular distribution by confocal microscopy. We found that in macrophages, TLR11 and TLR12 colocalize with ER tracker, but not with cholera toxin (a cell-surface membrane marker) (Figure 4A). We also transfected HEK293T cells with different combinations of plasmids encoding fluorescent protein-tagged UNC93B1, TLR11, or TLR12, and they all colocalized in the ER (Figure 4B). As control, we transfected HEK293T cells with

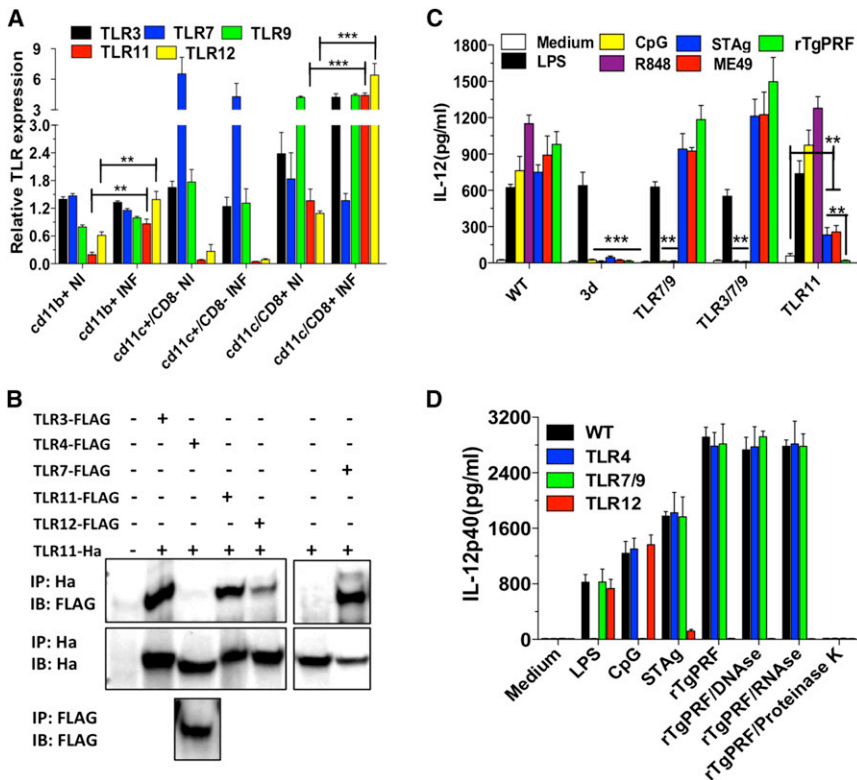


Figure 3. Endosomal TLRs Are Highly Expressed in CD8 α^+ DCs and Upregulated upon *T. gondii* Infection

(A) Real-time PCR was performed to determine the relative levels of TLR3, TLR7, TLR9, TLR11, and TLR12 mRNA expressed by CD11b $^+$, CD11c $^+$ /CD8 α^+ , and CD11c $^+$ /CD8 α^- cells sorted from splenocytes from uninfected controls as well as infected (5 days postinfection) WT mice. TLR mRNA levels were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. Data are represented as mean \pm SD of three experiments.

(B) HEK293T cells were transfected with different pairs of plasmids, total lysates immunoprecipitated (IP) with anti-hemagglutinin (anti-HA, top) or anti-Flag (bottom), and analyzed by immunoblot (IB) with anti-Flag (top and bottom). The top membrane was then stripped and reprobed with anti-HA to ensure expression of hemagglutinin-tagged TLR11 (middle).

(C) CD11c $^+$ cells were purified from spleen of WT, 3d, TLR7/TLR9, TLR3/TLR7/TLR9, and TLR11 KO mice and stimulated with LPS (100 ng/ml) ODN CpG 1826 (1 μ M) or R848 (2 μ M), STAg (10 μ g/ml), rTgPRF (10 ng/ml), or infected with ME49 tachyzoites (moi 3:1).

(D) CD11c $^+$ cells purified from WT, TLR4, TLR7/TLR9, and TLR12 KO mice were stimulated with LPS (100 ng/ml), ODN CpG 1826 (1 μ M), STAg (10 μ g/ml), or rTgPRF (10 ng/ml); left untreated; or treated with DNase (100 U/ml), RNase (10 μ g/ml), or Proteinase K (10 μ g/ml). IL-12 levels were measured in the supernatant at 24 hr after stimulation.

(C–D) Data are represented as mean \pm SD of four experiments. Asterisks indicate that difference is statistically significant when comparing cytokines levels from WT to different KO mice, infected or not infected with *T. gondii* (*0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001). See also Figure S1.

a color-tagged TLR4. The pattern of cellular distribution for TLR4 was distinct from TLR11 and TLR12 (Figure 4B). As expected (Latz et al., 2004), TLR4 was primarily expressed at the surface membrane of the transfected cells.

Importantly, immortalized macrophages produced high levels of IL-12 in response to STAg or ME49 tachyzoites when they were stably transfected with both TLR11 and TLR12, but not with either TLR11 or TLR12 alone (Figure 4C). As dimerization appears to be required for PAMP recognition and activation of TLRs (Latz et al., 2007; Leonard et al., 2008), we used fluorescence resonance energy transfer (FRET) to evaluate the intermolecular distance between the TIR domains of TLRs. HEK293T cells were transfected with different combinations of fluorescent TLRs fused to cerulean (Donor) or citrine (Acceptor) and protein-protein interaction evaluated. A strong FRET signal was observed in cells cotransfected with TLR11 and TLR12, but not with either TLR11/TLR11, TLR12/TLR12, or TLR11/TLR9 stimulated with STAg (Figure 4D) or rTgPRF (Figure 4D and data not shown). After stimulation with CpG, we observed a strong FRET signal for TLR9/TLR9 homodimers. Based on the results described above, we hypothesized that TLR11 and TLR12 work as heterodimers and that deficiency of either TLR11 or TLR12 results in impaired IL-12 production during *T. gondii* infection. Whether formation of TLR11 and TLR12 heterodimers is necessary for recognition of bacterial components (e.g., flagellin) by TLR11 (Mathur et al., 2012; Zhang et al., 2004) remains to be defined.

Quadruple TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 KO Mice Are Highly Susceptible to *T. gondii* Infection

Despite a significant impairment on IL-12 response, TLR11-deficient mice still produced higher levels than the 3d mice, being sufficient to induce IFN γ (Figure 5A) and protect mice from death during acute phase of infection (Figure 5B). Nevertheless, TLR11 KO mice showed a 4-fold increase in cyst numbers (Figure 5C). These data left us with the observation that although the NAS-TLRs and TLR11 are all required for optimal host responses to *T. gondii*, neither seemed essential for survival. Hence, we generated triple TLR7/TLR9/TLR11- and quadruple TLR3/TLR7/TLR9/TLR11-deficient mice. In contrast to DCs from TLR11 KO, CD11c $^+$ cells purified from spleens of either TLR7/TLR9/TLR11 or TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 KO mice did not respond to either STAg or live tachyzoites (ME49) (Figure 6A). As shown in (Figure 6B and Figure S2A), the quadruple KO mice had a major defect in IL-12, IL-6, and MCP1 production, at levels similar to those of 3d mice. MCP1 is an important chemokine for the recruitment of inflammatory monocytes and host resistance to *T. gondii* (Dunay et al., 2008). As presented in Figure S2B, by day 3 after infection, WT mice have an increased number of inflammatory monocytes, which was not observed in 3d or quadruple KO mice. The influx of inflammatory monocytes at 3 days post-challenge was partially reduced in TLR3/TLR7/TLR9 KO mice and may explain the slight enhancement on susceptibility to infection (Figure 2). An impairment in IL-12 production by

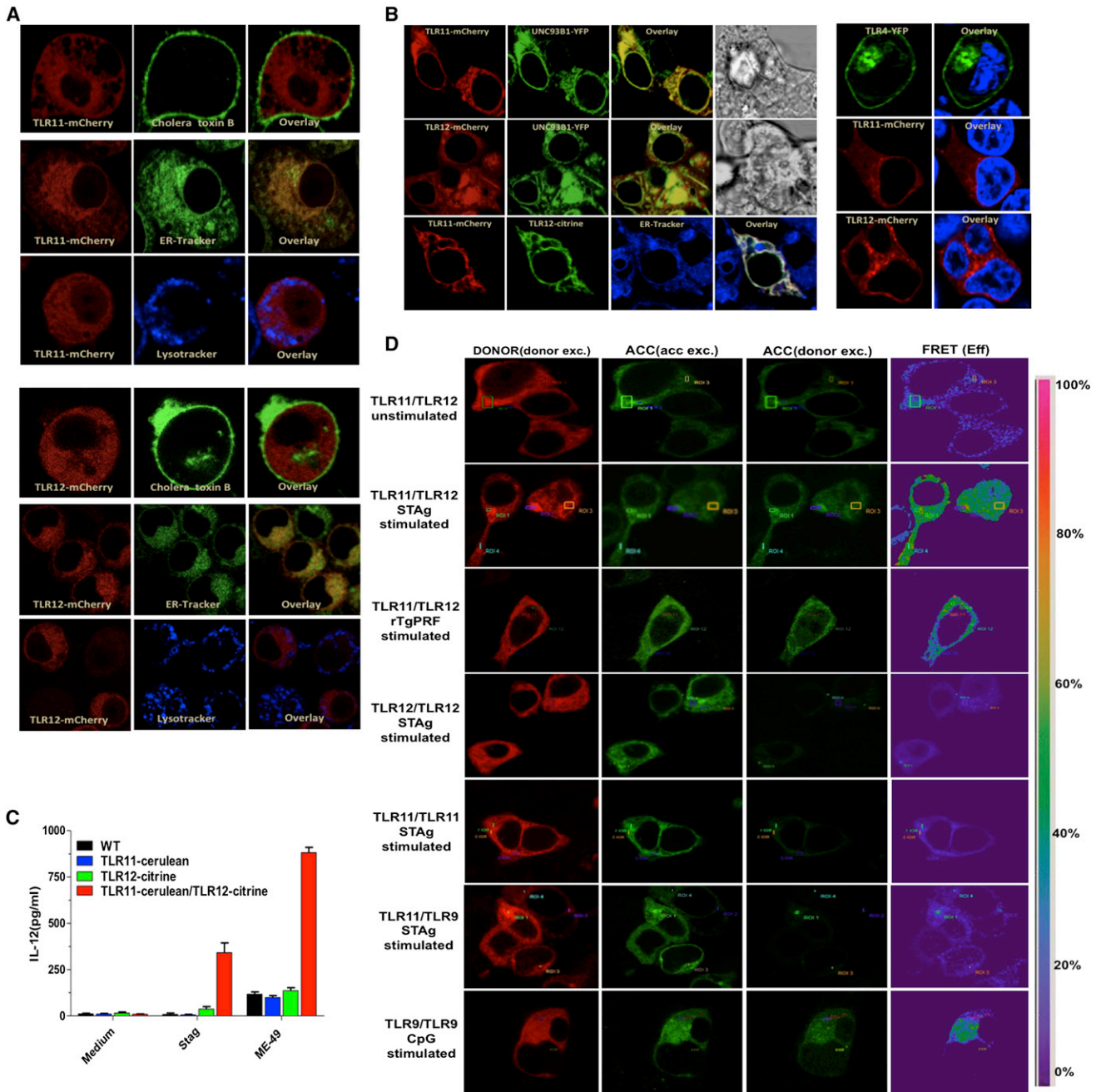


Figure 4. Colocalization and Heterodimerization of TLR11 and TLR12

(A) Immortalized macrophages were stably transfected with *TLR11-mcherry* or *TLR12-mcherry* and imaged poststaining with Cholera toxin B subunit FITC conjugate, LysoTracker White-Blue, or ER-Tracker White-Blue.

(B) HEK293T cells transfected with *TLR11-mcherry* or *TLR12-mcherry* with *UNC93B1-YFP* or *TLR11-mcherry* and *TLR12-citrine* (left panel) or with *TLR4-YFP* and stained with Hoechst 33342 as nuclear marker (right panel).

(C) Immortalized macrophages stably expressing either *TLR11*, *TLR12*, or both were stimulated in vitro with STAg (10 μ g/ml) or exposed to live tachyzoites (moi 3:1) of the ME49 strain and levels of IL-12p40 measured in the supernatants at 24 hr poststimulation. Data are represented as mean \pm SD of three experiments.

(D) HEK293T cells were transfected with the plasmids encoding the proteins indicated in the figure; 48 hr after transfection, cells were left unstimulated or were stimulated with STAg (10 μ g/ml), rTgPRF (100 ng/ml), or CpG 1826 (1 μ M) for *TLR9/TLR9*. FRET between the respective proteins was calculated by measuring sensitized emission (SE) fluorescence using the FRET SE wizard on the Leica SP2 confocal laser-scanning microscope. For each plasmid combination, cerulean (represented in red) was used as donor and citrine (represented in green) as acceptor. Data are from one representative experiment of four.

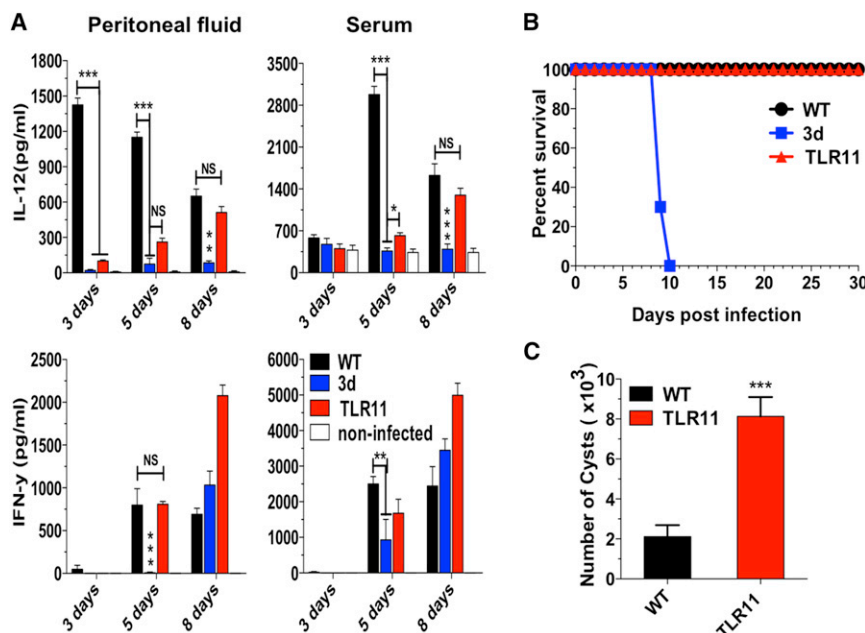


Figure 5. TLR11 Mice Are Resistant to *T. gondii* Infection

Mice were infected intraperitoneally with 25 cysts ME49 strain of *T. gondii*.

(A) Levels of IL-12p40 and IFN γ were measured in the peritoneal cavity exudate and sera from uninfected as well as infected mice.

(B) Combined survival data from WT (n = 15), 3d (n = 12), and TLR11 (n = 15) mice from three independent experiments.

(C) The cyst numbers in the brain were counted at 30 days postinfection and presented as mean from the three experiments.

(A–C) Data are represented as mean \pm SD. Asterisks indicate that difference is statistically significant, when comparing to unstimulated controls (NS, not significant; *0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, and ***p < 0.001).

DCs and inflammatory monocytes was observed both in 3d and quadruple TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 KO mice (Figure 6C), causing a delay in IFN γ production (Figure 6D). After challenge with ME49 strain, quadruple KOs were as susceptible as 3d mice, as indicated by the survival curve and increased parasite burden in peritoneal cells, spleen, and liver (Figures 6E and 6F). We assume that the influx of neutrophils, inflammatory monocytes, and DCs in the highly susceptible mutant/KO mice was too late, and thus, not able to control parasite replication (Figure S2B). Importantly, as shown in Figure 6G, all 3d and TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 KO mice treated with recombinant IL-12 (rIL-12) survived the experimental infection with *T. gondii*.

We also generated the triple TLR7/TLR9/TLR11-deficient mice, which were as susceptible as the 3d and quadruple KO mice infected with *T. gondii* (Figure 6D). As TRIF and type I IFN are, respectively, the main adaptor molecule and outcome of TLR3 activation, we performed experimental infections in TLR3 KO, TRIF KO, and Type I IFN receptor KO mice. Our results show that when compared to WT mice, none of these mice displayed enhanced susceptibility to *T. gondii* infection (Figures S2C and S2D). Consistently, we were unable to detect any increase in the production of IFN- α protein in peritoneal fluids, splenocyte cultures, or sera from WT mice infected with *T. gondii* (data not shown).

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce High Levels of IL-12 in Response to *T. gondii* DNA and RNA, but Not rTgPRF

TLR11 and TLR12 are not expressed in human cells (Roach et al., 2005; Zhang et al., 2004). This raised the hypothesis that NAS-TLRs are the key TLRs sensing *T. gondii* parasites in human cells. The results presented in Figure 7A indicate that when compared to R848 (agonist for human TLR8) and LPS (agonist for TLR4), STAg is a poor stimulator of IL-12p70, TNF- α , and IL-1 β produc-

tion by human PBMCs. Furthermore, we were unable to detect production of any cytokine (including IL-12p70) in response to rTgPRF (Figure 7B). Nevertheless, we found that parasite RNA and DNA elicited the production of proinflammatory cytokines, including TNF- α , IL-12p40, and IL-12p70, which was more pronounced when PBMCs were primed with IFN γ (Figure 7B). We also searched for immunostimulatory CpG motifs (Table S2) that activate human TLR9. In the whole genome, we found 363 human B class CpG motifs and 67 human C class motifs. Synthetic B and C class-like immunostimulatory oligonucleotides derived from *T. gondii* genome induced NF- κ B activation in HEK cells (Figure 7C), as well as proinflammatory cytokines, and in special IL-12p40/IL-12p70, when human PBMCs were primed with IFN γ (Figure 7D).

DISCUSSION

We hypothesized that a combined deficiency of NAS-TLRs was responsible for the observed phenotype of 3d mice infected with *T. gondii*. Our current report indicates that the extreme susceptibility of 3d mice is due to a combined defect on endosomal TLRs, but not simply a deficiency of the NAS-TLRs, also including TLR11 and TLR12. The combined deficiency of endosomal TLRs results in a profound impairment of IL-12 production by both dendritic cells and macrophages, and a subsequent reduction in the levels of IFN γ .

In our previous study (Melo et al., 2010), we suggested, as an alternative mechanism, that UNC93B1 was directly mediating control of tachyzoite replication in the PV. However, induction and translocation of iGTPases to the PV are normal, and IFN γ -activated macrophages from 3d mice effectively controlled parasite replication (Melo et al., 2010). In addition, macrophages lacking functional TLRs, including NAS-TLRs, are not more permissive to parasite growth in vitro. To test this hypothesis in vivo, we generated mixed chimeras and observed that in vivo parasite replication was equal in cells from WT and 3d mice (data not shown). UNC93B1 is also involved in antigen crosspresentation (Tabeta et al., 2006),

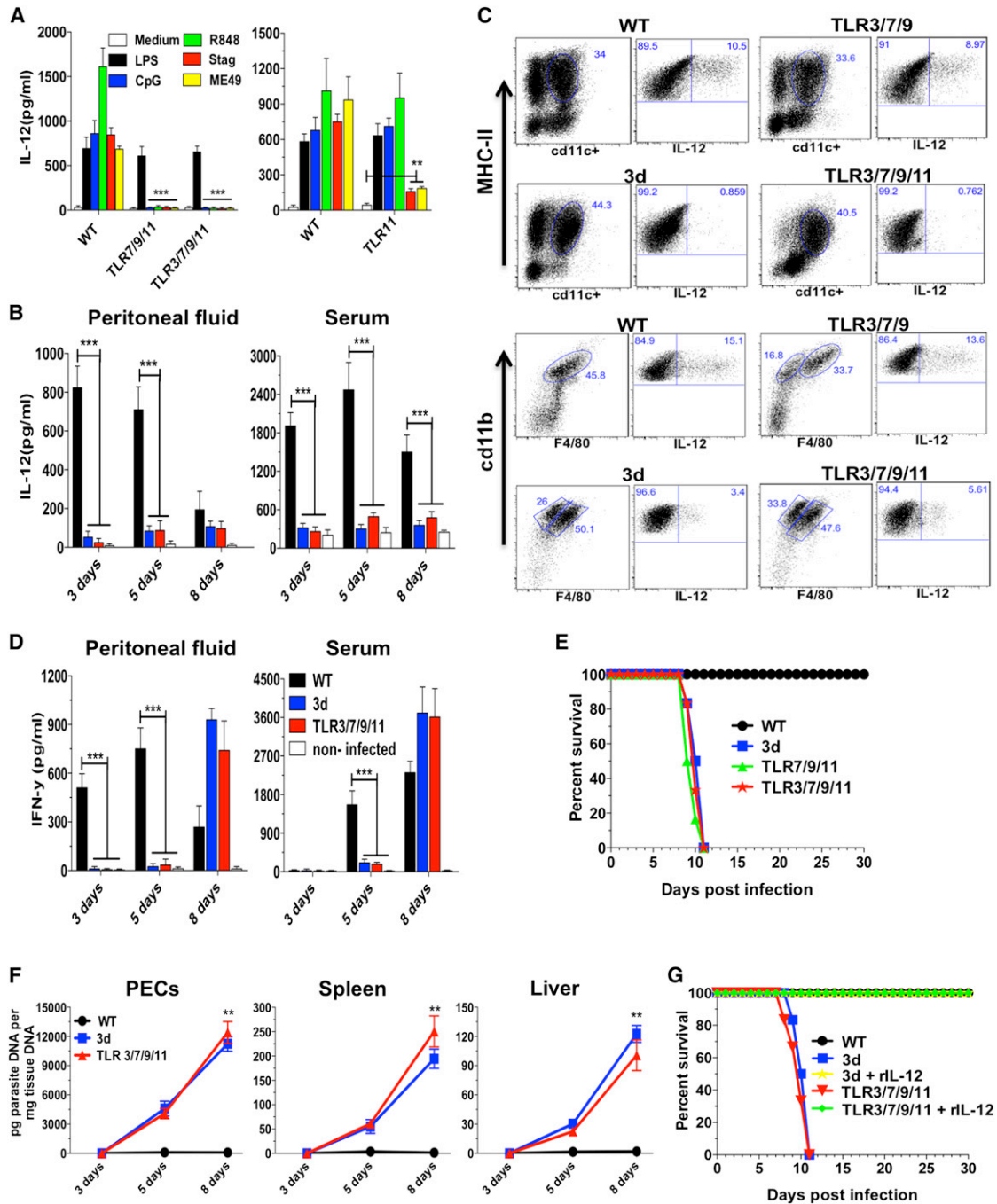


Figure 6. Quadruple Deficient Mice Have an Impaired IL-12 and Early IFN γ Production and Are Highly Susceptible to *T. gondii* Infection

(A) CD11c⁺ cells were purified from spleen of WT, TLR7/TLR9/TLR11, TLR3/TLR7/TLR9/TLR11, and TLR11 KO mice and stimulated with LPS (100 ng/ml), ODN CpG 1826 (1 μ M), R848 (2 μ M), STAG (10 μ g/ml), or infected with ME49 tachyzoites (moi 3:1). Data are represented as mean \pm SD of two experiments.

(B) Levels of IL-12p40 were measured in the peritoneal cavity exudate and sera from uninfected controls and infected mice. Data are represented as mean \pm SD of four experiments.

(C) Mice infected with *T. gondii* were sacrificed at 5 days postinfection and peritoneal cells analyzed for IL-12 cellular source by intracellular cytokine staining. Dendritic cells (top) were gated for CD11c⁺/MHC-II⁺. Inflammatory monocytes (bottom) were gated first for GR1⁺ and then for CD11b⁺/F4/80⁺. Both populations were stained for IL-12p70. Data are from one representative experiment of three that yielded similar results.

(D) Levels of IFN γ present in the peritoneal cavity exudate and sera from uninfected controls and infected mice. Data are represented as mean \pm SD of four experiments.

(E) Combined survival data from WT (n = 15), 3d (n = 10), TLR7/9/11 KO (n = 10), and TLR3/7/9/11 KO (n = 15) mice from at least two independent experiments.

(F) Quantitative real-time PCR analysis was performed on the indicated tissues collected from animals infected with *T. gondii*. Data are represented as mean \pm SD of three independent experiments.

(legend continued on next page)

but we have no indication that activation of CD8⁺ T lymphocytes is impaired in 3d mice infected with intracellular protozoan parasites (Caetano et al., 2011; Melo et al., 2010). Hence, we propose that the main cause of the enhanced susceptibility of 3d mice to *T. gondii* infection is the defective activation of endosomal TLRs, impaired IL-12 production, and inadequate development of protective immunity.

As observed for other intracellular protozoan parasites (Bartholomeu et al., 2008; Caetano et al., 2011; Parroche et al., 2007), we report that *Toxoplasma*-derived DNA and RNA induce the production of proinflammatory cytokines by macrophages and DCs. However, the triple TLR3/TLR7/TLR9 KO mice are only slightly more susceptible to infection with *T. gondii*. In addition, mice deficient in TLR11, which is activated by TgPRF in an UNC93B1-dependent manner (Pifer et al., 2011), survive the acute infection with *T. gondii* (Yarovinsky et al., 2005). This complicated scenario convinced us to generate the quadruple TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 and triple TLR7/TLR9/TLR11 KO mice that upon infection with *T. gondii* recapitulated the 3d phenotype, resulting in a profound impairment of the IL-12/IFN- γ axis, and unhampered parasite growth.

Importantly, two studies reported that TLR9 is partially responsible for the development of an optimal antiparasite Th1 response and intestinal pathology, when mice are per-orally infected with cysts of the ME49 strain of *T. gondii* (Benson et al., 2009; Minns et al., 2006). The interpretation of these results is that DNA of the intestinal microflora serves as a natural adjuvant for mucosal immunity (Hall et al., 2008). However, the adjuvant effect of the intestinal microflora is not observed when mice are infected intraperitoneally (Benson et al., 2009). Since our main interest was to identify the innate immune receptors for *T. gondii*, we used the intraperitoneal infection to avoid the interference of the gut microbiota. Hence, collectively, our results indicate that in addition to TLR11, TLR7, and TLR9 are also important sensors of *Toxoplasma* tachyzoites.

The high similarity of *TLR11* and *TLR12* found in a phylogenetic analysis led us to query if they had similar function, as previously observed for *TLR1*, *TLR2*, and *TLR6* (Roach et al., 2005; Triantafilou et al., 2006). Indeed, TLR11 and TLR12 colocalized with UNC93B1 in transfected HEK293T cells, and FRET between TLR11/TLR12 was induced upon activation with *Toxoplasma* extracts or rTgPRF. This result was not observed when the TLRs were expressed alone, suggesting that homodimerization does not occur. Together, our biochemical, cellular, and immunological assays strongly suggest that both TLR11 and TLR12 are endosomal TLRs and act as heterodimers in the recognition of *Toxoplasma* molecules. Thus, we propose that in mice the primary role of UNC93B1 in host resistance to *T. gondii* infection is to mediate translocation and function of TLR7, TLR9, TLR11, and TLR12.

The endosomal localization of TLR11 and TLR12, in contrast to the surface membrane TLRs that recognize cell wall components of bacteria (i.e., TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6), is an

important finding. The current report further emphasizes that despite the presence of ligands for surface membrane TLRs (Gazzinelli and Denkers, 2006), endosomal TLRs are the critical ones for the in vivo sensing of intracellular protozoan parasites. The protozoan ligands that are recognized by endosomal TLRs appear to reside inside the protozoan parasite, DNA, RNA, and TgPRF, all of which are released from the parasite when it is killed in the phagolysosome. As shown for TLR9, it is reasonable to speculate that both TLR11 and TLR12 translocate from the ER and recognize the parasite components in the endolysosomes and not in the PV, which avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways (Mordue et al., 1999). While activation of DCs by TgPRF, STAg, or live tachyzoites is mediated by UNC93B1, additional experiments are necessary to confirm the cellular location of TLR11/TLR12 activation.

Another intriguing aspect of the TLR11 and TLR12 biology is their species specificity. *TLR11* in humans is a pseudogene (Zhang et al., 2004), whereas *TLR12* is not present in the human genome. As mice are the natural intermediate host and highly exposed to *T. gondii* infection, we speculate that *TLR11* was not only maintained as a functional receptor but also duplicated as an important mechanism of host resistance to infection. Although TLR11 and TLR12 are not involved in recognition of *T. gondii* by human cells, one can imagine that they may play an indirect role in human disease because of the role that mouse has in transmitting the parasite to cats, which can then transmit to humans.

It is worth mentioning that in mice TLR8 has no known ligands, whereas TLR7 is widely expressed and functions as a receptor for ssRNA (Heil et al., 2004). Complicating matters, human mDCs and monocytes respond to ssRNA via TLR8. Human TLR7 is active, however, in pDCs' (which do not express TLR8) response to RNA viruses (Forsbach et al., 2008). Thus, in consideration of the lack of expression of TLR11 and TLR12 in humans, these data led us to speculate that TLR7, TLR8, and TLR9 are the key TLRs in human toxoplasmosis. Importantly, human PBMCs from uninfected healthy donors produce significant levels of IL-1 β and TNF- α when stimulated with parasite-derived DNA and RNA, as well as oligonucleotides containing CpG motifs derived from *Toxoplasma* genome. Furthermore, when primed with IFN γ , human PBMCs produced high levels of IL-12p40/70 upon stimulation with parasite-derived nucleic acids, but not with STAg or rTgPRF. The precedent for the importance of IFN γ priming in the production of IL-12 also exists in the rodent model of toxoplasmosis (Gazzinelli et al., 1994; Goldszmid et al., 2012).

Finally, although it is considered an "accidental" intermediate host, one-third of the human population in the world is chronically infected with *T. gondii* (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). While one can imagine the evolutionary pressures that gave rise to TLR11 in mice, it remains unclear why it was downgraded to a noncoding gene in humans. Hence, our findings have

(G) WT, 3d, and TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 KO were infected i.p. with the ME49 strain of *T. gondii* (n = 5 per group). Mice were treated with 100 ng of recombinant IL-12p70 or vehicle for 6 consecutive days, and mortality was evaluated. Data are from one representative experiment of two that yielded identical results. Asterisks indicate that difference is statistically significant, when comparing different mouse lineages infected with *T. gondii*. (**0.001 < p < 0.01, and ***p < 0.001). See also Figure S2.

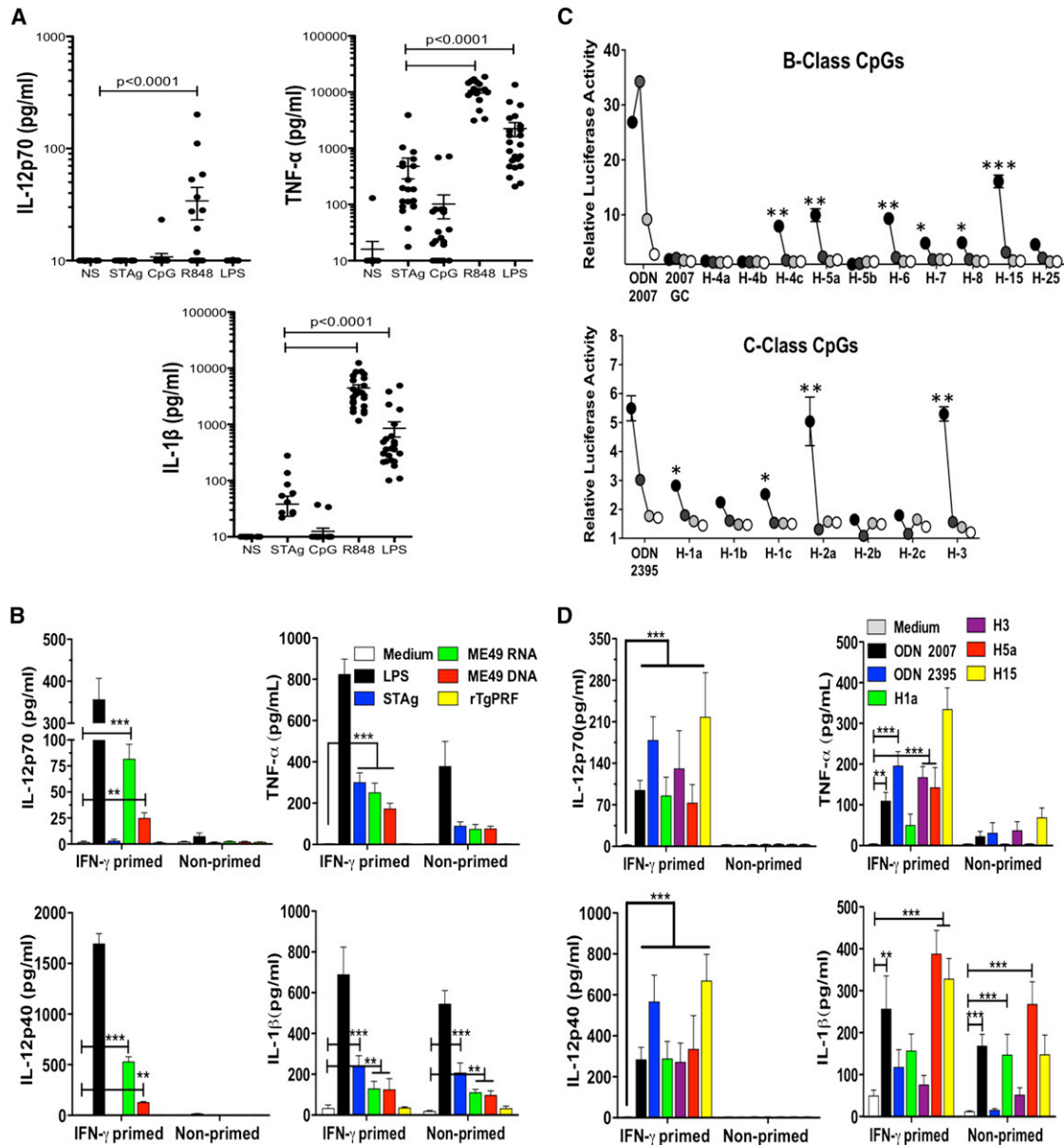


Figure 7. DNA and RNA from *T. gondii* Activate Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

(A) PBMCs purified from blood of clinically healthy donors were stimulated in vitro with STAg (10 μ g/ml), CpG ODN 2007 (1 μ M), R848 (2 μ M), or LPS (100 ng/ml). Data are represented as mean \pm SD.

(B) PBMCs primed or not with recombinant human IFN γ (200 U/ml) were stimulated with LPS (100 ng/ml), STAg (10 μ g/ml), ME49 RNA (2 μ g/ml), ME49 DNA (5 μ g/ml), or rTgPRF (1 μ g/ml). Parasite RNA and DNA were complexed with DOTAP (Roche).

(C) HEK293T cells were stimulated with either CpG ODN 2007 (B class) or 2395 (C class) as positive controls, or *T. gondii*-derived oligonucleotides containing B or C class human-like stimulatory CpG motifs at 3 μ M (black circles), 1 μ M (dark gray), 0.3 μ M (light gray), and 0.1 μ M (white circles). Asterisks indicate that differences are statistically significant when comparing stimulated cells with negative control—ODN 2007GC (top panel).

(D) PBMCs primed or not with recombinant human IFN γ (200 U/ml) were stimulated in vitro with either CpG ODN 2007 (B class) or 2395 (C class) as positive controls, or *T. gondii*-derived oligonucleotides containing B and C class human-like stimulatory CpG motifs (5 μ M). Cytokine levels were measured in the supernatants at 18 hr after stimulation.

(B–D) Data are represented as mean \pm SD of three independent experiments (*0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, and ***p < 0.001). See also Table S2.

important implications for human disease. One has to assume that alternative TLRs are responsible for detecting the parasite, triggering innate immunity and initiating acquired immunity during acute toxoplasmosis in humans. The data presented here show that human PBMCs produce high levels of proinflam-

matory cytokines, including IL-12, in response to *T. gondii* RNA and DNA, but not rTgPRF. Finally, a recent study reports an association of a *TLR9* single-nucleotide polymorphism and development of ocular toxoplasmosis (Peixoto-Rangel et al., 2009). Hence, we propose that NAS-TLRs, as well as the signaling

pathways they activate, are important determinants of resistance to infection and the clinical outcome of human toxoplasmosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ethics Statement

All experiments involving animals were performed in accordance with guidelines set forth by the American Association for Laboratory Animal Science (AALAS) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC A-1817) at the University of Massachusetts Medical School (UMASSMED). The protocols and consent forms for experiments with human PBMCs were approved by the Institutional Research Board from UMASSMED (IRB-UMMS H-12328) and from Centro de Pesquisas René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqRR 11/2006), as well as by the National Ethical Committee (CONEP 13.368) from the Ministry of Health in Brazil.

Reagents

All cell culture reagents were obtained from Mediatech. LPS derived from *Escherichia coli* strain 0111:B4 was purchased from Sigma and re-extracted by phenol chloroform to remove lipopeptides as described (Hirschfeld et al., 2000). R848, a synthetic small molecule agonist for TLR7, was provided by 3M Pharmaceuticals. Phosphorothioate-stabilized unmethylated DNA oligonucleotide-bearing CpG ODN 1826, ODN 2007, and ODN 2395, as well as ODNs containing CpG motifs identified in *T. gondii* genome and qPCR primers, were obtained from Integrated DNA Technologies. Purified rTgPRF (Skillman et al., 2012) was kindly provided by Dr. David Sibley (Washington University, St. Louis, MI). Mouse and Human Recombinant Interferon- γ and rIL-12p70 were purchased from eBioscience. ER-Tracker Blue-White dpx, LysoTracker Blue-White dpx, and Cell Tracker Red CMTPX were obtained from Molecular Probes and Cholera Toxin B Subunit FITC conjugate from Sigma. Hoechst 33342 to stain the nucleus was bought from Thermo Scientific. Proteinase K was obtained from Ambion and DNase and RNase from Promega.

Mice and Parasites

C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory. UNC93B1 mutant (3d) mice were kindly provided by Bruce Beutler at The Scripps Research Institute, La Jolla, CA (Tabeta et al., 2006). The single TLR3, TLR7, TLR9, and TLR11 KO mice were kindly provided by Shizuo Akira (Osaka University, Japan) and Richard Flavell (Yale University), respectively. TLR12 KO mice were provided by Sankar Ghosh (Columbia University, New York, NY). Interbreeding single KO animals generated TLR3/7-, TLR7/9-, TLR3/7/9-, TLR7/9/11-, and TLR3/7/9/11-deficient mice. Age-matched (6 to 8 weeks old) and female groups of WT and KO mice were used in all experiments. The ME49 strain was maintained in C57BL/6 mice by serial inoculation of brain homogenate-containing cysts. ME49 tachyzoites were maintained in human foreskin fibroblast cells (Hs27) (Lock, 1953) and used to prepare STAg as previously described (Melo et al., 2010). DNA and RNA were extracted by employing DNeasy Blood and Tissue Kit and RNeasy Mini Kit from QIAGEN.

Genome-wide Scanning for TLR9-Stimulatory Sequences

Both mouse B-like class and human-like B and C class CpG motifs were searched in the DNA strands of the assembled contigs of *T. gondii* ME49 genome downloaded from the ToxoDB website (<http://toxodb.org/common/downloads/>), as previously described (Bartholomeu et al., 2008).

Cell Purification

CD11c+ cells were purified using the EasySep mouse CD11c-positive selection kit according to the manufacturer's protocol. In some experiments, CD11c+ cells, purified in magnetic beads, were stained with anti-CD8APC and sorted in a FACSAria for PE (CD11c+) or PE/APC (CD11c+/CD8+). Cell purity was checked by FACS.

Measurement of Cytokine Levels

The levels of mouse TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-6, and MCP1 were measured by using DuoSet ELISA kits (R&D Systems). IL-12p70, IL-1 β , and TNF- α levels

were measured in PBMC culture supernatants by using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Bioscience) or ELISA for IL-12p40 (R&D Systems).

Flow Cytometry

Cells were stained with conjugated antibodies against the surface markers CD11b, CD11c, GR1, F4/80, and MHC-II (eBioscience). For intracellular measurement of cytokines, cells cultivated for 8 hr in the presence of GolgiPlug (BD Bioscience), surface stained, fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with PBS + Tween 20 0.5% and incubated with Phycoerythrin anti-IL-12p70 (BD Biosciences). Subsequently cells were washed and analyzed by flow cytometry in an LSRII cytometer (BD Biosciences).

Quantitative Real-Time PCR

Total DNA from peritoneal exudate cells, spleen, and liver was used for amplification of *T. gondii* B1 gene (Melo et al., 2010). Relative quantification was performed using standard curve analysis of purified parasite DNA. For TLR expression, the following primers were used: TLR3 forward, 5'-ATAAAATCCTTGCGTTGCGAAGT-3'; TLR3 reverse, 5'-TGTTCAAGAGGAGGGCGAATAA-3'; TLR7 forward, 5'-TCTTTGGGTTTCGATGGTTCC-3'; TLR7 reverse, 5'-GCAGTCCACGATCACATGGG-3'; TLR9 forward, 5'-ACGGGAAGTCTACTACAAG A-3'; TLR9 reverse, 5'-CCCAGCTTGACAATGAGGTTAT-3'; TLR11 forward, 5'-AGAGCTGGCTGGTATGTTCC-3'; TLR11 reverse, 5'-GTGTTCTGTGAGGTCCAGAATC-3'; TLR12 forward, 5'-CCAGGACTGCACCTTTTGG-3'; TLR12 reverse, 5'-GTGACACTGGTTGTACGCAAT-3'.

Immunoprecipitation

HEK293T cells were cotransfected with bait and prey constructs. Forty-eight hours posttransfection, cells were lysed in Ripa lysis buffer (Sigma) with Complete Mini Protease Inhibitors (Roche). An equal amount of cell lysate was used for immunoprecipitation with monoclonal anti-HA (Sigma) bound to protein A agarose (Invitrogen). Eluted proteins were electrophoresed by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose (Bio-Rad), and blotted using monoclonal antibody anti-HA or anti-Flag (Sigma).

Plasmid Construction and Viral Transduction

TLR11 and *TLR12* from InvivoGen plasmids were cloned into mCherry-, Cerulean-, and Citrine-tagged vectors that were modified from the original pCLXSN backbone from Imgenex. All tags were fused in the C-terminal portion of the TLRs. Recombinant retroviruses were produced as previously described (Mann et al., 1983; Melo et al., 2010).

Confocal Microscopy

We used an inverted Leica LSM TSC SP2 AOBS microscopy and a 1.4 NA 63 \times plan apochromat objective (Zeiss). Cells were cultured on glass-bottom 35 mm tissue culture dishes (Matek), and dual or triple color images were acquired by consecutive scanning. For fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments, HEK293T cells were transiently transfected with the indicated plasmids and 48 hr later stimulated for 4 hr with STAg or rTgPRF, or for 1 hr with CpG 1826. FRET between the respective proteins was calculated by measuring sensitized emission (SE) fluorescence using the FRET SE wizard on the Leica SP2 confocal laser-scanning microscope. In each case, cerulean-tagged protein acted as the donor fluorophore, whereas the citrine-tagged protein functioned as the acceptor fluorophore. Excitation wavelengths for the donor and acceptor were 405 nM and 514 nM, respectively. The FRET efficiency is shown as a color-coded scale of values between 0 and 100%.

Experiments with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBMCs were enriched onsite by gradient centrifugation over Ficoll-Paque plus (GE-Healthcare). Cells were plated at 3×10^5 cells/well and cytokines measured 18 hr poststimulation with STAg, rTgPRF, CpG oligonucleotides, R848, LPS, ME49 DNA, or RNA.

Luciferase Assay

HEK293 cells stably expressing human TLR9 and a luciferase gene under the control of the pELAM promoter-containing NF- κ B sites were used for testing the activity of *T. gondii*-derived ODNs. We also used pRL vector expressing

a *Renilla* luciferase gene (Promega) for constitutive protein expression, and assays revealed by Dual luciferase reporter assay system (Promega) substrate (Bartholomeu et al., 2008; Latz et al., 2007).

Statistical Analysis

All data were analyzed using an unpaired, two-tailed Student's t test with a 95% confidence interval (Prism; GraphPad Software, Inc.). All data are represented as means \pm SD.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes two figures and two tables and can be found with this article at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank A. Cerny for animal husbandry and genotyping, as well as A. Sher and D. Jankovic for discussions during the development of this study. We are also grateful to D. Sibley for providing rTgPRF. This work was supported by the National Institute of Health (NIAID R01 AI071319-01) and the National Institute of Science and Technology for Vaccines (INCTV/CNPq/FAPEMIG). W.A.A. and E.R.M. were supported by fellowships from CNPq (Brazil) and DGAPA (Mexico), respectively.

Received: August 1, 2012

Revised: November 5, 2012

Accepted: December 13, 2012

Published: January 3, 2013

REFERENCES

- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732–738.
- Aosai, F., Rodriguez Pena, M.S., Mun, H.S., Fang, H., Mitsunaga, T., Norose, K., Kang, H.K., Bae, Y.S., and Yano, A. (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*, 13–22.
- Bartholomeu, D.C., Ropert, C., Melo, M.B., Parroche, P., Junqueira, C.F., Teixeira, S.M., Sirois, C., Kasperkovitz, P., Knetter, C.F., Lien, E., et al. (2008). Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* *181*, 1333–1344.
- Benson, A., Pifer, R., Behrendt, C.L., Hooper, L.V., and Yarovinsky, F. (2009). Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* *6*, 187–196.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* *177*, 265–275.
- Caetano, B.C., Carmo, B.B., Melo, M.B., Cerny, A., dos Santos, S.L., Bartholomeu, D.C., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2011). Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* *187*, 1903–1911.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., et al. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *179*, 1129–1137.
- Denkers, E.Y., and Gazzinelli, R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 569–588.
- Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* *29*, 306–317.
- Forsbach, A., Nemorin, J.G., Montino, C., Müller, C., Samulowitz, U., Vicari, A.P., Jurk, M., Mutwiri, G.K., Krieg, A.M., Lipford, G.B., and Vollmer, J. (2008). Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J. Immunol.* *180*, 3729–3738.
- Gazzinelli, R.T., and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 895–906.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *153*, 2533–2543.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Cheever, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *J. Immunol.* *157*, 798–805.
- Goldszmid, R.S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., and Sher, A. (2012). NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* *36*, 1047–1059.
- Hall, J.A., Bouladoux, N., Sun, C.M., Wohlfert, E.A., Blank, R.B., Zhu, Q., Grigg, M.E., Berzofsky, J.A., and Belkaid, Y. (2008). Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* *29*, 637–649.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526–1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.
- Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J.H., Vogel, S.N., and Weis, J.J. (2000). Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* *165*, 618–622.
- Howard, J.C., Hunn, J.P., and Steinfeldt, T. (2011). The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 414–421.
- Kim, Y.M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234–238.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* *5*, 190–198.
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., et al. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *8*, 772–779.
- Leonard, J.N., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J.K., Margulies, D.H., Davies, D.R., and Segal, D.M. (2008). The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 258–263.
- Lock, J.A. (1953). Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture in mammalian cells. *Lancet* *1*, 324–325.
- Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* *33*, 153–159.
- Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., and Murphy, K.M. (2011). CD8 α (+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* *35*, 249–259.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S.G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). A mouse model of salmonella typhi infection. *Cell* *151*, 590–602.
- Melo, M.B., Kasperkovitz, P., Cerny, A., Könen-Waisman, S., Kurt-Jones, E.A., Lien, E., Beutler, B., Howard, J.C., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2010). UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* *6*, e1001071. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001071>.

- Minns, L.A., Menard, L.C., Foureau, D.M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D.W., Buzoni-Gatel, D., and Kasper, L.H. (2006). TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *176*, 7589–7597.
- Mordue, D.G., Håkansson, S., Niesman, I., and Sibley, L.D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Parasitol.* *92*, 87–99.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 1919–1924.
- Peixoto-Rangel, A.L., Miller, E.N., Castellucci, L., Jamieson, S.E., Peixe, R.G., Elias, Lde.S., Correa-Oliveira, R., Bahia-Oliveira, L.M., and Blackwell, J.M. (2009). Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *104*, 1187–1190.
- Pifer, R., Benson, A., Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2011). UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *286*, 3307–3314.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* *3*, 77–87.
- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 9577–9582.
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *25*, 264–296.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (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*, 5997–6001.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S., and Zhang, D. (2011). A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* *286*, 4517–4524.
- Skillman, K.M., Daher, W., Ma, C.I., Soldati-Favre, D., and Sibley, L.D. (2012). *Toxoplasma gondii* profilin acts primarily to sequester G-actin while formins efficiently nucleate actin filament formation in vitro. *Biochemistry* *51*, 2486–2495.
- Sukhumavasi, W., Egan, C.E., Warren, A.L., Taylor, G.A., Fox, B.A., Bzik, D.J., and Denkers, E.Y. (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*, 3464–3473.
- Suzuki, Y. (1999). Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* *201*, 255–271.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. (2006). The UNC93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* *7*, 156–164.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805–820.
- Triantafilou, M., Gamper, F.G., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* *281*, 31002–31011.
- Weiss, L.M., and Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* *39*, 895–901.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626–1629.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* *303*, 1522–1526.

Impaired Innate Immunity in Mice Deficient in Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Leads to Defective Type 1 T Cell Responses, B Cell Expansion, and Enhanced Susceptibility to Infection with *Toxoplasma gondii*

Samantha R. Béla, Míriam S. Dutra, Ernest Mui, Alexandre Montpetit, Fernanda S. Oliveira, Sérgio C. Oliveira, Rosa M. E. Arantes, Lis R. Antonelli, Rima McLeod and Ricardo T. Gazzinelli

Infect. Immun. 2012, 80(12):4298. DOI: 10.1128/IAI.00328-12.
Published Ahead of Print 1 October 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://iai.asm.org/content/80/12/4298>

These include:

REFERENCES

This article cites 55 articles, 30 of which can be accessed free at: <http://iai.asm.org/content/80/12/4298#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Impaired Innate Immunity in Mice Deficient in Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Leads to Defective Type 1 T Cell Responses, B Cell Expansion, and Enhanced Susceptibility to Infection with *Toxoplasma gondii*

Samantha R. Béla,^{a,b} Míriam S. Dutra,^{a,b} Ernest Mui,^c Alexandre Montpetit,^d Fernanda S. Oliveira,^b Sérgio C. Oliveira,^b Rosa M. E. Arantes,^b Lis R. Antonelli,^a Rima McLeod,^c and Ricardo T. Gazzinelli^{a,b,e}

Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR-Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil^a; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil^b; Departments of Surgery, Ophthalmology and Pediatrics (Infectious Disease), University of Chicago, Chicago, Illinois, USA^c; McGill University and Génome Québec Innovation Center, Montréal, Québec, Canada^d; and University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA^e

Interleukin-1 receptor (IL1R)-associated kinase 4 (IRAK4) 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 receptor (TLR) function. We investigated the role of this kinase in IRAK4-deficient mice orally infected with the cystogenic ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. IRAK4^{-/-} mice displayed higher morbidity, tissue parasitism, and accelerated mortality than the control mice. The lymphoid follicles and germinal centers from infected IRAK4^{-/-} mice were significantly smaller. We consistently found that IRAK4^{-/-} mice showed a defect in splenic B cell activation and expansion as well as diminished production of gamma interferon (IFN- γ) by T lymphocytes. The myeloid compartment was also affected. Both the frequency and ability of dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages to produce IL-12 were significantly decreased, and resistance to infection with *Toxoplasma* was rescued by treating IRAK4^{-/-} mice with recombinant IL-12 (rIL-12). Additionally, we report the association of IRAK4 haplotype-tagging single nucleotide polymorphisms (tag-SNPs) with congenital toxoplasmosis in infected individuals (rs1461567 and rs4251513, $P < 0.023$ and $P < 0.045$, respectively). Thus, signaling via IRAK4 is essential for the activation of innate immune cells, development of parasite-specific acquired immunity, and host resistance to infection with *T. gondii*.

Toxoplasma gondii is a ubiquitous intracellular protozoan parasite that infects a broad range of vertebrate hosts, including humans and domestic animals (18). Clinically, toxoplasmosis may be asymptomatic or present signs and symptoms that vary depending on the host's genetic background and immunological status (22, 49) and the type of infective parasite (44). *Toxoplasma* infection in an immunocompetent host is controlled by an effective immune response and causes little or no overt signs of disease. However, in immunocompromised patients or during pregnancy, *T. gondii* may emerge as a serious infection which, if not treated, often leads to mortality (52).

A hallmark of *T. gondii* infection is the induction of a strong Th1-mediated immunity, especially with production of gamma interferon (IFN- γ), which keeps in check the tachyzoites, the rapidly multiplying form of the parasite. The control of tachyzoite replication allows the development of the chronic and asymptomatic stage of disease, which is maintained by the bradyzoite stage of the parasite (10). While the CD4⁺ and CD8⁺ T cells are critical for maintaining chronic toxoplasmosis, innate immunity seems to play an important role in host resistance at the early stages of infection. Activation of the cellular compartment of the innate immune system triggers effector mechanisms that are directly responsible for the control of replication of the intracellular parasites. In addition, cytokines produced by innate immune cells will direct the development of acquired immunity, which is responsible for immune surveillance at later stages of infection (10).

The activation of innate immune cells is achieved through en-

gaging an array of germ line-encoded pattern recognition receptors to detect invariant pathogen motifs (51). During infection with *T. gondii*, the production of interleukin-12 (IL-12) by myeloid cells is induced by the activation of Toll-like receptors (TLRs), which triggers signaling through the adaptor protein MyD88 (9, 31, 43, 55). Following MyD88 association with TLRs, the former recruits IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) (4), IRAK2 (4), IRAK-M (53), and IRAK4 (23, 46) to TLRs through interaction of the death domains (50) of both molecules. Several recent studies using transgenic animals indicated that each IRAK protein has a distinct function (47). Unlike deficiencies in IRAK1 or -M, a deficiency in IRAK4 leads to a serious flaw in the activation of transcription factors (NF- κ B, AP1, cJUN) and the production of several inflammatory cytokines induced by signaling through TLRs (46). In humans, IRAK4 has 460 amino acids, sharing 84% similarity with the murine IRAK4 protein. The role of IRAK4 in the activation of the immune system was

Received 24 April 2012 Returned for modification 5 May 2012

Accepted 20 September 2012

Published ahead of print 1 October 2012

Editor: J. H. Adams

Address correspondence to Ricardo Gazzinelli, ritoga@cpqrr.fiocruz.br.

S.R.B. and M.S.D. contributed equally to this work.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00328-12

demonstrated in a murine model of viral infection (47) and in humans who suffer from recurrent infections with pyogenic bacteria (30, 35, 39).

In the present study, we observed that both activation of innate immunity and development of acquired immunity were highly compromised in IRAK4-deficient mice. In particular, defects in IL-12 production by myeloid cells and IFN- γ production by T cells were shown to be the primary mechanisms responsible for the enhanced susceptibility of IRAK4^{-/-} mice to infection with *T. gondii*. Finally, the relevance of our findings for human disease is highlighted by our findings that two haplotype-tagging single nucleotide polymorphisms (tag-SNPs) in the *IRAK4* gene were significantly associated with congenital toxoplasmosis in humans.

MATERIALS AND METHODS

Mice. IRAK4^{+/-} mice (46) in the C57BL/6 and 129 genetic backgrounds were kept as heterozygote breeders to generate both the homozygote and the heterozygote mice used in our studies. IRAK4^{-/-}, IRAK4^{+/-}, and 129/Ola mice were bred and maintained in microisolators at the Federal University of Minas Gerais and the René Rachou Research Institute. Male mice between 8 and 12 weeks of age were used in all experiments. All procedures were conducted according to institutional guidelines for animal ethics.

Antibodies. I-A/I-E-biotin (2G9), I-A/I-E-allophycocyanin (APC) (M5/114.15.2), CD86-PECy7 (IT2.2), NK1.1-fluorescein isothiocyanate (FITC) (PK136), CD3-PerCP5.5 (145-2C11), CD19-FITC (1D3), CD69-phycoerythrin (PE) (H1.2F3), CD8-PECy7 (53-6.7), CD62L-APC (MEL-14), FC Block, IL-12-PE (C17.8), TNF- α -PECy7 (TN3-19), IFN- γ -PE (XMG1.2), and Ki67-PerCP5.5 (20Raj1) were from BD Pharmingen, CD19-APC-eFluor780 (1D3), CD86-APC (B7-2), CD11c-Alexa 700 (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) were from eBioscience, and streptavidin-QD605 (Q10101MP) was from Invitrogen.

Parasites, soluble *Toxoplasma* antigen, and experimental infections. Infective cysts of the ME49 strain were obtained from the brain tissue of Swiss mice at 30 to 40 days postinfection. Soluble *T. gondii* antigen (STAg) was obtained from tachyzoites of the RH strain of *T. gondii*, which is maintained in Swiss mice by passage at regular periods of 48 to 72 h. Briefly, a parasite suspension obtained from the peritoneal cavity was sonicated and centrifuged, the supernatant was collected, and the protein content was determined by the Bradford method (15). For our experiments, mice were infected orally with 0.1 ml of brain homogenates adjusted to contain 20 cysts and either monitored for mortality/morbidity for 30 days or euthanized at days 7, 9, or 20 to 30 (for cyst counts) after infection, when their blood, brains, lungs, livers, and spleens were collected. Morbidity was assessed based on the clinical parameters that we scored as follows: bright and active (0), ruffled coat (1), 10% weight loss (2), hunched, tottering gait, staring, stiff coat (3), reluctance to move and 20% weight loss (4), and death (5).

In vivo treatment with rIL-12. The IRAK4^{-/-} mice were challenged orally with the ME49 strain and treated daily with intraperitoneal injections of rIL-12 (150 ng/mouse) (eBioscience) for 7 days beginning on day 1 postinfection. As controls, IRAK4^{+/-} mice were infected and received phosphate-buffered saline (PBS) on an identical schedule (40).

Quantitative real-time PCR. Spleens and livers were harvested from the mice at 7 or 9 days after infection and frozen in liquid nitrogen. Total DNA was extracted using the phenol-chloroform protocol and quantified by UV spectrophotometry (NanoDrop spectrophotometer; Thermo Scientific). Quantitative PCRs were setup in a final volume of 20 μ l containing 25 ng of total tissue DNA, 10 ng of each primer, and 1 \times iQ SYBR green supermix (Bio-Rad) and performed on a 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). The results are expressed in pg of parasite DNA per 25 ng of tissue DNA. The primers used for amplification of the *T. gondii*

B1 gene were 5'-CTGGCAAATACAGGTGAAATG-3' (forward) and 5'-GTGTAAGTGCAGAAAATGAATCC-3' (reverse) (31).

Histopathology. Brains, lungs, livers, and spleens were fixed with 10% buffered formaldehyde and processed for paraffin embedding. Tissue sections were cut with a microtome and stained with hematoxylin and eosin or Giemsa stain. The histological aspects of parenchyma tissue were evaluated for inflammation (endothelial reactivity, perivascular cell infiltration and necrosis) and parasitism (tissue cysts) by light microscopy. Morphometric aspects of the spleen, such as the diameter of the follicle and the germinal center, were evaluated using the program KS 300 (Zeiss, Germany).

Isolation of splenic leukocytes. Spleens from control and infected mice were incubated with 0.4 mg/ml Liberase CI solution (Roche Biochemicals) for 30 min at 37°C. Single-cell suspensions were then passed through a 100- μ m nylon cell strainer. Erythrocytes were then lysed and splenocytes were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 40 mg gentamicin sulfate and 10% fetal bovine serum (Gibco). Cells were then cultured for 48 h in 96-well plates in the presence or the absence of exogenous stimuli for cytokine measurement with a flow cytometer.

Cytokine measurements. Cytokine levels were assessed in the supernatants of splenocyte cultures and serum samples harvested from IRAK4^{-/-} and IRAK4^{+/-} mice at 7 days postinfection with the ME49 strain of *T. gondii*. IL-12p70 levels were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (eBioscience), and the IFN- γ , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-10, IL-6, and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) levels were determined using the BD cytometric bead array mouse inflammation kit according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry. To analyze the phenotype of splenocyte subpopulations, cell suspensions were stained with monoclonal antibodies specific for cell surface markers or cytokines. Two million freshly isolated splenocytes were analyzed for surface markers expressed by dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, and CD4, CD8, B, and NK cells. To assess cytokine production by DCs and macrophage/monocytes, splenic cells were cultured in the presence of brefeldin A (GolgiPlug protein transport inhibitor; BD Biosciences, San Jose, CA) for 6 h at 37°C in 5% CO₂ with lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml), STAg (5 μ g/ml), or medium alone. To assess T lymphocytes and NK cells, 1 \times 10⁶ splenic cells were cultured for 20 h in the presence of STAg (5 μ g/ml), anti-CD3 (1 μ g/ml), or medium alone. Brefeldin A was added to the cultures in the last 12 h before staining. To assess B cells, 1 \times 10⁶ splenic cells were analyzed without stimulus. Cell suspensions were then washed and stained with different combinations of the antibodies described above. Cell suspensions were then washed, fixed, and permeabilized for the intracellular cytokine or proliferation marker staining (anti-IL-12p40, anti-TNF- α , anti-IFN- γ , or Ki67) according to the manufacturer's instructions. Finally, the cells were suspended in 200 μ l of 2% paraformaldehyde, and the data were collected in an LSR II with Diva (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR) v 8.8.6 software.

Families studied and their evaluations. Since 1981, persons with congenital toxoplasmosis and their families have participated in a longitudinal study of congenital toxoplasmosis, which takes place across their lifetimes (27–29, 32, 36, 42). Enrollment begins when children are first diagnosed, which can be as early as at the time of birth (or in some cases *in utero*). They are then reexamined at 1, 3.5, 5, 7.5, 10, 15, and \geq 20 years of age (27–29, 32, 36, 42). Serologic testing is performed in the Remington U.S. Reference Laboratory at the Palo Alto Medical Foundation-Stanford University or at the Institut de Puericulture in Paris, France (for U.S. expatriate families who returned from France to the United States). A general pediatric evaluation, ophthalmologic, neurologic, and hearing testing, developmental pediatric standardized testing according to a pre-specified protocol, and a hematologic examination were performed for every child at birth and at each follow-up visit. Full fundus retinal photographs, optical coherence tomography (OCT), and visual fields were obtained for children who were at the age or cognitive capacity appropriate

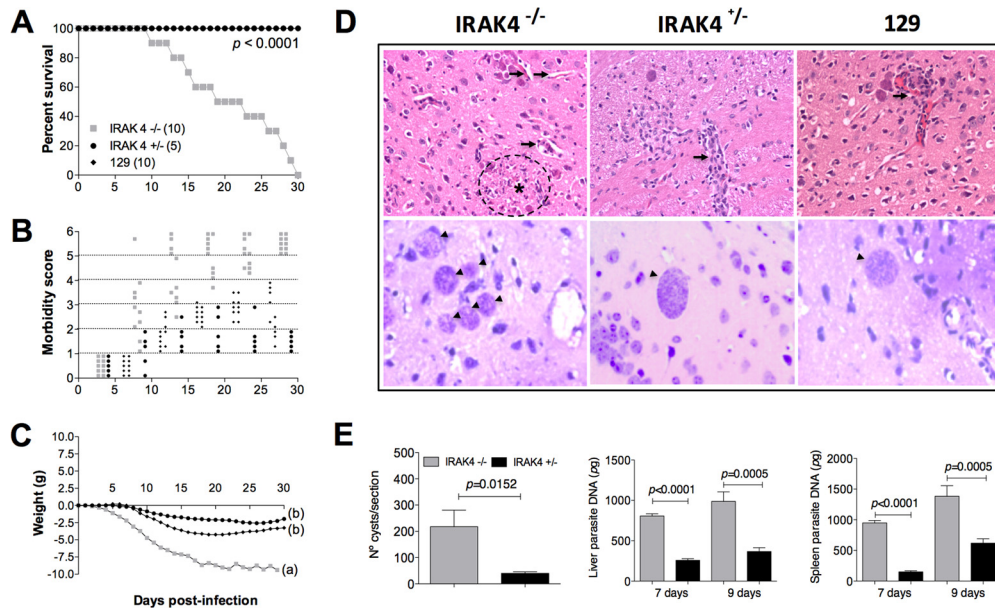


FIG 1 IRAK4 mediates control of parasite replication and influences disease outcome during primary infection with *Toxoplasma gondii*. Groups of IRAK4^{-/-}, IRAK4^{+/-}, and 129/Ola mice were orally infected with 20 cysts of the ME49 strain. Mortality (A), morbidity (B), and weight loss (C) (different letters in parentheses indicate P of < 0.0001) were assessed for 30 days after infection. Numbers within the parentheses indicate the number of animals used in the experiment shown in panels A and C. In panel B, each dot at one time point corresponds to one animal. Morbidity was scored as follows: bright and active, 0; ruffled coat, 1, 10% weight loss, 2, hunched, tottering gait, staring, stiff coat, 3; reluctance to move and 20% weight loss, 4, and death, 5. Data are representative of two independent experiments that yielded similar results. (D) Tissue cysts in IRAK4^{-/-} (left panels), IRAK4^{+/-} (middle panels), and 129 (right panels) mice are indicated with black arrowheads. Black arrows indicate the absence or presence of perivascular inflammatory infiltrates in IRAK4^{-/-}, IRAK4^{+/-}, and 129 mice. The asterisk indicates an area of moderate necrosis in the brain tissue of IRAK4^{-/-} mice. (E) Cyst counts in histological sections of the brain from IRAK4^{-/-} and IRAK4^{+/-} mice infected with *T. gondii* (left) and quantification of parasite DNA in the livers and spleens of IRAK4^{-/-} (middle) and IRAK4^{+/-} (right) mice at 7 and 9 days after infection. The presented results are an average of data from eight mice per group, and the P values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three times with similar results.

for cooperation with such testing. A computed tomographic brain scan was obtained for every infant at birth or at the time of diagnosis for other congenitally infected persons (27–29, 32, 36, 42). Of the 179 infected children who were genotyped for this study, 124 (83%) had clinically confirmed brain calcifications with or without hydrocephalus and/or retinal lesions at birth or the time of diagnosis. This study was performed by the National Collaborative Chicago-Based Congenital Toxoplasmosis Study (NCCCTS) Group (27–29, 32, 36, 42). Physician and scientists who conducted these evaluations in the NCCCTS are listed in Acknowledgments. All procedures were performed in person, in accordance with institutional and NIH guidelines, and with informed consent from parents or legal guardians and adult congenitally infected persons.

Genotyping of human IRAK4. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 179 children and their parent or parents were cryopreserved in liquid nitrogen at -135°C until placed in buffer for DNA extraction (38). This DNA was genotyped for 7 tag-SNPs distributed throughout the *IRAK4* gene. The tag-SNPs were selected from the Hap-Map project (<http://www.hapmap.org>) using a 10-kb flanking sequence on each side of the *IRAK4* gene, a minor allele frequency (MAF) cutoff of 5% in the European cohort (CEU), and an r^2 threshold of 0.8. The Tagger tool within Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) was used to select tag-SNPs. Allelic association analyses were performed for the 124 children with confirmed clinical findings in the eye and/or brain using UNPHASED (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased>).

Statistical analyses. For the studies of mice, the cumulative mortality rate in the experimental groups was analyzed using the log rank test. The differences between groups were verified using the t test or the Mann-Whitney test for parametric or nonparametric data, respectively. All tests were performed using GraphPad Prism (v 5.0) (GraphPad Software Inc.,

La Jolla, CA), and differences were considered statistically significant when the P values were < 0.05. For genetic studies of humans, allelic association analyses were performed using a conventional transmission disequilibrium test (TDT). Linkage disequilibrium (LD) is the nonrandom association of alleles at two or more loci. It is an approximation for the existence of historical recombination between two loci. The P values were calculated using Haploview (<http://www.broadinstitute.org/haploview>). For association with disease, P values of 0.05 or less were considered significant.

RESULTS

Functional IRAK4 mediates the control of parasite replication during primary infection in mice. To evaluate the role of IRAK4 during *T. gondii* infection, IRAK4^{-/-}, IRAK4^{+/-}, and wild-type (WT) 129 mice were orally infected with 20 cysts of the ME49 strain. Animals were evaluated for up to 30 days postinfection. Mortality of the infected IRAK4^{-/-} mice was detected as early as 10 days, reaching 100% by 30 days postinfection. In contrast, no death was observed in either the heterozygous or 129 animals (Fig. 1A). Heterozygote and WT mice showed signs of morbidity classified as mild to moderate, which resolved by 2 to 3 weeks of infection. In contrast, IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii* showed severe signs of morbidity, including neurological symptoms indicating cerebral commitment and weight loss (Fig. 1B and C). Since the IRAK4^{-/-} mice are in the C57BL/6 and 129/Ola genetic background and not fully backcrossed, we used IRAK4^{+/-} littermates as controls in most experiments, as indicated in the figure legends. Importantly, for all experiments in which we used

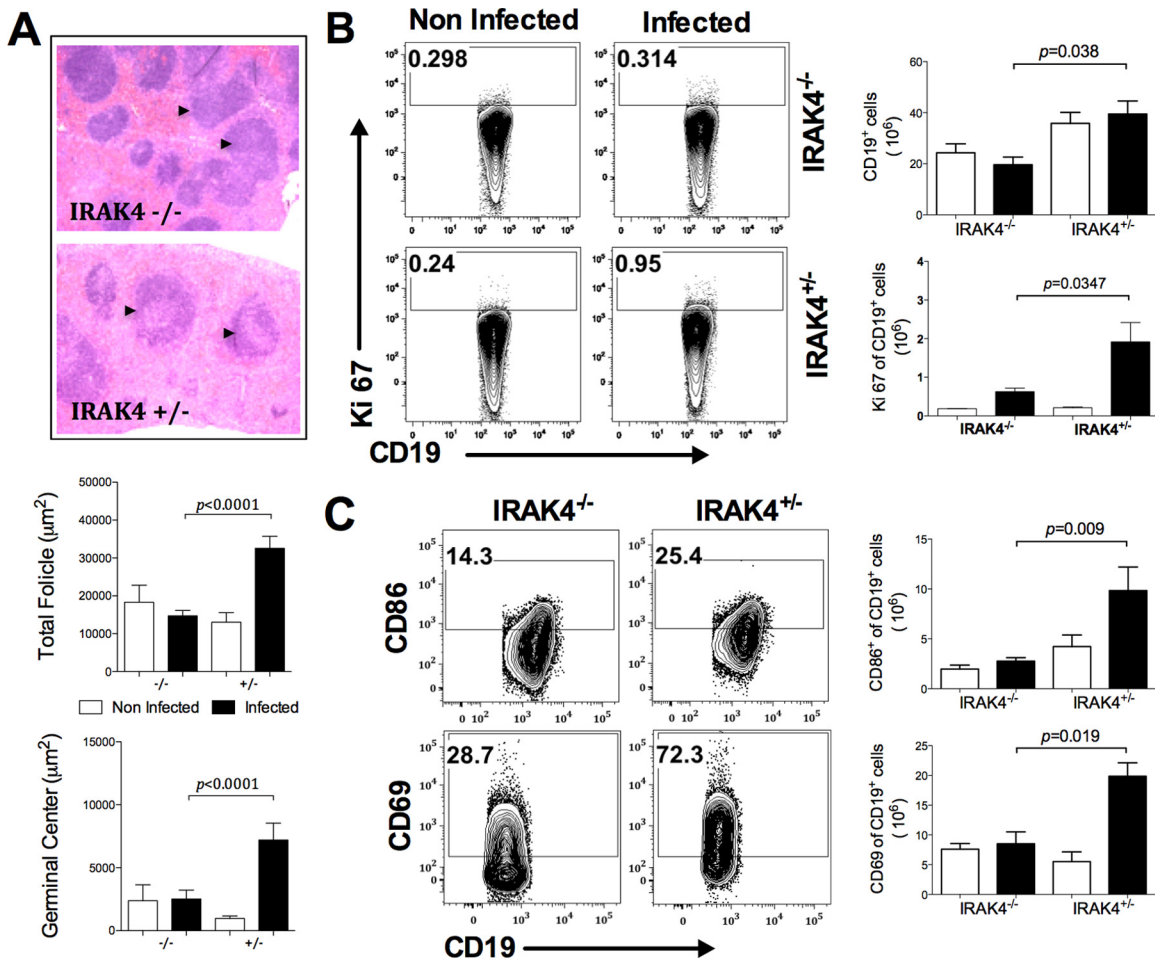


FIG 2 Altered structures of follicles and germinal centers in the spleens of IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii*. (A) Spleens from mice at 7 days postinfection were removed and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation. Black arrowheads indicate activated and nonactivated germinal centers in spleens from IRAK4^{-/-} (upper panel) and IRAK4^{+/-} (bottom panel) mice, respectively. Bar graphs show the quantification of follicles and germinal center areas in spleens from IRAK4^{-/-} and IRAK4^{+/-} mice. (B) Dot plot graphs (frequency) and bar graphs (absolute number) show B cells in proliferation (CD19⁺ Ki67⁺) from IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice (left and bottom right graphs). (C) The contour plots on the left and the graphs show, respectively, the frequency and total numbers of activated (i.e., CD86⁺ or CD69⁺) B lymphocytes (CD19⁺). The results from uninfected and infected mice are represented with white and black bars, respectively. The presented results are an average of data from four mice per group, and the *P* values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three (A) or two (B and C) times with similar results.

two parallel groups, the parasitological and immunological tests were similar when we compared 129 and IRAK4^{+/-} mice infected with *T. gondii* (data not shown).

Additionally, to assess whether the clinical signs of diseases and lethality in IRAK4^{-/-} mice were due to an uncontrolled parasite replication, we analyzed the tissue parasitism in IRAK4^{-/-}, IRAK4^{+/-}, and WT mice. Brains of animals infected for more than 20 days were harvested, tissue sections were stained with Giemsa, and cysts were quantified. The brains of IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii* showed significantly higher cyst counts than those of the control groups (IRAK4^{+/-} and 129 mice) (Fig. 1D and E). Additionally, IRAK4^{-/-} mice showed numerous foci of necrosis in the central nervous system (CNS), always associated with parasitic cysts, while the IRAK4^{+/-} and 129 mice had few necrotic foci, which were not associated with parasites. Nevertheless, heterozygote and 129 animals showed moderate inflammatory infiltrates with foci of perivascular inflammation, suggesting an effective inflammatory response, which effectively controlled parasite expansion in the CNS of both IRAK4^{+/-} and WT mice.

Spleens and livers were harvested 7 and 9 days postinfection for parasitism evaluation by real-time PCR (RT-PCR). *T. gondii* DNA levels were greater in both the spleens and the livers of IRAK4^{-/-} mice than in heterozygote mice (Fig. 1E). These results indicate that control of tachyzoite replication and tissue parasitism during primary infection, and therefore host resistance to *T. gondii* infection, is dependent on functional IRAK4.

Defective expansion of splenic B lymphocytes in IRAK4-deficient mice. When examined at 7 days after infection, the spleens from IRAK4^{-/-} mice showed an altered structure. The areas of follicles and germinal centers from infected IRAK4^{-/-} mice, but not in uninfected animals, were relatively smaller than in IRAK4^{+/-} mice, with little cellular infiltration and scant lymphocytic halo (Fig. 2A), suggesting that both lymphoid and myeloid cells were less active in this organ during *T. gondii* infection. As expected, the total number of B cells was significantly lower in IRAK4^{-/-} mice than in IRAK4^{+/-} mice (Fig. 2B, bar graphs). The frequency of activated B cells, as assessed by CD86 and CD69 expression, was consistently significantly decreased in IRAK4^{-/-}

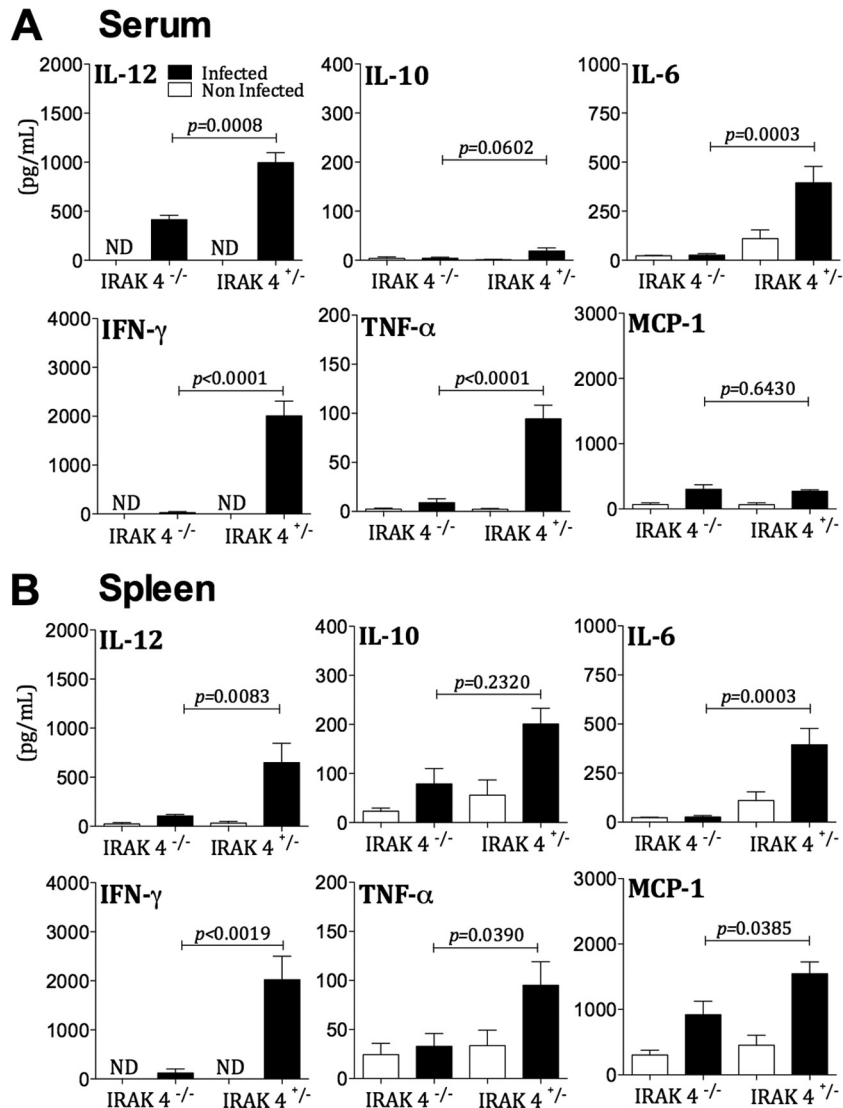


FIG 3 Impaired cytokine response in IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii*. IRAK4^{-/-} and IRAK4^{+/-} mice were orally infected with the ME49 strain of *T. gondii*. (A) The levels of cytokines in serum were evaluated at 7 days postinfection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and cytometric bead array (CBA). The *P* values were calculated for a 95% confidence interval. (B) Splenocytes from IRAK4^{-/-} and IRAK4^{+/-} mice were harvested at 7 days postinfection and cultured for 48 h without the addition of exogenous stimuli. Cytokine levels were measured in the supernatants by ELISA and CBA. The results of uninfected and infected mice are represented in white and black, respectively. The presented results are an average of data from eight mice per group, and the *P* values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three times with similar results.

mice compared to that in the heterozygote mice infected with *T. gondii* (Fig. 2C). To confirm that the observed changes in the germinal centers were, at least in part, due to the altered proliferation of B cells, we also analyzed the expression of the cell cycle marker Ki67 (interphase stage). We observed that upon infection with *T. gondii*, the number of Ki67-expressing B lymphocytes was dramatically increased in IRAK4^{+/-} mice but not in IRAK4^{-/-} mice (Fig. 2B).

Impaired production of proinflammatory cytokines in IRAK4-deficient mice infected with *T. gondii*. Cytokines such as IL-12, IFN-γ, and TNF-α play an important role in host resistance to *T. gondii* infection. Thus, we assessed the cytokine production by cells from IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii*. Sera were collected from mice at 7 days postinfection. Spleens were also harvested, and splenocytes were cultured for 48 h. IRAK4^{-/-} an-

imals infected with *T. gondii* displayed impaired IL-12, IFN-γ, and TNF-α production. These lower levels of cytokines were observed in both the sera (Fig. 3A) and supernatants of splenocyte cultures (Fig. 3B). The levels of IL-10 and MCP-1 (CCL2) were also significantly lower in the supernatant of cultures of spleen cells derived from infected IRAK4^{-/-} mice.

Altered distribution and impaired cytokine production by myeloid cells from IRAK4-deficient mice challenged with *T. gondii*. We next asked whether the deficiency of IRAK4 is associated with changes in myeloid effector cell compartments. To investigate this, we assessed monocyte/macrophage subpopulations and DCs in the spleens of infected mice. Monocyte/macrophage subpopulations were defined by the expression of F4/80, which is a specific marker for monocytes/macrophages, and CD11b and GR1 (Fig. 4A and B). Moreover, all these subpopulations express

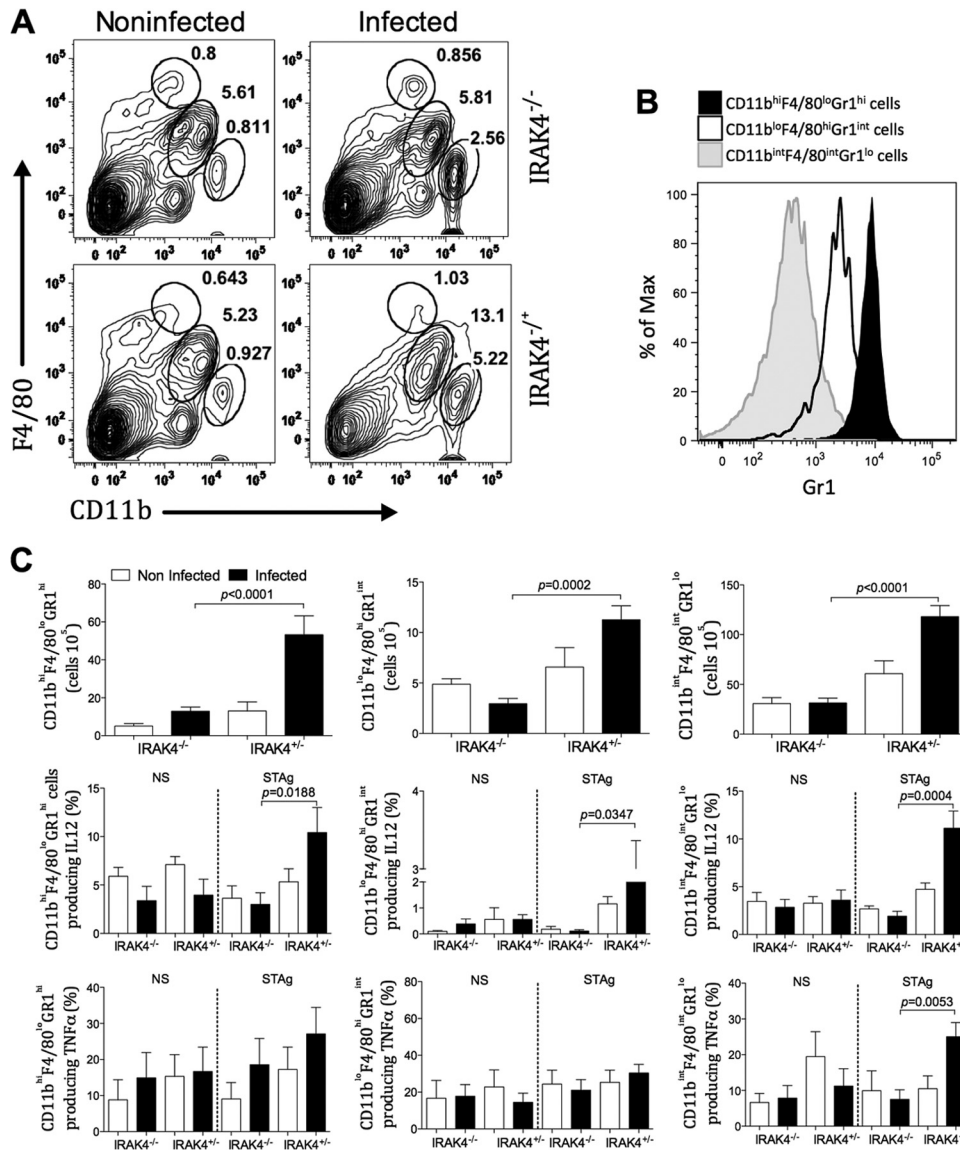


FIG 4 IRAK4-dependent IL-12 and TNF- α production by macrophages from mice infected with *T. gondii*. Macrophages of IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice were analyzed at 7 days after infection with *T. gondii*. Representative dot plots of the frequency (A) and bar graphs (C, top graphs) showing the average number of different subsets of myeloid cells in spleens from IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice, based on the levels of F4/80, CD11b, and Gr1 expression (B). The percentages of CD11b^{hi} F4/80^{lo} Gr1^{hi}, CD11b^{lo} F4/80^{hi} Gr1^{int}, and CD11b^{int} F4/80^{int} Gr1^{lo} cells producing IL-12 and TNF- α are shown in panel C (middle and bottom graphs, respectively). The results of uninfected and infected mice are represented by white and black bars, respectively. The presented results are an average of data from four mice per group, and the *P* values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three times with similar results. NS, not stimulated.

major histocompatibility complex (MHC) class II, which is not expressed by neutrophils. A very small population (less than 1%) of neutrophils (F4/80⁻ CD11b⁺ Gr1⁺ MHCII⁻) is seen in spleens from mice infected with *T. gondii*. This was also confirmed by histological analysis of the spleens from heterozygote and IRAK4 knockout mice (data not shown). Notably, IRAK4^{-/-} mice displayed a lower frequency of F4/80⁺ cells than the IRAK4^{+/-} mice. The absolute number of all three different macrophage/monocyte subsets (F4/80^{hi} CD11b^{lo} Gr1^{lo}, F4/80^{int} CD11b^{int} Gr1^{lo}, and F4/80^{lo} CD11b^{hi} Gr1^{hi} cells, where the superscript “hi,” “lo,” and “int” indicate high, low, and intermediate levels of expression, respectively) were decreased in the IRAK4^{-/-}

mice compared with the IRAK4^{+/-} mice infected with *T. gondii* (Fig. 4C). However, the frequency of monocytes/macrophages producing IL-12 or TNF- α when stimulated with STAg was higher in IRAK4^{+/-} mice than in the IRAK4^{-/-} animals (Fig. 4C). Among the macrophages/monocytes, the F4/80^{int} CD11b^{int} Gr1^{lo} cells were the main source of IL-12, followed by the F4/80^{hi} CD11b^{lo} Gr1^{hi} subset, whereas the production of TNF- α was induced in only the F4/80^{int} CD11b^{int} Gr1^{lo} subpopulation in the IRAK4^{+/-} mice compared to uninfected controls (Fig. 4C).

Higher absolute numbers of CD11c⁺ MHCII^{hi} cells were found in IRAK4^{+/-} mice than in IRAK4^{-/-} mice. Upon *T. gondii* infection, IRAK4^{-/-} mice displayed a lower frequency of IL-12-

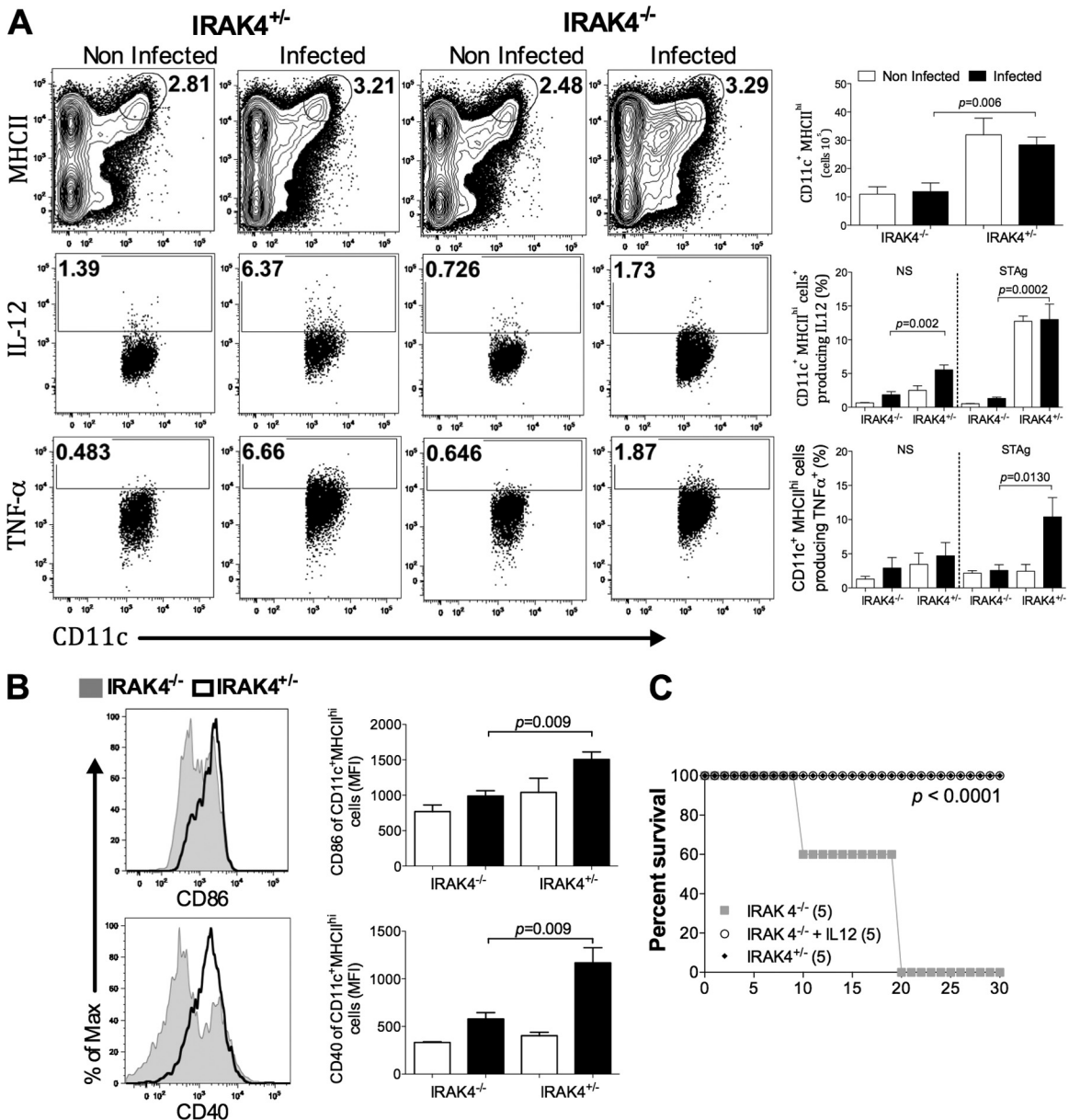


FIG 5 IRAK4-dependent production of IL-12 by dendritic cells from mice infected with *T. gondii*. Dendritic cells (DCs) were analyzed 7 days after infection with *T. gondii*. (A) Representative dot plots (top graphs) show the frequency of DCs (CD11⁺, MHC-II^{hi}) in spleens from IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice. Representative dot plots of the frequency of DCs producing IL-12 or TNF-α are shown in the middle and bottom graphs. Bar graphs showing the average number of DCs (CD11⁺, MHC-II^{hi}) (top right graph) and the frequency of DCs producing IL-12 (middle right graph) or TNF-α (bottom-right graph) in spleens from IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice. (B) The expression (median fluorescence intensity [MFI]) of activation of the markers CD86 and CD40. (C) Survival curve of the deficient mice treated with recombinant IL-12 or not treated during 7 days of *T. gondii* infection. The results for uninfected and infected mice are represented by the white and black bars, respectively. The presented results are an average of data from four mice per group, and the *P* values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three (A and B) or two (C) times with similar results.

producing DCs than IRAK4^{+/-} mice even in the absence of STAg stimulation. Production of both IL-12 and TNF-α by DCs was enhanced upon STAg stimulation (Fig. 5A). In addition, when the expression of CD86 and CD40 was assessed, the IRAK4-deficient mice showed lower levels of both activation markers on DCs than heterozygote mice (Fig. 5B). Hence, our results indicate a failure of activation of the DCs from IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii* (Fig. 5B). To evaluate the importance of the impairment of IL-12 production by DCs, IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii*

were treated daily beginning at day 1 postinfection. As expected, IRAK4^{-/-} mice treated with rIL-12 became resistant to infection (Fig. 5C), and all mice survived over 30 days after challenge with the ME49 strain of *T. gondii*.

Impaired Th1-mediated immune responses in IRAK4-deficient mice infected with *T. gondii*. Since the activation of antigen-presenting cells was diminished in IRAK4-deficient mice, we next asked whether the T cell responses were also impaired. Our results showed that the total number of CD4⁺, but not

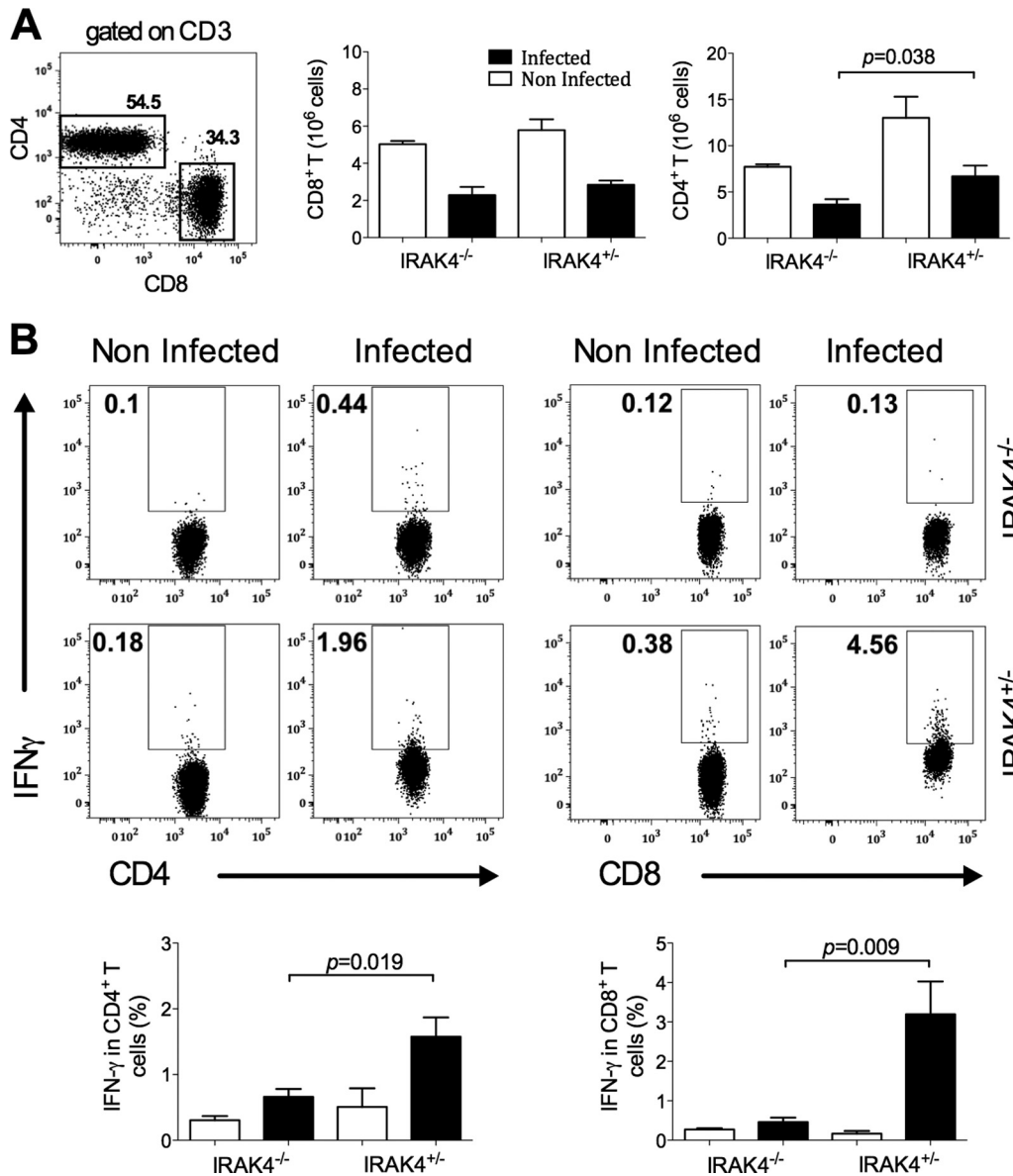


FIG 6 Impairment of the cell number and IFN- γ -producing T cells in IRAK4-deficient mice. (A) Representative dot plot on the left shows the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, within the CD3⁺ lymphocytes. Bar graphs on the right show the absolute number of CD4⁺ T as well as CD8⁺ T lymphocytes from IRAK4^{+/-} and IRAK4^{-/-} mice infected or not infected with *T. gondii*. (B) Dot plots illustrating the IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes stimulated with STAg from IRAK4^{-/-} mice (lower panels) compared to IRAK4^{+/-} mice (upper panels) infected with *T. gondii*. Bar graphs show the frequency of IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes cultured with STAg. The presented results are an average of data from four mice per group, and the *P* values were calculated for a 95% confidence interval. The experiments were repeated three times with similar results.

CD8⁺ T lymphocytes was significantly lower in the knockout mice than in the IRAK4^{+/-} mice (Fig. 6A). Importantly, the frequencies of IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were decreased in IRAK4^{-/-} mice compared to IRAK4^{+/-} mice upon STAg stimulation (Fig. 6B). Altogether, our results indicate that the decreased production of IL-12 by macrophages and DCs leads to a consequent impairment in the IFN- γ production by T cells, and it is likely to be the primary mechanism responsible for enhanced susceptibility of IRAK4^{-/-} mice to *T. gondii* infection.

Human congenital toxoplasmosis associates with IRAK4 SNPs. In humans, congenital toxoplasmosis is a serious disease

which threatens sight, cognition, and life. It was therefore of interest to study whether there is an association of IRAK4 with congenital toxoplasmosis. Seven tag-SNPs in the *IRAK4* gene were studied. The 7 SNPs were rs4251545, rs1057190, rs4251580, rs4251513, rs1461567, rs4251520, and rs17121283. The frequency of the SNP variants were tested in the North American cohort of patient parent trios for 124 congenitally infected persons. We used an *r*² threshold of 0.8. SNPs with a call rate of >90% and in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in parents were kept for further analysis. Among the tested SNPs, rs1461567 and rs4251513 were associated with congenital toxoplasmosis (*P* < 0.023 and *P* < 0.045, respectively) (Fig. 7). An etiological variant of SNPs in



FIG 7 Association of SNPs in the *IRAK4* gene with human congenital toxoplasmosis. The upper diagram shows the positions of genotyped SNPs relative to the intron/exon structure of the gene. The lower diagram shows the LD plots generated in Haploview using *IRAK4* gene data from our North American patient cohort. LD values ($D' \times 100$) between markers are indicated at the intersection of the 2 markers on the matrix. Where there is no value, $D' = 1$ (i.e., 100). In outlining gene SNP association with susceptibility to congenital toxoplasmosis, D' values between loci were calculated and displayed using Haploview. When there is high confidence in the value of D' (logarithm of the odds score, >2), pink and red are used. If the confidence is lower (logarithm of the odds score, <2), blue shading ($D' = 1$) or no shading ($D' < 1$) is used.

strong LD with these markers could account for observed associations with susceptibility to this congenital disease.

DISCUSSION

The key features of infection with *T. gondii* are the strong activation of innate immunity and the development of a solid antigen-specific T cell-mediated immune response (10). Among the innate immune receptors, TLRs are prominent in the recognition of protozoan molecular patterns (14). The activation of all TLRs (except TLR3) sequentially triggers the adaptor molecule MyD88, the downstream kinase IRAK4, and the transcription factor NF- κ B, culminating in the production of proinflammatory cytokines (46) that are essential for the development of acquired immunity and host resistance to *T. gondii*. Hence, the strongest data suggesting that TLRs are important in host resistance to toxoplasmosis are those obtained in studies demonstrating that MyD88^{-/-} mice have an impaired production of IL-12 and IFN- γ , enhanced parasitism, and accelerated mortality (7, 9, 31, 43, 45).

Similar to the MyD88^{-/-} mice, IRAK4-deficient mice had a dramatic increase of parasitism in the spleen, liver, and brain, as well as accelerated mortality, that was associated with impaired production

of the proinflammatory cytokines IL-12, TNF- α , and IFN- γ . IRAK4 also mediates the function of the IL-1 and IL-18 receptors. However, the *IL-1R* and the *IL-18* knockout mice are not more susceptible to *T. gondii* infection (19). Thus, the most likely explanation for the impaired response of IRAK4^{-/-} macrophages is the disrupted signaling triggered by TLRs exposed to *T. gondii* components. Indeed, a defective release of nitrogen radical intermediates by IRAK4^{-/-} macrophages exposed to *T. gondii*-derived heat shock protein 70 (HSP70), which is a TLR4 agonist, has been reported (34). In addition, studies performed in our laboratory have shown that glycosylphosphatidylinositol anchors extracted from *T. gondii* tachyzoites activate TLR2 and TLR4 (9). However, deficiencies in TLR2 and TLR4 had no major impact on mouse resistance to *T. gondii* infection (9). On the other hand, TLR11, the counterpart receptor for a profilin-like protein from *T. gondii*, was shown to mediate IL-12 production by DCs, and its deficiency results in enhanced susceptibility to infection (41, 55). TLR9 was also shown to mediate inflammation in peroral infection with *T. gondii* (33). Notably, we reported that 3d mice are extremely susceptible to infection with *T. gondii* (31). The 3d mice have a missense allele in the *UNC93B1* gene, which results in nonfunctional TLR3, TLR7, TLR9, and TLR11 (6, 50). Thus, our results indicate that

in addition of TLR11, the nucleic acid-sensing TLRs have a fundamental role in host resistance to *Toxoplasma* infection.

The activation of DCs through TLRs not only induces cytokine secretion but also enhances their capacity to prime naïve pathogen-specific T cells, providing signals (costimulatory molecules) that are important for the development of Th1 cells during protozoan infection (14, 51). It has been consistently shown that, as opposed to DCs from infected heterozygote mice, the expression of costimulatory molecules (i.e., CD86 and CD40) as well as IL-12 was not augmented in DCs from IRAK4^{-/-} mice. Our *in vivo* results contrast with the ones obtained *in vitro* by Aosai and colleagues (2), who reported that DC maturation induced by *T. gondii*-derived Hsp70 was mediated by TLR4 but independent of the MyD88 pathway. The defective DCs in infected IRAK4^{-/-} mice are of special interest, because impaired IL-12 production results in diminished IFN- γ production by T lymphocytes and enhanced susceptibility to *T. gondii* (16, 25, 26, 43, 48, 54). Indeed, treatment with rIL-12 rescued resistance of IRAK4-deficient mice to experimental infection with *T. gondii*.

It was also noticeable that the frequency of monocytes/macrophages (CD11b^{hi} F4/80^{lo} GR1^{hi}) that is increased in control mice infected with *T. gondii* was not observed in the spleens from IRAK4^{-/-} mice. In addition to contributing as a source of IL-12, inflammatory monocytes are essential as effector cells for controlling parasite replication *in vivo* (12). The decreased frequencies of monocytes/macrophages observed in IRAK4^{-/-} mice infected with *T. gondii* can be explained based on the impaired production of MCP-1 (CCL2) by splenocytes from IRAK4-deficient mice, as this chemokine is of critical importance for the recruitment of inflammatory monocytes (1, 11).

IRAK4 deficiency is also associated with an altered function of T and B lymphocytes (21, 39). As previously reported, upon infection with *T. gondii*, the total number of T cell subsets was decreased (3, 17, 24). This was observed in both heterozygote and IRAK4^{-/-} mice. Nevertheless, a major defect was observed in terms of IFN- γ production by both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from IRAK4-deficient mice. A likely explanation for these findings is the impaired expression of costimulatory molecules and IL-12 by dendritic cells from IRAK4^{-/-} mice, which culminates in less-effective priming and differentiation of CD4⁺ T lymphocytes. We also found a major defect in the activation and expansion of B lymphocytes. To begin with, both the total areas of the follicles and the sizes of germinal centers were dramatically decreased in the spleens of infected IRAK4^{-/-} mice. This was associated with a significant decrease in the number of activated B cells expressing CD86 as well as CD69. TLR activation, either directly on B lymphocytes (20) or on follicular dendritic cells (13), is critical for the activity of germinal centers. This defective activation and expansion of B lymphocytes can be also explained by the impaired CD4⁺ T cell responses observed in the IRAK4-deficient mice.

Importantly, the expression of nonfunctional IRAK4 in humans results in recurrent life-threatening infections (5, 30). Mutations found in the *IRAK4* gene impair the innate and acquired immune responses to microbial TLR ligands and various pathogens of clinical relevance (8, 21, 39). Recent studies have associated the presence of clinical outcomes of congenital and/or acquired toxoplasmosis, in particular the development of retinochoroiditis, with genes related to the innate immunity. Thus, we also investigated whether polymorphisms in the *IRAK4* gene would associate with the sequelae of congenital toxoplasmosis in humans. In fact, we found evidence of the

association of two tag-SNPs (i.e., rs1461567 and rs4251513) distributed in the *IRAK4* gene with brain and ocular alterations in congenital toxoplasmosis. Taken together, the associations of SNPs in *TLR9* with retinochoroiditis (37) and in *IRAK4* with congenital toxoplasmosis support the hypothesis that TLRs are critical in mediating resistance to *T. gondii* infection in humans.

In conclusion, innate immunity plays a major role in host resistance to infection with *T. gondii* in naïve hosts. This is highly relevant to congenital toxoplasmosis, which is mainly transmitted from nonimmune pregnant women to the fetus during primary infection. The results presented here indicate that IRAK4 plays critical roles in the activation and function of splenic dendritic cells and macrophages. As a consequence, it is essential for the development of acquired immunity; thus, it is an important determinant for host resistance to primary infection with *T. gondii* and the clinical outcome of congenital disease in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the National Institutes of Health (grants R01 AI071319-01, R01 AI027530-18, and R01 AI05042) and the National Institute of Science and Technology for Vaccines (INCTV/CNPq/FAPEMIG).

We gratefully acknowledge D. Golenbock for comments and suggestions during the development of this study, the members of the NCCCTS who performed serologic testing and obtained histories from, examined, and obtained PBMCs from congenitally infected persons, and the patients, their families, and their primary physicians for participating and for permitting us to follow their progress. The NCCCTS physicians and scientists include K. Boyer, S. Withers, A. G. Noble, C. N. Swisher, P. T. Heydemann, P. Rabiah, D. Burrows, M. Mets, P. Latkany, MD, W. Mieler, D. McLone, D. Frimm, J. S. Remington, and D. Patel. We also thank the airlines that provided complimentary transportation to Chicago, the Hyatt Hotel Foundation, which provided complimentary accommodations for the families during their visits to Chicago, and support from the Cornwell, Mann, Rooney-Alden, Taub, Mussilami, Engel, Harris, and Pritzker families.

REFERENCES

1. Antonelli LR, et al. 2010. Intranasal poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J. Clin. Invest.* 120:1674–1682.
2. Aosai F, et al. 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* 11:13–22.
3. Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. 1994. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 62:1995–2001.
4. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. 1996. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271:1128–1131.
5. Cardenas M, et al. 2006. Autosomal recessive interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency in fourth-degree relatives. *J. Pediatr.* 148: 549–551.
6. Casrouge A, et al. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314:308–312.
7. Chen M, et al. 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.* 88:1017–1019.
8. Davidson DJ, et al. 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.* 177:8202–8211.
9. Debierre-Grockieo F, et al. 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 179:1129–1137.
10. Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:569–588.

11. Dunay IR, et al. 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29:306–317.
12. Dunay IR, Fuchs A, Sibley LD. 2010. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.* 78:1564–1570.
13. Garin A, et al. 2010. Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* 33:84–95.
14. Gazzinelli RT, Denkers EY. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 6:895–906.
15. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. 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.* 146:286–292.
16. Gazzinelli RT, et al. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153:2533–2543.
17. Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG. 1996. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J. Immunol.* 156:1476–1481.
18. Hill D, Dubey JP. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8:634–640.
19. Hitziger N, Dellacasa I, Albiger B, Barragan A. 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.* 7:837–848.
20. Hwang IY, Park C, Harrison K, Kehrl JH. 2009. TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J. Exp. Med.* 206:2641–2657.
21. Isnardi I, et al. 2008. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity* 29:746–757.
22. Jamieson SE, et al. 2009. Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:162–169.
23. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:5567–5572.
24. Liesenfeld O, Kosek JC, Suzuki Y. 1997. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65:4682–4689.
25. Liu CH, et al. 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.* 177:31–35.
26. Mashayekhi M, et al. 2011. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35:249–259.
27. McLeod R, et al. 2006. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981–2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin. Infect. Dis.* 42:1383–1394.
28. McLeod R, et al. 1992. Levels of pyrimethamine in sera and cerebrospinal and ventricular fluids from infants treated for congenital toxoplasmosis. *Toxoplasmosis Study Group. Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1040–1048.
29. McLeod R, et al. 1990. Phenotypes and functions of lymphocytes in congenital toxoplasmosis. *J. Lab. Clin. Med.* 116:623–635.
30. Medvedev AE, et al. 2003. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J. Exp. Med.* 198:521–531.
31. Melo MB, et al. 2010. UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 6:e1001071.
32. Mets MB, et al. 1996. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 122:309–324.
33. Minns LA, et al. 2006. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 176:7589–7597.
34. Mun HS, et al. 2005. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infect. Immun.* 73:4634–4642.
35. Oliveira FS, et al. 2011. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 79:4688–4695.
36. Patel DV, et al. 1996. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Radiology* 199:433–440.
37. Peixoto-Rangel AL, et al. 2009. Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:1187–1190.
38. Phan L, et al. 2008. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am. J. Ophthalmol.* 146:375–384.
39. Picard C, et al. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299:2076–2079.
40. Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F. 2011. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 286:3307–3314.
41. Plattner F, et al. 2008. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* 3:77–87.
42. Roizen N, et al. 2006. Impact of visual impairment on measures of cognitive function for children with congenital toxoplasmosis: implications for compensatory intervention strategies. *Pediatrics* 118:e379–e390.
43. Scanga CA, et al. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:5997–6001.
44. Sibley LD, Ajioka JW. 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:329–351.
45. Sukhumavasi W, et al. 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.* 181:3464–3473.
46. Suzuki N, et al. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750–756.
47. Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. 2002. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol.* 23:503–506.
48. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240:516–518.
49. Suzuki Y, et al. 1996. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J. Infect. Dis.* 173:265–268.
50. Tabeta K, et al. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* 7:156–164.
51. Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820.
52. Weiss LM, Dubey JP. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39:895–901.
53. Wesche H, et al. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.* 274:19403–19410.
54. Wilson DC, et al. 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:e1000815.
55. Yarovinsky F, et al. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626–1629.