

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Papel dos Receptores do Tipo Toll endossomais na  
resistência à infecção por *Toxoplasma gondii***

**Warrison Athanásio Coelho de Andrade**

Belo Horizonte

2013

Warrison Athanásio Coelho de Andrade

# **Papel dos Receptores do Tipo Toll endossomais na resistência à infecção por *Toxoplasma gondii***

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

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Coorientador: Dr. Douglas Taylor Golenbock

Belo Horizonte

2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e também de dificuldades, me abençoando e me guiando pelos meus caminhos.

Agradeço aos meus pais, Geraldo e Vera pelo constante apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Apesar de até hoje não entenderem muito bem o que faço, e sempre me perguntarem, “Com o que você trabalha mesmo? E aí, já descobriu a cura de algo?”, nunca deixaram de me apoiar.

Obrigada minhas queridas irmãs Fernanda, Karina e Kenia por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões pessoais e profissionais e me ajudarem a superar todas as dificuldades, e aos meus cunhados André e Marcelo.

Um muito obrigado a minha namorada Klícia, que apesar de reclamar por estar constantemente trabalhando aos fins de semana e as vezes não passarmos tanto tempo juntos, sempre me apoiou, principalmente quando estive fora por dois anos.

Agradeço ao meu Orientador Ricardo Gazzinelli pela amizade, pela ótima relação e por ter me dado à oportunidade de trabalhar em um grande laboratório e confiar em meu trabalho. Agradeço também pela grande oportunidade de trabalhar na Universidade de Massachusetts (UMass), oportunidade esta muito importante para meu crescimento profissional e para realização deste trabalho.

Agradeço ao meu coorientador Douglas Golenbock por me acolher em seu laboratório na UMass e por toda a ajuda com reagentes e principalmente nas discussões sobre o projeto durante os dois anos em que estive lá.

Agradeço também todos os coautores do meu trabalho pela contribuição no projeto, pois sem sua ajuda este trabalho não seria possível. Agradeço principalmente aos meus queridos amigos

Maria do Carmo por toda ajuda, principalmente na parte final do projeto, e a meu amigo Espiridion Martínez pelo ano em que trabalhamos juntos no laboratório, e também quando trabalhamos em casa e nos bares de Worcester tomando uma Tequila ou uma Corona bem gelada, momentos estes também muito importantes para minha formação.

Um muito obrigado a Anna Cerny, Ann Zacharia e Megan Munroe da UMass pela ajuda nos cruzamentos e genotipagem dos camundongos nocautes utilizados nesta tese.

Agradeço aos amigos dos laboratórios da UMass, Bráulia, Bruno Chamber, Bianca, Grace, Bruno Rocha, Rosane, Kamal, Parisa, Kristen, Rahul, Donghai, Jenny, Carolina, Shruti, Brian e Jiaming. Também agradeço as amigos dos Laboratório de Imunoparasitologia e Imunopatologia, Alexandre, Mirinha, Carol, Bia, Luara, Miró, Paula, Guilherme, Polidoro, Leticia, Rafael sofredor, Doro, Brunão, Marco, Flavinha, Genice, Aretha, Iara, Léo, Samantha, Carla(s), Lorena, Clécia, Marina(s), Isabella e Fernanda. Um agradecimento especial a Eneida pelos ótimos 7 anos de convivência.

Um agradecimento especial aos amigos da UFMG e também de fora por todos os momentos de descontração, as conversas de Buteco, as cervejinhas no fim do dia para relaxar após um longo dia de experimentos mal sucedidos, mas principalmente pela amizade.

Um grande abraço também para meus grandes amigos da Galera do Budjorge que sempre estiveram presente nos momentos de descontração, carnavais e churrascos para aliviar o estresse. Apesar de até hoje acharem que vida de estudante de doutorado é a maior moleza, e que o que fazemos não é trabalho, e recebemos para ficar sem fazer nada.

Todos vocês fizeram parte dessa conquista. OBRIGADO!!!

## EPÍGRAFE

A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo.

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.

*Albert Einstein*

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e que pode infectar praticamente todos os vertebrados de sangue quente. Embora os seres humanos são considerados hospedeiros intermediários acidentais, um terço da população humana em todo o mundo está cronicamente infectada com o *Toxoplasma*. Em indivíduos imunocomprometidos, o parasita, normalmente em estado dormente, se torna altamente virulento, causando graves doenças com a encefalite, que pode levar a morte. A ativação rápida do sistema imune inato e consequente produção de citocinas por células mieloides, é necessária para o estabelecimento de uma imunidade protetora à infecção pelo *T. gondii*. Em camundongos, uma mutação no gene *UNC93B1* abole a sinalização através dos Receptores do Tipo Toll (TLRs) 3, 7 e 9, e camundongos 3d, com essa mutação, são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*. Neste trabalho, demonstramos que TLR12, TLR com seu ligante ainda desconhecido, reconhece a proteína profilina de *T. gondii*, e que o reconhecimento da profilina é feito através da formação de heterodímeros entre TLR11 e TLR12. Também demonstramos que além de TLR3, TLR7, TLR9 e TLR11, TLR12 também é um TLR intracelular cuja ativação é mediada por UNC93B1. Ambos RNA e DNA de *T. gondii* induziram ativação de macrófagos e células dendríticas via TLR7 e TLR9, respectivamente. Entretanto, camundongos TLR3, TLR7, TLR9 nocaute ou até mesmo a combinação destes, não apresentaram o mesmo fenótipo dos camundongos 3d. Porém quando infectamos camundongos deficientes em TLR7/TLR9/TLR11, observamos um grande defeito na produção de IL-12/IFN- $\gamma$ , e os mesmos foram altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*. Nossos resultados mostraram que a susceptibilidade dos camundongos 3d à infecção é devida a um defeito na translocação de TLRs endossomais (TLR7/TLR9/TLR11) envolvidos no reconhecimento de moléculas do parasita e na indução de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, e consequente produção de IFN- $\gamma$ . Em relação à infecção humana, o genoma humano não possui os genes de *TLR11* e *TLR12* funcionais, portanto nosso estudo sugere que TLR7, TLR8 e TLR9 são os TLRs chave na toxoplasmose humana.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite belonging to the phylum apicomplexa and can virtually infect all warm-blood vertebrates. Although humans are considered accidental intermediate hosts, one third of the human population in the world is chronically infected with *T. gondii*. In immune-compromised individuals, this normally attenuated parasite becomes highly virulent, causing severe disease and lethality. Early activation of the innate immune system and cytokine production by myeloid cells is required for establishment of protective immunity to *T. gondii* infection. In mice, a mutation in the *UNC93B1* gene abolishes signaling via Toll-like receptors (TLRs) 3, 7 and 9 and those mice, named 3d, are highly susceptible to infection with *T. gondii*. In this work we demonstrated that TLR12, TLR with a yet unknown ligand, recognize *T. gondii* profilin through TLR11/TLR12 heterodimers. We also showed that besides TLR3, TLR7, TLR9 and TLR11, TLR12 is also an intracellular TLR whose function is mediated by UNC93B1. Both *T. gondii* RNA e DNA activate macrophages and dendritic cells via TLR7 and TLR9, respectively. However, mice TLR3, TLR7, TLR9 KO or even the combination of them did not recapitulate the 3d phenotype. When we infected the triple TLR7/TLR9/TLR11 KO mice they had a huge defect in IL-12/IFN- $\gamma$  production and were highly susceptible to *T. gondii* infection. Overall, our results showed that the susceptibility of 3d mice to the infection is due to a defect on the translocation of endosomal TLRs (i.e. TLR7/TLR9/TLR11) involved in the recognition of parasite molecules and induction of IL-12 by dendritic cells and macrophages, and consequent IFN- $\gamma$  production. Regarding human infection, the human genome lacks functional *TLR11* and *TLR12* genes, so our study support the hypothesis that TLR7, TLR8 and TLR9 are the key TLRs in human toxoplasmosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da distribuição da toxoplasmose de acordo com dados coletados entre 1992 e 2009.
- Figura 2.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.
- Figura 3.** Estágios biológicos do *Toxoplasma gondii*.
- Figura 4.** Esquema da sinalização via TLRs.
- Figura 5.** Camundongos 3d são capazes de montar uma resposta imune após vacinação com uma cepa de *T. gondii* atenuada.
- Figura 6.** Camundongos 3d vacinados sobrevivem ao desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*.
- Figura 7.** Células WT e 3d são igualmente infectadas pelo *T. gondii*.
- Figura 8.** Translocação de TLR9 para o endolisossomo após fagocitose do *T. gondii*.
- Figura 9.** Ativação de macrófagos e células dendríticas *in vitro* por RNA e DNA de *T. gondii*.
- Figura 10.** Produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  normal em camundongos TLR7/TLR9 e TLR3/TLR7/TLR9 deficientes infectados com *T. gondii*.
- Figura 11.** Camundongos TLR3/TLR7/TLR9 deficientes são parcialmente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.
- Figura 12.** TLR11 e TLR12 possuem alta similaridade de sequência.
- Figura 13.** TLR11 e TLR12 são ambos TLRs intracelulares localizados no Retículo endoplasmático.
- Figura 14.** Ambos TLR11 e TLR12 tem função mediada por UNC93B1 e são altamente expressos em DCs CD8+.
- Figura 15.** TLR11 e TLR12 formam heterodímeros após estimulação e são ambos necessários para a resposta à profilina de *T. gondii*.
- Figura 16.** Apesar do defeito na produção de IL-12, camundongos TLR11 e TLR12 deficientes são resistentes à infecção por *T. gondii*.
- Figura 17.** Camundongos quádruplo nocaute tem grande defeito na produção de IL-12/IFN- $\gamma$ .



**Figura 18.** Camundongos quádruplo nocautes são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.

**Figura 19.** Atraso na produção de citocinas e quimiocinas culmina com um recrutamento celular tardio.

**Figura 20.** Tratamento com IL-12 recombinante após à infecção, torna camundongos 3d e quádruplos nocautes resistentes à infecção por *T. gondii*.

**Figura 21.** Camundongos deficientes em TLR3, TRIF e Receptor de IFN do tipo I são resistentes à infecção por *T. gondii*.

**Figura 22.** RNA e DNA purificados de *T. gondii*, mas não rTgPRF, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs humanas.

**Figura 23.** Oligonucleotídeos contendo motivos CpGs sinalizam via TLR9 humano e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs humanas.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC - *antigen presenting cell*, célula apresentadora de antígeno

BSA - *Bovine Serum Albumin*, albumina de soro bovina

cDNA - DNA complementar

DNA - ácido desoxirribonucleico

DC - *Dendritic cell*, célula dendrítica

FACS - *Fluorescence-activated cell-sorting*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GPI - glicosilfosfatidilinositol

hrs - horas

GFP- *green fluorescent protein*

HEK - *Human embryonic kidney cells*, células embrionárias de rim humano

IL - interleucina

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IFN- $\alpha$  - interferon alfa

IFNR - receptor de interferon

iNOS - *Inducible nitric oxide synthase*, Oxido nítrico sintase indutível

IRGs- *Immunity Related Guanosine Triphosphatases*

KO- *knockout*, nocaute

LB- Meio Luria-Bertani

LPS - Lipopolissacárideo derivado de bactéria gram-negativa

M - molar

MCP-1 - *Monocyte chemotactic protein-1*, proteína quimiotática de monócitos 1

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

mM - milimolar

$\mu\text{M}$ - micromolar

mRNA - RNA mensageiro

NAS-TLRs- *Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptor*, Receptor do Tipo Toll de reconhecimento a ácidos nucleicos

nm- nanômetro

NO- *nitric oxide*, óxido nítrico

PAMPs - *Pathogen-associated molecular patterns*, Padrões moleculares associados à patógenos

PBMCs- *Peripheral blood mononuclear cells*, células mononucleares do sangue periférico

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

pg- picograma

RT-PCR- *Real Time Polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase em tempo real

Poli I:C - ácido poli-inosínico-poli-citidílico

PV- *Parasitophorous vacuole*, vacúolo parasitóforo

RNA- ácido ribonucleico

ROP- *roptry*, róptria

ROS- *reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio

SDS-PAGE-Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

SOCS1- *suppressor of cytokine signalling 1*, supressor da sinalização de citocinas 1

SOCS3- *suppressor of cytokine signalling 3*, supressor da sinalização de citocinas 3

STAg- Antígeno total de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

STAT1- *Signal transducer and activator of transcription 1*, transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

STAT3- *Signal transducer and activator of transcription 3*, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

STAT6- *Signal transducer and activator of transcription 6*, transdutor de sinal e ativador de transcrição 6

TAE - Tampão Tris-acetato EDTA

TEMED- *Tetramethylethylenediamine*

TgPRF- Profilina de *Toxoplasma gondii*

rTgPRF- Profilina de *Toxoplasma gondii* recombinante

TLR- *Toll like receptor*, Receptores do tipo *Toll*

TNF - Fator de necrose tumoral

UNC93B1 – Homólogo B1 de UNC-93

U.V. - Ultravioleta

V – Volts

YFP - *Yellow Fluorescent Protein*

# SUMÁRIO

I.	RESUMO .....	i
II.	ABSTRACT .....	ii
III.	LISTA DE FIGURAS .....	iii
IV.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
1.	INTRODUÇÃO .....	16
1.1	Aspectos gerais e distribuição geográfica .....	16
1.2	O <i>Toxoplasma gondii</i> e seu ciclo de vida .....	19
1.3	Linhagens do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	22
1.4	Aspectos clínicos da Toxoplasmose .....	24
1.5	Resposta imune contra <i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
1.5.1	Resposta imune adquirida .....	26
1.5.2	Resposta imune inata .....	27
2.	JUSTIFICATIVA .....	35
3.	OBJETIVOS .....	36
3.1	Objetivo Geral .....	36
3.2	Objetivos Específicos .....	36
4.	MATERIAS E MÉTODOS .....	37
4.1	Comitê de Ética .....	37
4.2	Cultivo celular .....	37
4.3	Animais .....	37
4.4	Parasita e Infecções <i>in vivo</i> .....	38

4.5	Amplificação da região codificadora de TLR11 e TLR12 murino .....	39
4.6	Clonagem de TLR11 e TLR12 murino nos vetores lentivirais pRP-cerulean, pRZ-citrine e pRH-mcherry .....	39
4.7	Construção de macrófagos estavelmente expressando TLR11 e TLR12 .....	41
4.8	Análise do genoma do <i>Toxoplasma gondii</i> em busca de sequências estimulatórias para TLR9 .....	41
4.9	Experimentos de microscopia confocal .....	42
4.10	Transplante de medula óssea .....	43
4.11	Purificação Celular .....	43
4.12	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) .....	44
4.13	ELISA para dosagem de citocinas .....	44
4.14	Citometria de fluxo .....	45
4.15	Real-Time PCR para quantificação de DNA de <i>T. gondii</i> e expressão de TLRs .....	45
4.16	Ensaio de Luciferase .....	46
4.17	Imunoprecipitação e Western Blotting .....	47
4.18	Análise estatística .....	48
5.	RESULTADOS .....	49
5.1	Células expressando UNC93B1 mutada (3d) são capazes de controlar a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> <i>in vivo</i> após vacinação com a cepa CPS 1.1 .....	49
5.2	Ambos RNA e DNA purificados de taquizoítos da cepa ME49 de <i>T. gondii</i> ativam APCs via TLRs .....	53
5.3	Deficiência de receptores do tipo Toll de reconhecimento de ácidos nucleicos não recupera o fenótipo de susceptibilidade observado em camundongos 3d .....	55
5.4	Além de TLR3, TLR7 e TLR9, TLR11 e TLR12 também se localizam no Retículo endoplasmático .....	59
5.5	TLR11 e TLR12 são altamente expressos em células dendríticas CD8 $\alpha$ + e tem função mediada por UNC93B1 .....	63
5.6	TLR11 e TLR12 formam heterodímeros após estimulação e são ambos requeridos para resposta à infecção por <i>T. gondii</i> .....	66

5.7 Camundongos TLR11 e TLR12 nocautes tem defeito na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ mas são resistentes à infecção por <i>T. gondii</i> .....	68
5.8 Camundongos deficientes em TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 são altamente susceptíveis à infecção por <i>T. gondii</i> .....	70
5.9 Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) produzem níveis elevados de IL-12 em resposta a DNA e RNA de <i>T. gondii</i> , mas não a rTgPRF .....	76
6. DISCUSSÃO .....	81
7. CONCLUSÃO .....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
9. ANEXO ...	108
10. APÊNDICE ..	112

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais e distribuição geográfica

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, ao qual também pertencem o *Plasmodium* causador da Malária e o *Cryptosporidium* (Levine, 1988). O *T. gondii* foi identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte-africano, popularmente chamado de gundi (*Ctenodactylus gundii*). A identificação foi feita simultaneamente por Nicolle e Manceaux em 1908 no Instituto Pasteur da Tunísia e, no mesmo ano, o parasita foi isolado de coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (Kim and Weiss, 2008).

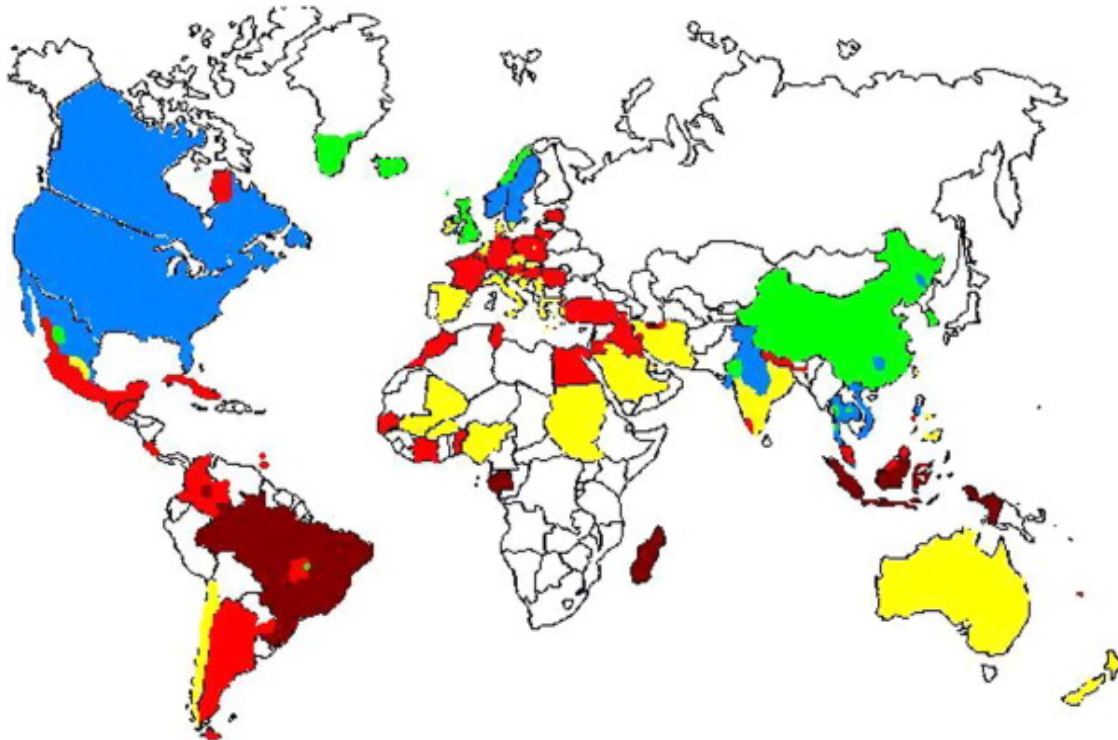
A toxoplasmose causada pelo parasita *T. gondii* é uma das infestações parasíticas mais comuns em humanos e em animais de sangue quente. Já foram descritas mais de 300 espécies de aves e mamíferos infectados pelo *T. gondii*. Além do aspecto médico, a doença também se destaca como uma parasitose veterinária importante. Anualmente, rebanhos de suínos e ovinos sofrem perdas significativas devido a mortes neonatais e abortos (Dubey, 2009). Além disso, quando ingeridas cruas ou mal passadas, vísceras e carnes de animais domésticos contaminadas pelo parasita, são importantes fontes de infecção, tanto para humanos quanto para outros carnívoros. Já foi demonstrada, por exemplo, uma estreita relação entre infecções nos rebanhos e a ocorrência de casos isolados ou surtos de toxoplasmose humana (Innes, 2010). Esse protozoário encontra-se distribuído mundialmente, existindo estimativas de que aproximadamente um terço da população global esteja cronicamente infectada pelo mesmo (Ribeiro et al., 2008; Robert-Gangneux and Darde, 2012).

O parasita possui ampla distribuição geográfica, já tendo sido isolado em países de regiões tropicais, temperadas, e até mesmo em países como Canadá, Alasca e Groelândia (Lebech et al., 1993; Messier et al., 2009). Apesar da ampla distribuição do *T. gondii*, as taxas de prevalência da Toxoplasmose são bastante variadas em diferentes regiões geográficas, variando de acordo com a prevalência do parasita nos hospedeiros definitivos e intermediários, fatores climáticos que favorecem o desenvolvimento e manutenção de oocistos viáveis, hábitos alimentares, saneamento básico, entre outros (Hill and Dubey, 2002).



Na Europa continental, a taxa de prevalência da Toxoplasmose varia entre 10 e 60%. Apesar de relativamente alta, as taxas de soroprevalência seguem tendência decrescente em vários países como França (Berger et al., 2009) e Holanda (Hofhuis et al., 2011). Nos Estados Unidos a taxa de soroprevalência é baixa (10 a 20%) seguindo a mesma tendência de diminuição (Jones et al., 2007). No México a distribuição é heterogênea, com a prevalência aumentando em direção ao sul do país (Velasco-Castrejon et al., 1992). Já nos demais países da América latina a prevalência é superior a 40%, exceto no Chile onde a prevalência é de 37% (Contreras et al., 1996). A Figura 1 mostra a distribuição geográfica da Toxoplasmose no mundo, e as taxas de prevalência reportadas em diversos países. O mapa mostra várias regiões do globo, sendo a menor prevalência na Ásia, inferior a 10%. Há também de se observar a alta prevalência em países do oriente médio, e principalmente nas ilhas da Indonésia e Madagascar, que possuem prevalência superiores a 60% (Pappas et al., 2009).

No continente Americano, o Brasil possui as maiores taxas de soroprevalência. Diferentes estudos realizados no Brasil indicam uma prevalência entre 50 e 80%, variada em diferentes estados (Dubey et al., 2012). A maior taxa foi encontrada em populações indígenas do Mato Grosso e Rondônia (Boia et al., 2008; Sobral et al., 2005). Na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, a prevalência encontrada foi de 56% (Carellos et al., 2008). Um estudo epidemiológico realizado em Recife demonstrou um percentual de soropositivos de 79,0% para homens e 63,4% para mulheres, com aumento de soropositividade diretamente ligado à idade, variando de 18,2% para os indivíduos com menos de 20 anos até 92,6% para aqueles entre 40 e 50 anos de idade. Para as mulheres na idade fértil (18-40 anos) foi encontrada prevalência de 51,6% (Coelho et al., 2003). Em outro estudo realizado no Rio Grande do Sul com 2.126 mulheres entre 12 e 48 anos, observou-se uma prevalência de 74,5% de soropositividade dentre as gestantes (Spalding et al., 2005). Já no Paraná, a soropositividade dentre as mulheres analisadas foi de 49,2%, sendo 1,2% desse percentual de mulheres grávidas (Lopes et al., 2009).



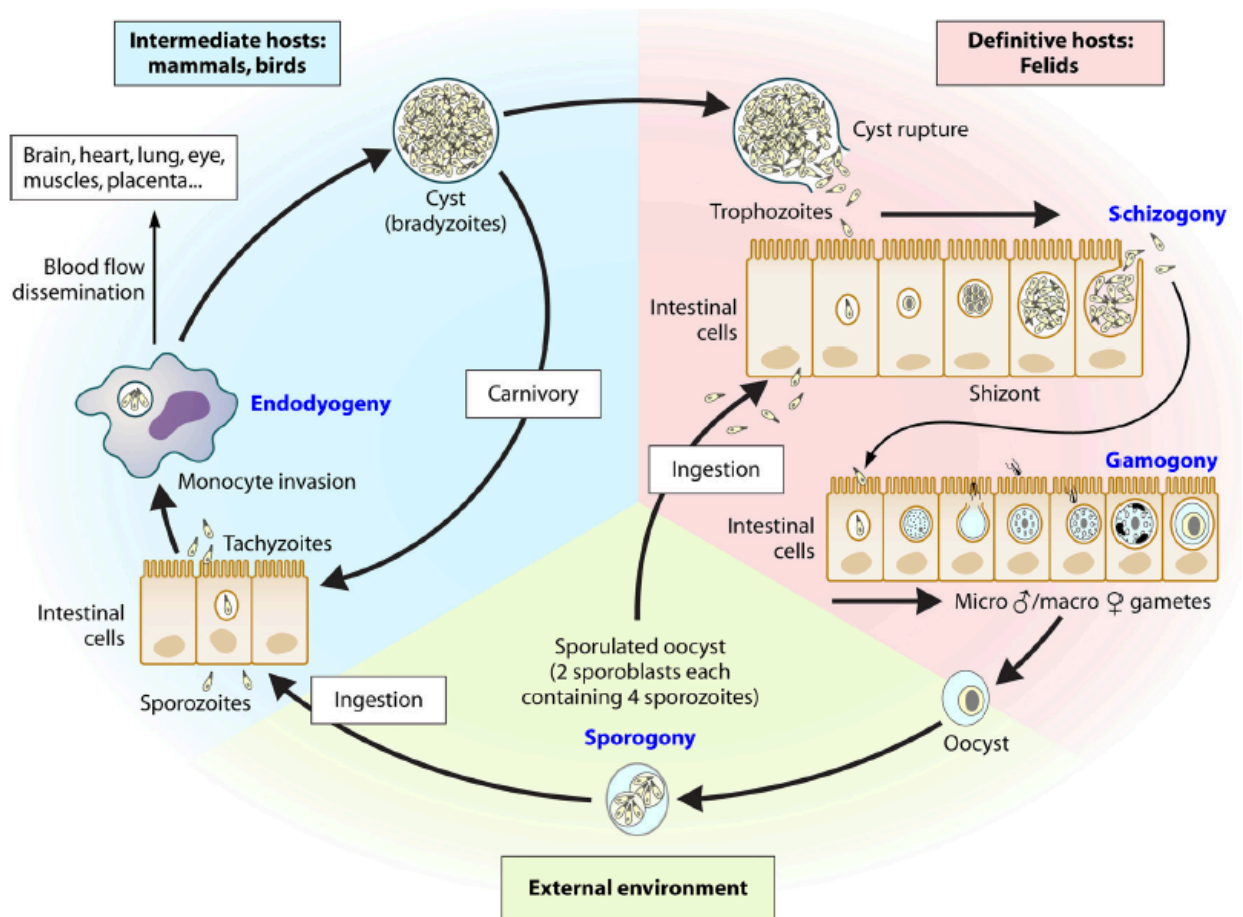
**Figura 1:** Mapa da distribuição da toxoplasmose de acordo com dados coletados entre 1992 e 2009. Os países em verde indicam soroprevalência <10%, em azul entre 10 e 20%, em amarelo entre 20 e 40%, em vermelho entre 40 e 60% e em marrom superior a 60%. A cor branca é indicativa de falta de dados (Pappas et al., 2009).

Diferentes fatores contribuem para a alta incidência de Toxoplasmose no Brasil, incluindo: baixo nível de escolaridade (Avelino et al., 2004; Lopes et al., 2009), fatores climáticos como umidade e altas temperaturas (Buffolano, 2008), hábitos alimentares, alta prevalência de toxoplasmose nos rebanhos suínos e ovinos (Avelino et al., 2004; Lopes et al., 2009) e falta de condições sanitárias como saneamento básico (Bahia-Oliveira et al., 2003). Apesar da alta taxa de infecção dentro da população humana, a manifestação de sinais clínicos da doença é um fato raro em indivíduos saudáveis. A forma severa da doença aparece em indivíduos imunossuprimidos, e também em recém-nascidos que são infectados por via congênita ou durante a fase pré-natal e receptores de transplante de medula e fígado (Elmore et al., 2010).

## 1.2 O *Toxoplasma gondii* e seu ciclo de vida

O *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório membro do filo Apicomplexa, e possui um complexo ciclo de vida. O ciclo biológico do *T. gondii* (Figura 2), caracteriza-se por ser heteroxeno facultativo. Na ausência de reprodução sexual, o *T. gondii* se dissemina na forma de cistos teciduais através da cadeia alimentar, sem necessariamente infectar o hospedeiro definitivo. Apesar da ampla diversidade de hospedeiros do *T. gondii*, apenas os felídeos desenvolvem a fase sexuada do ciclo, o que leva à descrição desses mamíferos como hospedeiros definitivos. O homem e outros mamíferos, juntamente com as aves, são considerados hospedeiros intermediários, pois nesses ocorre somente desenvolvimento do ciclo assexuado do parasita (Dubey, 2009; Innes, 2010). O *T. gondii* apresenta duas formas infectantes: oocistos e cistos teciduais, ambas haploides (Figura 3). Os oocistos ainda diploides, resultantes da reprodução sexuada nos felídeos, são eliminados nas fezes destes animais, os únicos hospedeiros definitivos identificados. No ambiente externo, os oocistos se tornam infectivos após passarem por um processo chamado de esporogonia, gerando um oocisto contendo oito esporozoítos haploides em seu interior (Dubey, 2009). Os cistos teciduais contêm inúmeros bradizoítos haploides, forma menos ativa do *T. gondii*. Os cistos se desenvolvem nos tecidos cerebrais e musculares dos hospedeiros intermediários, incluindo diversas espécies de animais de sangue quente como aves e mamíferos (Miller et al., 1972).

Os oocistos estão presentes no ambiente e podem ser ingeridos acidentalmente, já os cistos teciduais estão presentes nos tecidos das presas ingeridos pelos predadores ou de animais utilizados na alimentação humana (Tenter, 2009; Tenter et al., 2000). Quando atingem o intestino, ambas as formas infectantes, bradizoítos dos cistos e esporozoítos do oocisto, penetram nos enterócitos onde se transformam em taquizoítos, a forma de rápida multiplicação do parasita. No hospedeiro intermediário, os taquizoítos são capazes de se disseminar pelo hospedeiro e penetrar em qualquer célula nucleada no organismo. Uma vez dentro das células, os taquizoítos se multiplicam rapidamente, podendo gerar novos taquizoítos ou se transformarem em bradizoítos que formarão os cistos teciduais. Uma vez nessa forma, o *T. gondii* permanece viável e infectivo por toda a vida do hospedeiro. Os cistos teciduais permanecem intracelulares por todo tempo, e a morte da célula do hospedeiro pode causar o rompimento da parede do cisto e a liberação dos bradizoítos (Innes, 2010).



**Figura 2-** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Esquema representativo dos estágios de vida e modo de transmissão do parasita. Os felinos, hospedeiros definitivos, infectam-se pela ingestão de cistos presentes nas presas ou de oocistos presentes no ambiente. A replicação sexuada ocorre no intestino delgado dos felídeos. Dentro dos enterócitos, micro e macrogametas são formados em decorrência de ciclos mitóticos de replicação. A fusão dos gametas origina o oocisto resistente eliminado nas fezes. Por esporogonia os oocistos diploides se desenvolvem em oito esporozoítos haploides que permanecem dentro dos oocistos maduros. A transmissão ocorre quando os oocistos são ingeridos por animais de sangue quente. Após a ingestão, a fase aguda é caracterizada por rápida multiplicação e liberação de taquizoítos capazes de infectar quaisquer células nucleadas do hospedeiro. Cistos teciduais contendo bradizoítos são resultado da fase crônica e são transmitidos através de carnivorina e saprofagia (Robert-Gangneux and Darde, 2012).

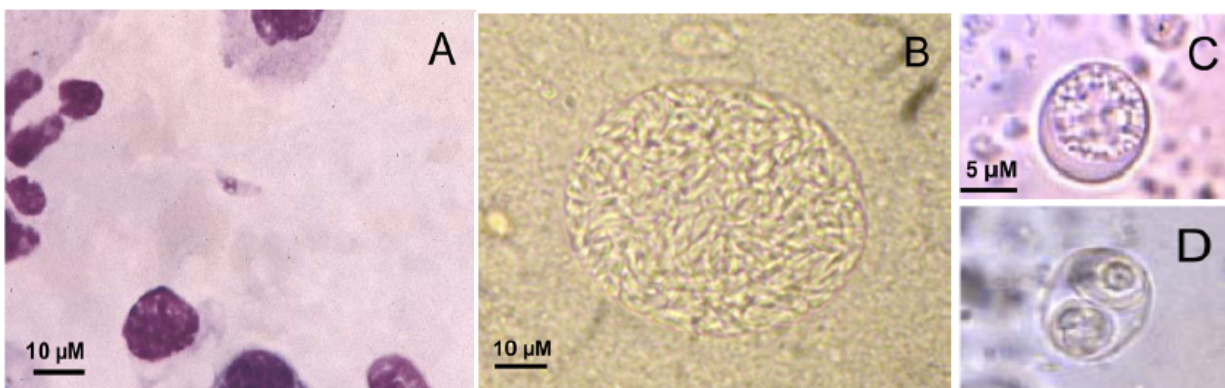
O parasita *T. gondii* é reconhecido por sua extrema habilidade em invadir uma grande variedade de células hospedeiras. A invasão é um processo ativo que depende da motilidade do parasita e da secreção de diversas proteínas presentes nas micronemas, róptrias (ROP) e nos grânulos densos. O primeiro passo para o processo de invasão é a ligação do parasita à membrana celular, processo dependente de cálcio, e que leva à secreção de adesinas presentes nas micronemas.

Um exemplo é a proteína MIC2 que reconhece receptores na célula hospedeira e promove reorientação do parasita. O processo de invasão celular depende de uma intrínseca interação entre o parasita e a membrana da célula hospedeira, um processo de motilidade dependente do citoesqueleto de actina-miosina que causa um rearranjo do citoesqueleto do parasita (Carruthers and Boothroyd, 2007; Sibley, 2010). No início da invasão, há uma forte associação entre a extremidade apical do parasita e a membrana da célula hospedeira, chamada de junção móvel. Esta junção se move a partir da extremidade apical até a extremidade posterior do parasita, levando à internalização do parasita em um vacúolo, chamado vacúolo parasitóforo (PV). O estabelecimento desta junção ao redor do parasita invasor requer a distribuição por toda a superfície do parasita de um antígeno de membrana apical (AMA1), também secretada por micronemas, a secreção das róprias (ROP) e das proteínas do pescoço (RONs) (Bradley et al., 2005; Dubremetz, 2007).

Nos últimos anos as proteínas da família ROP2 foram muito estudadas. ROP18, um membro desta família, está associada com a face citosólica do PV e exerce atividade de proteína quinase, que tem um grande efeito no crescimento e na virulência do parasita. Já ROP16 é capaz de manipular a expressão do gene hospedeiro, através da fosforilação de STAT3 e STA6 e da indução de uma resposta imune de perfil Th2 que afeta a secreção de IL-12 (Boothroyd and Dubremetz, 2008; Bradley and Sibley, 2007; Butcher et al., 2011; Laliberte and Carruthers, 2008). Além das róprias, as proteínas dos grânulos densos também contribuem para a formação do PV durante as primeiras horas após a invasão. A maioria das proteínas transmembranares do hospedeiro são removidos do PV durante o processo de invasão, alterando as características bioquímicas do PV, impedindo a fusão com lisossomos ou quaisquer outras vesículas citoplasmáticas. Dentro do PV, taquizoítos se dividem através de endodigenia durante um ciclo de 6 a 9 hrs, levando à formação de duas células filhas para cada célula mãe. Os taquizoítos são liberados após 64-128 parasitas terem se acumulado no PV (Black and Boothroyd, 2000). A saída da célula é um processo ativo dependente do aumento da concentração de cálcio intracelular (Sibley, 2010).

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 de rebanhos ovinos, caprinos e suínos contendo cistos teciduais (Kijlstra and Jongert, 2009); II) ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos (Bahia-Oliveira et al., 2003); iii) transplante de órgãos e tecidos contendo cistos ou taquizoítos (Batista et al., 2011); e iv) através da placenta pela via congênita (Rogers et al., 2008).

Atualmente, a prevenção e o controle da toxoplasmose dependem de medidas de vigilância epidemiológica e de manejo sanitário, voltadas para a identificação e a eliminação das fontes de infecção, tal como controle da população de gatos de rua. As recomendações para controle da transmissão dentro do ambiente doméstico incluem: prevenção do consumo de carne mal passada; limpeza frequente das caixas de areia de gatos domésticos, usando proteção para as mãos e detergentes apropriados e/ou água fervente; descarte das fezes e das camas de areia dos felinos de maneira adequada; uso de ração industrializada e água tratada na alimentação dos animais; prevenção do hábito da caça por parte de gatos domésticos, para evitar que os mesmos se alimentem com presas infectadas com cistos. Finalmente, a prevenção da toxoplasmose congênita depende de exame pré-natal e do tratamento das gestantes soropositivas para Toxoplasmose (Dabritz and Conrad, 2010). Essas ações visam principalmente diminuir a exposição dos grupos de risco como o das mulheres em idade fértil e a dos pacientes imunocomprometidos (Bojar and Szymanska, 2010; Lago et al., 2009).



**Figura 3-** Estágios biológicos do *Toxoplasma gondii*. (A) Fotos de microscopia de tachizoítos em lavado brônquio alveolar corado com Giemsa. (B) Cistos presentes no cérebro de camundongos infectados. (C) Oocistos não esporulado e (D) oocistos esporulado (Robert-Gangneux and Darde, 2012).

### 1.3 Linhagens do *Toxoplasma gondii*

Estudos realizados na América do Norte e na Europa demonstraram que o *T. gondii* apresenta uma estrutura populacional altamente clonal. Com base em análises de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), as linhagens do parasita foram classificadas em três

populações clonais designadas como tipo I, II e III, que apresentam alta similaridade, mas que se diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% dos genes (Howe et al., 1997; Howe and Sibley, 1995). Estudos recentes realizados na África sugerem a mesma distribuição clonal nessa região (Velmurugan et al., 2008). Já no Brasil, os isolados de *T. gondii* apresentam alta variabilidade genética, sendo a distribuição da população de parasitas denominada não clonal (Ferreira Ade et al., 2006; Pena et al., 2008).

Das linhagens isoladas de pacientes infectados cronicamente, linhagens do tipo II são encontradas comumente em pacientes norte-americanos e europeus, enquanto que linhagens do tipo I parecem ser mais frequentes entre os pacientes da América do Sul, sendo associadas a quadros de toxoplasmose congênita ou ocular (Resende et al., 2008). Estudos em gatos (Pena et al., 2006) e galinhas caipiras (Dubey et al., 2005; Dubey et al., 2002) da América do Sul mostraram a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste a grande predominância de linhagens do tipo II em países da América do Norte.

As três linhagens clonais de *T. gondii* se diferem na virulência em modelos animais e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I (RH) são altamente virulentas para camundongos e humanos, enquanto as linhagens do tipo II (ME49) e do tipo III (CEP e VEG) são consideradas moderadamente virulentas (Howe and Sibley, 1995). Em geral, as linhagens do tipo II e III são cistogênicas, enquanto as linhagens tipo I têm uma capacidade bem reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados (Saeij et al., 2005; Switaj et al., 2005). As linhagens virulentas apresentam diversas características que podem explicar a rápida disseminação do parasita e a alta carga parasitária observada em camundongos: i) maior migração através do epitélio; ii) maiores taxas de penetração *ex vivo* na lâmina própria e submucosa; e iii), maior taxa de crescimento e menor taxa de interconversão de taquizoítos para bradizoítos (Barragan and Hitziger, 2008; Saeij et al., 2005). Através de cruzamentos experimentais entre linhagens com diferentes padrões de virulência, facilitou-se a identificação de vários genes polimórficos que codificam proteínas secretadas importantes na virulência do *T. gondii* em camundongos (Reese et al., 2011; Taylor et al., 2006). Estas proteínas de virulência são descarregadas de organelas apicais, as róprias. As proteínas da família rópria 2 (ROP5, ROP16 e ROP18) exercem atividade quinase ou pseudquinase. São injetadas diretamente na célula hospedeira e desempenham um papel no processo de invasão do parasita e na indução de IL-12 (Robben et al., 2004).

Como mencionado anteriormente, as róptrias tem sido bastante estudadas, ajudando a esclarecer os mecanismos de virulência de diferentes cepas. ROP18, uma proteína serina/treonina quinase foi identificada como o principal fator de virulência nas cepas de *T. gondii*. ROP18 é uma proteína polimórfica que tem expressão variada entre as diferentes cepas de *T. gondii*, sendo mais expressa nas cepas do tipo I e II. A expressão de ROP18 recombinante na cepa avirulenta do tipo III aumenta fortemente sua virulência (Saeij et al., 2005; Taylor et al., 2006). Uma outra róptria identificada foi ROP5, que também é altamente expressa em cepas do tipo I. Manipulações genéticas para nocaute do gene *ROP5* em cepas do tipo I, diminuem fortemente sua virulência (Behnke et al., 2011; Reese et al., 2011). Apesar de ainda não completamente elucidado, se acredita que ROP5 auxilia ROP18 na sua atividade quinase na fosforilação das GTPases relacionadas a imunidade (IRGs), que são importantes para o controle do crescimento do parasita no PV (Collazo et al., 2001; Steinfeldt et al., 2010).

#### **1.4 Aspectos clínicos da Toxoplasmose**

As diferentes manifestações clínicas da toxoplasmose são influenciadas por fatores do hospedeiro e do parasita. Quanto ao hospedeiro, são importantes seu estado imunológico, idade e susceptibilidade genética. Quanto ao parasita, são importantes o inóculo, tipo de cepa e aparentemente a forma infectante (Saeij et al., 2005).

Apesar da alta frequência de infecção dentro das populações humanas, a ocorrência de sinais clínicos de toxoplasmose é baixa, já que a infecção adquirida (pós-natal) em indivíduos imunologicamente competentes, leva ao desenvolvimento de uma forte resposta imune celular, a qual resulta no controle eficaz do parasita. No entanto, o parasita permanece alojado no organismo do indivíduo sob a forma de cistos sem ocasionar sinais clínicos da doença. Infecções sintomáticas usualmente se caracterizam por linfadenopatia, a qual pode estar associada com febre, fadiga, fraqueza e cefaléia (Miller et al., 2009; Pergola et al., 2010). No entanto, a doença também pode se manifestar sob a forma ocular, como resultado de infecção aguda ou reativação da infecção crônica (Mets et al., 1996).

A toxoplasmose adquirida tem um maior impacto em indivíduos com comprometimento do sistema imune. Nesses indivíduos, quadros de imunossupressão e imunodeficiência moderadas ou



extremas, podem levar a reativação da infecção latente. Casos de reativação da infecção em pacientes transplantados têm se tornado cada vez mais frequentes, sendo a fonte de reinfecção nos tecidos do doador ou tecidos do próprio paciente, nos quais se encontram cistos dormentes (de Medeiros et al., 2001). A toxoplasmose também tem emergido nas duas últimas décadas como uma das mais comuns infecções oportunistas associadas com a AIDS, sendo a causa mais comum de morte dentre esses pacientes devido ao quadro de encefalite gerado pela doença (Chimelli, 2011; Pereira-Chiocola et al., 2009). Estima-se que 40% dos portadores de AIDS desenvolvem encefalite causada pelo *Toxoplasma*, sendo que 10 a 30% morrem em decorrência desta patologia (Ferreira and Borges, 2002). Com o tratamento específico antirretroviral, os pacientes têm seus níveis de linfócitos circulantes reconstituídos, e a infecção por *T. gondii* tende a ser controlada (Lejeune et al., 2011).

As maiores complicações da toxoplasmose decorrem da infecção congênita ou pré-natal. A transmissão transplacentária ocorre normalmente em casos de primo-infecção. Se a infecção primária se der antes da gravidez, a imunidade adquirida impede a transmissão do parasita ao feto em exposições subsequentes. No entanto, se a gestante sofre um comprometimento da função imune e reativação da toxoplasmose crônica, também pode haver infecção do feto (Silveira et al., 2003). Os sintomas da infecção do feto variam conforme a virulência da cepa e o período da gestação no qual a transmissão ocorre. Infecções no primeiro trimestre de gestação podem levar ao aborto ou anormalidades fetais que reduzem significativamente a qualidade de vida da criança que sobrevive (Wallon et al., 2002), tais como encefalite, retinocoroidite, calcificações intracranianas, hepatoesplenomegalia e hidrocefalia (Kravetz and Federman, 2005a, b; Soares et al., 2011). Essa última é uma lesão menos comum, mas é a mais dramática lesão causada pela toxoplasmose, sendo exclusiva de humanos (Dubey, 2004). Quando à infecção do feto ocorre nos estágios finais da gravidez, os efeitos da doença são menos graves, com a maioria dos neonatos sendo assintomáticos. Entretanto, essas crianças podem desenvolver problemas como estrabismo, cegueira, surdez, deficiências psicomotoras, convulsões e retardamento no desenvolvimento mental (Kravetz and Federman, 2005b; Wallon et al., 2002).

Como as infecções de pacientes imunocompetentes geralmente são assintomáticas, o diagnóstico de infecção materna normalmente é feito por meio de detecção de IgA, IgG ou IgM anti-*T. gondii* em testes de imunofluorescência, ELISA ou reação de aglutinação -ISAGA-IgM

(Araujo and Ferreira, 2008). O tratamento da gestante é realizado com espiramicina ou, se a transmissão para o feto for confirmada, com pirimetamina e sulfadiazina (Couvreux et al., 1993).

## **1.5 Resposta imune contra *Toxoplasma gondii***

### **1.5.1 Resposta imune adaptativa**

Tipicamente, infecções pelo parasita *T. gondii* induzem uma rápida resposta imune com perfil pró-inflamatório, a qual é necessária para sobrevivência do hospedeiro, mas que também garante a persistência do parasita. Uma intrigante questão que ainda permanece por ser esclarecida é como o parasita provoca uma resposta imune balanceada que é ao mesmo tempo benéfica ao hospedeiro e ao parasita, permitindo a sobrevivência de ambos. Acreditamos que uma fina interação do parasita com as células imunes, durante as fases iniciais da infecção, possa culminar com uma resposta imune controlada (Gazzinelli and Denkers, 2006; Yarovinsky, 2008). Essa resposta recruta uma ampla gama de células, tais como neutrófilos, linfócitos T CD4+ e T CD8+, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células *natural killer* (NK) (Miller et al., 2009). Uma característica marcante da resposta imune anti-*T. gondii* é que praticamente não existe imunopatologia associada à mesma em indivíduos imunocompetentes, sendo os sintomas mais comuns febre e linfadenopatia (Denkers and Gazzinelli, 1998).

Os linfócitos T CD8+ são considerados os efetores mais importantes na proteção contra *T. gondii* (Bhadra et al., 2010; Jordan and Hunter, 2010). Essas células contribuem para a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e atuam prevenindo a reativação da infecção crônica, eliminando cistos teciduais através de sua atividade citotóxica que é mediada por perforina (Suzuki et al., 2000). As células T CD4+ também assumem um importante papel contra o parasita (Johnson and Sayles, 2002). Essas cooperam na produção de IFN- $\gamma$ , e auxiliam na proliferação e ativação de células T CD8+ através da produção de Interleucina (IL) 2, um mitógeno importante para células T, e indução da expressão de moléculas coestimulatórias (Tait and Hunter, 2009). Reações pró-inflamatórias dependentes de IFN- $\gamma$  são essenciais para a resistência contra taquizoítos durante a fase aguda da infecção (Lykens et al., 2010), além de impedirem a reativação dos cistos teciduais durante a fase crônica (Miller et al., 2009). O IFN- $\gamma$  produzido em resposta ao parasita, atua em macrófagos e DCs, aumentando a capacidade microbicida e de síntese de IL-12 dessas células (Gazzinelli et al., 1994). Ainda, o IFN- $\gamma$  ativa a síntese de quimiocinas envolvidas no recrutamento

de linfócitos T; atua como um cofator da IL-12 na diferenciação de células Th0 em células efetoras Th1 (Gazzinelli et al., 1996); induz a expressão de receptores de IL-12 em células T (Seder et al., 1993) e aumenta a expressão de moléculas de classe I do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) em células infectadas, favorecendo o reconhecimento pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs) (Denkers and Gazzinelli, 1998). Além disso, IFN- $\gamma$  também ativa a síntese de TNF por macrófagos. TNF atua sinergisticamente com IFN- $\gamma$ , induzindo a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, linfócitos, células NK e neutrófilos. O NO pode matar diretamente o parasita inibindo enzimas mitocondriais e nucleares, atuando tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção pelo *T. gondii* (Miller et al., 2009).

Na medida em que a resposta imune se desenvolve, ocorre a eliminação dos taquizoítos, aparecimento de bradizoítos e a formação de cistos teciduais. Alguns trabalhos preconizam que na transição da fase aguda para a fase crônica da toxoplasmose, a resposta imune induz ativamente a transformação do taquizoíto em bradizoíto. Uma segunda hipótese sugere que a resposta imune controla a multiplicação do taquizoíto, mas não tem efeito sobre o bradizoíto, que é essencialmente inócuo ao hospedeiro. De qualquer forma, na fase crônica, os níveis de citocinas inflamatórias caem e a manutenção do controle da infecção passa a depender do desenvolvimento da imunidade adquirida, com ativação de células T CD4+ e T CD8+ específicas, as quais exercem importante papel no controle dos cistos teciduais (Miller et al., 2009). A evidência mais marcante da importância das células T para o controle da infecção crônica é o fato que, nos pacientes imunossuprimidos, cujo número de linfócitos T se encontra reduzido, ocorre reativação de cistos teciduais e infecção aguda (Montoya and Liesenfeld, 2004).

### **1.5.2 Resposta imune inata**

Além da resposta imune celular, é importante ressaltar que a resposta imune inata contra parasitas, é ativada principalmente durante as fases iniciais da infecção pelo reconhecimento de moléculas estruturais associadas a patógenos (PAMPs) (Janeway, 1989), presentes no parasita, por células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e DCs. Isso é evidenciado pelo fato de que à infecção pelo *T. gondii* limita a coinfeção com outros patógenos, tais como *Schistosoma mansoni* (Mahmoud et al., 1976) e *Leishmania major* (Santiago et al., 1999). A resposta inata é

caracterizada pela produção de IL-12, Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-18, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) pelas APCs, e pela produção de IFN- $\gamma$  dependente de IL-12 por células NK (Tait and Hunter, 2009). A ativação da imunidade inata é importante para o desenvolvimento de uma resposta adquirida eficiente.

Na Toxoplasmose murina, as DCs são as principais produtoras de IL-12 (Hou et al., 2011; Liu et al., 2006; Reis e Sousa et al., 1997), e essa produção ocorre através da ativação de duas vias de sinalização. A principal delas é dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), e a secundária envolve o receptor de quimiocina-cisteína (C-C) 5 (CCR5), através de sinalização via proteína G (Aliberti et al., 2000; Khan et al., 2006; Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008).

O papel de IL-12 no controle da infecção por *T. gondii* é o de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T CD4 e CD8 (Gazzinelli et al., 1994; Hunter et al., 1994). O IFN- $\gamma$  é o principal mediador da resistência à infecção por *T. gondii*, através da ativação de uma ampla gama de atividades microbicidas em ambas as células da linhagem hematopoiéticas e não hematopoiética (Suzuki et al., 1988; Yap and Sher, 1999). O IFN- $\gamma$  altera o metabolismo celular, levando à degradação de triptofano, importante para o crescimento do parasita, (Pfefferkorn, 1984) e também causa uma diminuição nos níveis intracelulares de ferro (Dimier and Bout, 1998). O IFN- $\gamma$  também estimula a produção de ROS e NO, ambos importantes no controle do crescimento do parasita (Arsenijevic et al., 2001; Murray et al., 1985). Um outro mecanismo muito importante de controle do crescimento do parasita é através da indução das IRGs. O mecanismo pelo qual as IRGs controlam o crescimento do parasita ainda não é muito bem entendido, mas se acredita que o recrutamento das IRGs para o PV causa a ruptura de sua membrana e a liberação dos taquizoítos para serem degradados no citosol (Howard et al., 2011; Steinfeldt et al., 2010).

Muitos parasitas, incluindo o *T. gondii*, induzem mudanças na transcrição gênica, incluindo genes envolvidos no metabolismo energético e principalmente em genes da resposta imune e sinalização (Blader et al., 2001). Um dos mecanismos utilizados pelo *T. gondii* é o bloqueio dos fatores de transcrição STAT1 e NF- $\kappa$ B (Butcher et al., 2001; Luder et al., 2001), importantes para a indução de citocinas pro-inflamatórias e a ativação de mecanismos efetores. A infecção pelo *T. gondii* também induz a ativação de vias anti-inflamatórias, incluindo as vias envolvendo SOCS1 (Stutz et al., 2012), SCOS3 (Whitmarsh et al., 2011) e STAT3 (Butcher et al., 2005).

O reconhecimento das PAMPs por APCs é feito por uma família de Receptores do tipo Toll (TLRs) que atua tanto na superfície celular, como internamente na superfície dos endossomos.

Após a caracterização do primeiro TLR de mamífero, o TLR4, outras várias proteínas estruturalmente relacionadas foram identificadas como TLRs. Os TLRs de mamíferos compreendem uma grande família com pelo menos 13 membros, sendo que os TLR1-9 são conservados em *Mus musculus* e *Homo sapiens*.

Os TLRs são receptores do reconhecimento a padrões (PRR) e são os melhores caracterizados. Os TLRs são proteínas transmembrana do tipo I cuja porção extracelular é formada por um ectodomínio com repetições ricas em leucina (LRR), responsável pelo reconhecimento dos PAMPs; o domínio transmembrana; e um domínio citoplasmático homólogo à região do Receptor de IL-1, denominado Toll/IL-1 receptor (TIR), que desencadeia a sinalização (Beutler, 2009; Bowie and O'Neill, 2000; Hoffmann, 2003).

Tem sido constantemente demonstrado que esta família de receptores é a principal maneira pela qual o sistema imune inato reconhece e responde a presença de microrganismos e de outros agentes infecciosos (Gazzinelli and Denkers, 2006; Takeda et al., 2003). O lipopolissacarídeo (LPS), a flagelina de *Salmonella typhimurium* e as sequências de DNA ricas em CpG são PAMPs associados à infecção bacteriana; enquanto o RNA de fita dupla (dsRNA) em sua forma sintética (poly[rI]:poly[rC] ou poly-IC, *polyriboinosinic:polyribocytidilic acid*) ou formado a partir de intermediários da replicação, representa molécula característica de uma infecção viral. Âncoras de GPI derivadas da membrana das formas tripomastigotas, são moléculas presentes no protozoário *T. cruzi* e são responsáveis por iniciar uma resposta inflamatória. Por exemplo, o LPS é reconhecido por TLR4, CpG por TLR9, poly-IC por TLR3, flagelinas por TLR5 e âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *T. cruzi* por TLR2 (Campos et al., 2001; Janeway and Medzhitov, 2002; Kawai and Akira, 2010). Embora os TLRs tenham um papel central no início da resposta imune contra vários patógenos, tem sido demonstrado que outros PRRs também estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs e no início da resposta imune inata. Entre estes receptores podemos citar os receptores de lectina do tipo C (CLRs), os receptores citosólicos do tipo NOD (NLRs) e os receptores do tipo RIG-I (RLRs). No geral estes receptores estão envolvidos no reconhecimento de fungos, bactérias, vírus entre outros patógenos (Barbalat et al., 2011; Barber, 2011).

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície celular e reconhecem componentes da membrana de patógenos, ao passo que TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos dentro da célula e reconhecem os ácidos nucléicos (NAS-TLRs) (Blasius and Beutler, 2010). Os TLRs intracelulares estão localizados no Retículo endoplasmático (ER), endossomos e lisossomos,

e esta localização intracelular é importante para o reconhecimento do DNA/RNA de patógenos após sua internalização, impedindo que ácidos nucleicos presentes no ambiente extracelular, e que são rapidamente degradados por nucleases, ativem estes TLRs. Esta localização é de grande importância para evitar o reconhecimento de ácidos nucleicos próprios e o início de uma resposta autoimune (Blasius and Beutler, 2010).

Na Toxoplasmose murina, TLR2, TLR4 e TLR11 têm papel importante no reconhecimento de moléculas do parasita. O TLR11, localizado no retículo endoplasmático (Pifer et al., 2011), atua como principal receptor da resposta imune inata contra o *T. gondii* na indução de IL-12, reconhecendo a proteína profilina presente no citoplasma do parasita, cuja função esta ligada a polimerização de actina para motilidade e invasão celular (Daher et al., 2010; Plattner et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). Já TLR2 e TLR4 reconhecem âncoras GPI isoladas da superfície celular do parasita (Debierre-Grockiego et al., 2007). Enquanto que o reconhecimento da profilina promove a forte indução de IL-12 de forma exclusivamente dependente de TLR11 e MyD88, a ativação de TLR2 parece induzir não a produção de IL-12, mas de TNF- $\alpha$  e NO. O papel da ativação e TLR4 na produção de citocinas durante a infecção ainda não esta bem esclarecida (Debierre-Grockiego et al., 2003; Mun et al., 2003).

GRA15, uma das proteínas presentes nos grânulos densos, também mostrou-se importante na indução de IL-12 em cepas do tipo II. A expressão de GRA15 do tipo II em cepas do tipo I faz com que esta induza a produção de IL-12 (Rosowski et al., 2011). A deleção de GRA15 em cepas do tipo II impede a translocação de NF- $\kappa$ B, mas o mecanismo pelo qual GRA15 ativa NF- $\kappa$ B ainda não é conhecido. A produção de IL-12 dependente de GRA15 é dependente de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral) e IRAK1 (quinase associada ao receptor de IL-1), proteínas quinases abaixo de MyD88 na via de sinalização dos TLRs (Rosowski et al., 2011).

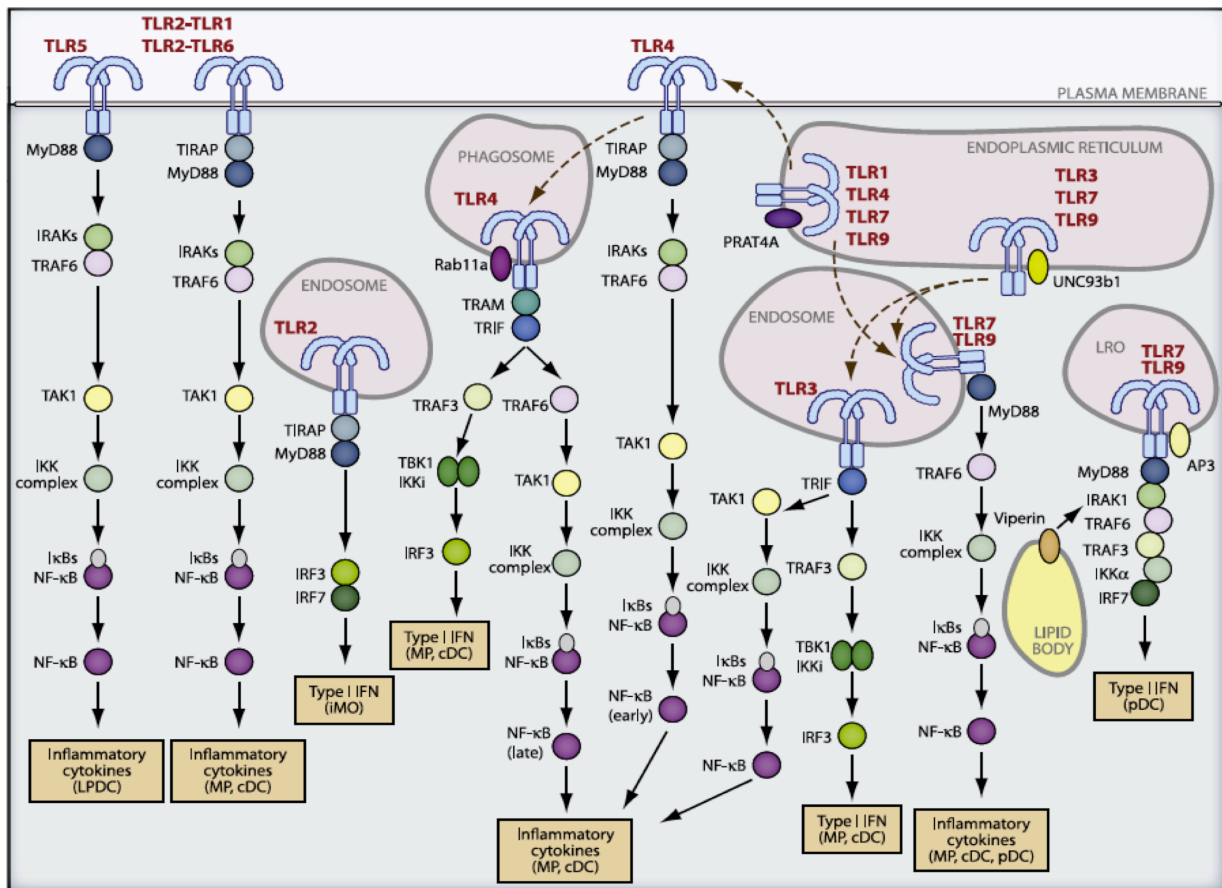
É interessante salientar que enquanto o genoma de camundongo codifica 13 TLRs, no genoma humano TLR11 é um pseudogene e TLR12 e TLR13 não estão presentes, já TLR10 é expresso em humanos mas não em camundongos (Roach et al., 2005; Rock et al., 1998; Zhang et al., 2004). Portanto, TLR11 que reconhece a profilina e induz fortemente a expressão de IL-12 em camundongos não esta presente em humanos, abrindo espaço para outros TLRs com esta função.

Como ilustrado na Figura 4, as vias de sinalização dos TLRs contam com a participação de inúmeras proteínas e levam à produção de citocinas inflamatórias. De maneira geral, uma vez ativados, os TLRs recrutam moléculas adaptadoras como MyD88 e o adaptador contendo o domínio

TIR (TIRAP), e esses por sua vez ativam o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ 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 and Akira, 2011). Uma vez ativado, o NF- $\kappa$ B migra do citoplasma para o núcleo, onde induz a transcrição de genes de moléculas coestimulatórias (CD40 e CD80), a produção de citocinas inflamatórias (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e a produção de quimiocinas (CCL5), MCP1 e proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1a), todos importantes no controle da infecção por *T. gondii* (Kawai and Akira, 2010; Miller et al., 2009).

Apesar de animais deficientes em TLRs individuais não apresentarem aumento expressivo na susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (Debierre-Grockiego et al., 2007; Yarovinsky et al., 2005), os animais deficientes em MyD88, molécula que participa da sinalização de todos os TLRs, exceto TLR3, são extremamente susceptíveis (Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008). Esses animais sucumbem após a infecção pela ausência de IL-12 e IFN- $\gamma$ , essenciais na contenção da multiplicação do parasita (Scanga et al., 2002).

Além do seu papel na via dos TLRs, MyD88 também age na via de sinalização dos receptores de IL-1 e IL-18, que também poderiam ter papel na resposta imune ao *T. gondii*. Contudo, estudos em animais deficientes nesses receptores mostraram que essas vias não participam na indução da resposta ao *T. gondii* (LaRosa et al., 2008). Estes resultados indicam que dois ou mais TLRs devem estar envolvidos no reconhecimento e na indução da resposta imune ante a infecção.



**Figura 4-** Esquema da sinalização via TLRs. Os TLRs são encontrados em vários tipos celulares como macrófagos, DCs e monócitos inflamatórios. A interação dos PAMPs com seus receptores induz mudanças conformacionais nos TLRs, que proporcionam o recrutamento de proteínas adaptadoras como MyD88 e TIRAP. O TLR5 usa MyD88 e ativa NF-κB através de complexos de quinases, o que resulta na indução de citocinas inflamatórias. Heterodímeros de TLR1/2 e TLR2/6 também são expressos na superfície celular e induzem ativação de NF-κB através do recrutamento de MyD88 e TIRAP em macrófagos e DCs convencionais. O TLR4, também expresso na superfície celular, transmite sinais para fase inicial de ativação do NF-κB pelo recrutamento de MyD88 e TIRAP. 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 endossomo onde reconhecem seus ligantes. A proteína UNC93B1, interage com esses TLRs no RE e medeia sua translocação para os endossomos. O TLR3 ativa a via dependente do adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN-β (TRIF) e induz IFN do tipo I e citocinas inflamatórias em macrófagos e DCs (Kawai and Akira, 2011).



Utilizando uma técnica de indução de mutação em linhagem germinativa e posteriormente identificação das mesmas, Tabeta e colaboradores identificaram uma mutação na proteína UNC93B1 em camundongos, que foi denominada 3d (triplo deficiente) (Tabeta et al., 2006), uma vez que apresentaram defeito na sinalização via os TLRs intracelulares (NAS-TLRs) TLR3, 7 e 9. Essa mutação pontual com a troca da Histidina 412 por uma Arginina (H412R), faz com que a proteína mutada seja incapaz de se ligar aos TLRs intracelulares (Brinkmann et al., 2007; Tabeta et al., 2006), portanto não mediando a translocação dos mesmos para o endossomo, onde estes TLRs respondem aos estímulos (Kim et al., 2008). Esta mutação no gene de UNC93B1 faz com que a produção de citocinas e a expressão de moléculas coestimulatórias induzidas em resposta à TLR7 e TLR9 sejam defeituosas (Tabeta et al., 2006).

Tem sido identificados diversos fenótipos devido à deficiência na atividade de UNC93B1. Foi demonstrado que crianças com mutação pontual no gene de UNC93B1 possuem um defeito na resposta celular antiviral, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , e maior susceptibilidade à infecção com Herpes simples 1 (HSV1)(Casrouge et al., 2006). Em outro estudo envolvendo pacientes com Lupus eritematoso, a superexpressão de UNC93B1 e TLR9 pode estar ligada à resposta exacerbada nestes pacientes (Nakano et al., 2010).

Foi demonstrado por nosso grupo que camundongos 3d são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, tendo um grande defeito na produção de IL-12 e atraso na produção de IFN- $\gamma$ , levando a um crescimento exacerbado do parasita e à morte do hospedeiro (Melo et al., 2010). Também foi observado um defeito parcial na ativação de APCs e de linfócitos T. Utilizando-se animais quimeras por transplante de medula óssea, foi demonstrado que as células 3d de linhagem hematopoiéticas são responsáveis pela susceptibilidade ao *T. gondii*, e que macrófagos 3d tem defeito no controle do parasita *in vitro*, mas não na atividade das GTPases induzidas por IFN- $\gamma$  (Melo et al., 2010). Somando-se a isso, o transporte de TLR11 para os endossomos também é mediado por UNC93B1, o que poderia além de TLR3, TLR7 e TLR9 estar contribuindo para o fenótipo de susceptibilidade do camundongo 3d (Pifer et al., 2011).

Contudo, os TLRs específicos importantes para o reconhecimento do *T. gondii* e início da resposta imune inata eficiente, e responsáveis pelo fenótipo de susceptibilidade de camundongos MyD88 e 3d, ainda não foram identificados. Apesar de humanos serem considerados hospedeiros acidentais, aproximadamente 30% da população mundial é infectada pelo *T. gondii* (Robert-Gangneux and Darde, 2012). Portanto, a identificação dos TLRs envolvidos no reconhecimento ao

*T. gondii* em camundongos e principalmente em humanos, é de grande valia para o entendimento da resposta imune e para possíveis estratégias de combate ao parasita. Nesta tese, foram utilizadas diferentes combinações de animais deficientes em TLRs intracelulares para identificarmos os TLRs responsáveis pelo reconhecimento do parasita em camundongos, e os possíveis TLRs importantes em humanos

## 2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose causada pelo parasita *Toxoplasma gondii* é uma das infestações parasíticas mais comuns em humanos e em animais de sangue quente. O *T. gondii* pode infectar virtualmente todos animais de sangue quente, e mais de 300 espécies de aves e mamíferos já foram descritas. Além do aspecto médico, a doença também se destaca como uma parasitose veterinária importante. Anualmente, rebanhos de suínos e ovinos sofrem perdas significativas devido a mortes neonatais e abortos. Além disso, quando ingeridas cruas ou mal passadas, vísceras e carnes de animais domésticos contaminadas pelo parasita são importantes fontes de infecção, tanto para humanos quanto para outros carnívoros.

Apesar de animais deficientes em TLRs individuais não apresentarem aumento expressivo na susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, animais deficientes em MyD88, molécula que participa da sinalização de todos os TLRs, exceto TLR3, e animais 3d, deficientes na resposta a TLRs intracelulares, são extremamente susceptíveis. Esses animais sucumbem após a infecção pela ausência de IL-12 e IFN- $\gamma$ , essenciais na contenção da multiplicação do parasita. Contudo, os TLRs específicos importantes para o reconhecimento do *T. gondii* e início da resposta imune inata eficiente, e responsáveis pelo fenótipo de susceptibilidade de camundongos MyD88 e 3d, ainda não foram identificados. Através desta identificação, além da geração de conhecimento sobre a resposta imune em camundongos após a infecção pelo *T. gondii*, esses dados poderão ser usados para avaliação da resposta em humanos e contribuir para um melhor entendimento da resposta e posteriores tentativas vacinais, tanto para humanos quanto para rebanhos ovinos e suínos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Identificar os Receptores do tipo Toll (TLRs) endossomais envolvidos no reconhecimento e no início da resposta imune inata na infecção por *Toxoplasma gondii*.

### 3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o mecanismo pelo qual UNC93B1 esta envolvida na resistência à infecção por *T. gondii*.
- II. Avaliar o papel de DNA e RNA de *T. gondii* na ativação de células humanas e murinas.
- III. Avaliar a resposta imune inata e a susceptibilidade de diferentes camundongos nocautes para TLRs endossomais após à infecção por *T. gondii*
- IV. Estudar o papel de TLR12 na infecção por *T. gondii*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Comitê de Ética.

Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Associação Americana para experimentação Animal (AALAS). Todos os protocolos desenvolvidos para este projeto foram aprovados pelo Comitê Institucional de uso animal (IACUC-A1817) da Universidade de Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts. Os experimentos utilizando PBMCs humanas foram aprovados pelo Conselho Institucional de Pesquisa da Universidade de Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts (IRB-UMMS H-12328), e pelo Comitê de Ética em experimentação Humana do CPqRR-FIOCRUZ (CEP-CPqRR 11/2006) bem como pelo Comitê Nacional de Ética (CONEP 13.368)

### 4.2 Cultivo celular.

Células embrionárias renais humanas (HEK293T), fibroblastos humanos (Hs27) e macrófagos murinos previamente imortalizados de camundongos C57BL/6 foram utilizados em nossos experimentos. Todas as linhagens celulares foram mantidas em garrafas de cultura em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*- Sigma), acrescidos de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.3 Animais.

Camundongos C57BL/6 foram obtidos da Jackson Laboratory. Camundongos UNC93B1 mutantes (3d) foram gerados e cedidos pelo Dr. Bruce Beutler, Scripps Research Institute, La Jolla, Califórnia (Tabeta et al., 2006). Camundongos TLR3, TLR7, TLR9 e TLR11 foram cedidos pelo Dr. Shizuo Akira, Universidade Osaka, Japão e Dr. Richard Flavell, Universidade Yale, Connecticut, EUA, respectivamente. Camundongos TLR12 foram cedidos pelo Dr. Sankar Ghosh,

Universidade Columbia, Nova Iorque, EUA. Através de intercruzamento foram gerados camundongos deficientes em TLR3/7, TLR7/9, TLR7/8, TLR3/7/9, TLR7/9/11 e TLR3/7/9/11. Camundongos fêmeas, selvagens e nocautes, com idade entre 6-8 semanas, foram utilizados em todos os experimentos. Os camundongos foram criados e mantidos em condições livres de patógenos no biotério da Universidade de Massachusetts Medical School.

#### **4.4 Parasitas e Infecções *in vivo*.**

Nos experimentos *in vivo*, foram utilizados cistos da cepa ME49 de *T. gondii* (Lunde and Jacobs, 1983). A sua manutenção foi realizada através da infecção intraperitoneal de cistos em camundongos C57BL/6. Os cistos obtidos através da maceração em PBS do cérebro de animais infectados foram empregados nos experimentos. Taquizoítos de RH, ME49 e cps1.1 foram mantidas em fibroblastos humanos (Hs27) por passagens semanais como descrito (Lock, 1953). No caso de cps1.1, 0,3 mM de uracil foi adicionado ao meio de crescimento. A cepa RH foi empregada para obtenção de antígeno total de taquizoítos (STAg) de acordo com protocolo descrito por Giraldo e colaboradores (Giraldo et al., 2000). Camundongos foram inoculados por via intraperitoneal (ip) com 25 cistos da cepa ME49 obtidos a partir de homogenatos de cérebro de camundongos infectados. Os camundongos foram monitorizados para a sobrevivência ou sacrificados após 0, 3, 5 e 8 dias de infecção, para retirar células do exudado peritoneal, sangue e órgãos (baço, fígado e pulmão). Amostras de cada animal foram processadas e analisadas individualmente. A vacinação com taquizoítos da cepa cps1.1 foi realizada por injeções intraperitoneais de  $2 \times 10^4$  e  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  em intervalos quinzenais. Para reconstituição de citocinas *in vivo*, os camundongos receberam injeções diárias (100ng/camundongo) via intraperitoneal de IL-12p70 recombinante (eBioscience) em 150µl de PBS ou veículo sozinho à partir do primeiro dia até o sexto dia de infecção.

#### 4.5 Amplificação da região codificadora de TLR11 e TLR12 murino.

Para a reação em cadeia pela Polimerase (PCR) foram utilizados os vetores pUNO-mTLR11 e pUNO-mTLR12 (InvivoGen) como moldes, na concentração de 100ng/μL. Nesta reação foram utilizadas 1,0μL AccuPrime DNA polimerase (Invitrogen) e uma mistura contendo nas concentrações finais: 2μL dNTPs (2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 2mM dTTP), 2μL de Tampão AccuPrime 10X (Invitrogen), 1μL do iniciador TLR11 direto 5'-CGTACGAATTCTTATGGGCAGGTACTGGCTG-3' (iniciador *EcoRI*), 1μL do iniciador TLR11 reverso 5'-ACTGCACTCGAGTTACCCTAGCCTGCTCCT-3' (iniciador *XhoI*), ou 1μL do iniciador TLR12 direto 5'-GAGATCAGGATCCACCATGCCAAGGATGGAAAGACATCAGT-3' (iniciador *BsiWI*), 1μL do iniciador TLR12 reverso 5'-CTGCAGCTCGAGATCTCTTTCTTGTCCAGCTTTGCT-3' (iniciador *XhoI*) e 12μL de H<sub>2</sub>O livre de nucleases. O volume final da reação foi de 20μL. A reação ocorreu por 32 ciclos de 95°C/3 min, 95°C/45 seg, 60°C/30 seg, 68°C/2 min e um último ciclo de extensão a 68°C/10 min. As amostras foram diluídas em tampão 6x de amostra para DNA (Tampão 6X 0,25% azul de bromofenol, 0,25% etilenoglicol, 30% de glicerol em H<sub>2</sub>O), e os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose a 1% em TAE 1x (0,04 M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo (0,5μg/ml) de brometo de etídio. Os DNAs fracionados no gel foram visualizados em transiluminador-UV (ultra violeta).

#### 4.6 Clonagem de TLR11 e TLR12 murino nos vetores lentivirais pRP-cerulean, pRZ-citrine e pRH-mcherry.

Para a ligação do DNA correspondente à TLR11 e TLR12 murino obtidos como descrito no item anterior, nos vetores selecionados para expressão em fusão a proteínas fluorescentes, procedeu-se à digestão enzimática dos produtos de PCR utilizando 4μL das enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* para TLR11 e *BsiWI* e *XhoI* (New England Biolabs) para TLR12, 0,4 μL de BSA 100x, 4μL de tampão quatro 10X e 7,6μL de H<sub>2</sub>O estéril. A reação foi incubada à 37°C por 2 h e o resultado verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e observado em luz U.V. O fragmento digerido foi excisado do gel com o auxílio de um bisturi, pesado e purificado com QIAEX® II Gel Extraction Kit segundo protocolo do fabricante. Vinte microlitros dos vetores

(10µg), pRP-cerulean, pRZ-citrine e pRH-mcherry, modificados à partir do vetor pCLXSN (Imgenex) foram digeridos utilizando 4µL das enzimas *EcoRI* e *XhoI* para TLR11 e *BsiWI* e *XhoI* para TLR12 e os outros reagentes necessários para uma reação cujo volume final foi de 40µL. A reação foi incubada à 37°C por 2 h e o fragmento digerido foi excisado do gel e purificado com o Kit citado anteriormente. O inserto e os vetores foram quantificados e utilizados para a reação de ligação com 2µL dos vetores e 6µL do inserto do cDNA de TLR11 ou TLR12, dando uma proporção de 6:1 (inserto:vetor). Dois microlitros de T4 DNA ligase (Invitrogen) e 5µL de tampão 5X (Invitrogen) foram adicionados a cada reação com um volume final de 25µL. A reação foi incubada a 23°C por 16 hrs. A transformação bacteriana foi feita adicionando 10µL da reação de ligação com 50µL de células bacterianas XL1-Blue (*E. coli*) quimicamente competentes. A mistura foi incubada no gelo durante 30 min. Posteriormente foi feito choque térmico pela incubação por 1 min a 42°C, seguido pela incubação em gelo por 1 minuto. As bactérias foram crescidas, sob agitação, a 37°C por 1 h em meio LB (1% NaCl, 1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, pH 7.2) sem antibiótico. Aliquotas da suspensão bacteriana foram plaqueadas em meio LB ágar (meio sólido) contendo 100µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas.

Para análise da clonagem foram selecionados clones aleatórios e procedeu-se a preparação do DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram submetidos à análise de restrição. As digestões enzimáticas de 5µL do produto de extração plasmidial foram feitas com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* para TLR11 e *BsiWI* e *XhoI* para TLR12. Foram utilizados, para cada reação, 1 µL das enzimas, tampão 10X específico para a enzima segundo catálogo do fabricante, BSA 100x e H<sub>2</sub>O Milli-Q autoclavada suficiente para reações de 20 µL. As misturas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 min e fracionadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. O gel foi observado em luz U.V.

As construções de TLR11 e TLR12 fusionadas a Ha ou Flag foram feitas a partir do vetor pRH-TLR11mcherry e pRH-TLR12mCherry. A porção codificadora da proteína mCherry foi deletada do vetor através de digestão enzimática com as enzimas *XhoI* e *NotI*, e oligonucleotídeos com as sequências de Ha e Flag foram sintetizados com as extremidades formando sítios coesivos para *XhoI* e *NotI*. Os vetores e oligonucleotídeos foram utilizados na reação de ligação e



posteriormente transformados, e as colônias avaliadas por digestão enzimática. Todas as construções foram analisadas e confirmadas por sequenciamento.

#### **4.7 Construção de macrófagos estavelmente expressando TLR11 e TLR12.**

Retrovírus recombinantes carreando os genes para TLR11 ou TLR12 murinos foram produzidos como descrito (Mann et al., 1983). Resumidamente, HEK293T foram co-transfectadas com os vetores que codificam TLR11 ou TLR12 e os plasmídeos para a expressão dos genes retrovirais gag-pol e da proteína VSV-G do envelope, utilizando GeneJuice (Novagen) como reagente de transfecção de acordo com as instruções do fabricante. Os sobrenadantes foram coletados 40, 64 e 88hs após a transfecção.

Macrófagos selvagens foram infectados por 48hs com o sobrenadante contendo os vírus e as células foram selecionadas com 500µg/ml de Higromicina B (Invitrogen) para o vetor pRH-mcherry, 1mg/ml de Zeocina (Invitrogen) para o vetor pRZ-citrine e 10µg/ml de Puromicina (Cellgro) para o vetor pRP-cerulean. Após 3 semanas de seleção a expressão das proteínas foi avaliada por microscopia confocal.

#### **4.8 Análise do genoma do *Toxoplasma gondii* em busca de sequências estimulatórias para TLR9.**

Ambos os motivos CpG de classe B murino e de classe B e C humanos foram avaliados em ambas as fitas de DNA do genoma do *Toxoplasma gondii* ME49 (liberado 7.2, 27 out 2011) baixados do site ToxoDB (<http://toxodb.org/common/downloads/>). Sequências que correspondem aos seguintes padrões foram selecionadas: Humana [CT] [CT] GTCGTN (1,5) GTCGT [CT]; e murina [CT] [CT] GACGTN (1,5) GACGT [CT]. Resíduos entre parêntesis indicam ambiguidades aceitáveis nas posições especificadas, N indica qualquer nucleotídeo, e os números entre parêntesis indicam o número de vezes que os resíduos podem aparecer nessa posição. Para procurar motivos CpG de classe C, foi utilizado o padrão anteriormente descrito de nucleotídeos de T ou C na

extremidade 5' seguido pelo motivo estimulatório GTCGTT e uma sequência palindrômica rica em GC (Vollmer, 2006).

#### **4.9 Experimentos de microscopia confocal.**

Para os experimentos de microscopia confocal utilizamos um microscópio invertido Leica LSM TSC SP2 AOBS e uma lente objetiva 1,4 NA 63x (Zeiss). Nos experimentos de localização subcelular de TLR11 e TLR12, as células foram cultivadas em placas de cultura de 35mm (Matek) e marcadas com Cholera Toxin B-Fitc (Sigma) para marcação da membrana plasmática, ER-Tracker White-Blue (Molecular Probes) para marcação de retículo endoplasmático, LysoTracker White-Blue (Molecular Probes) para marcação de organelas ácidas e Hoescht 33342 (Thermo scientific) para marcação do núcleo. Nos experimentos de infecção de macrófagos TLR9 nocaute expressando TLR9 murino fusionado a GFP, as células foram cultivadas em placa de cultura de 35mm e os parasitas marcados com CMTPX Red (Molecular Probes). Após 2h as imagens foram adquiridas. Imagens com dupla ou tripla marcação foram adquiridas por varredura consecutiva com apenas um laser ativo por varredura para evitar a excitação cruzada. Para avaliação da formação de heterodímeros utilizamos a técnica de FRET (*Fluorescence Energy Resonance Transfer*), uma técnica de imagem não invasiva utilizada para determinar a proximidade de proteínas. O FRET ocorre quando a distância entre as moléculas está entre 1-10nm. A técnica envolve transferência de energia não radioativa a partir do estado excitado do doador para um acceptor adequado. Para os experimentos de FRET, células HEK293T foram semeadas em placas de 35mm a uma densidade de 150.000 células/placa. No dia seguinte, as células foram transfectadas com os plasmídeos indicados e 48 horas após a transfecção foram estimuladas durante 4 hrs com STAg ou rTgPRF. FRET entre as respectivas proteínas foi calculado medindo-se a emissão da fluorescência do acceptor utilizando o programa no microscópio Leica SP2. Em todos os casos, a proteína cerulean foi utilizada como doador, ao passo que a proteína citrine foi utilizada como acceptor. Os comprimentos de onda de excitação para o doador e o acceptor foram 405nm e 514nm, respectivamente. A eficiência do FRET é mostrada como uma escala de cores com valores entre 0 e 100%. A média de três regiões foi utilizada para quantificar a eficiência de FRET para cada amostra.

#### **4.10 Transplante de medula óssea.**

Foram utilizados camundongos B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ como receptores de medula óssea para o experimento em questão. Foi dada uma dose de radiação corporal letal (900 rads) e os animais foram reconstituídos por via intravenosa com 5-10 milhões de células de medula óssea dentro de 4 h após a irradiação. As suspensões de células de medula óssea foram preparadas através da lavagem da tíbia e fêmur com PBS em seringa com agulha de 26G. Os camundongos B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ foram utilizados como receptores e como doadores (WT – marcador cd45.1), e os camundongos 3d (marcador cd45.2) como doadores. Os camundongos WT foram repopulados com células dos animais WT, 3d ou uma mistura na proporção de 1:1 de células WT e células 3d. Nos camundongos irradiados e reconstituídos, foram administrados em sua mamadeira com água 150 mg/ml de sulfametoxazol e 30 mg/ml de Trimetoprima durante 6 semanas. Depois disso, os animais foram transferidos para água potável estéril, assegurando assim que o tratamento com antibióticos não afetaria a subsequente infecção com *T. gondii*. Os camundongos foram utilizados para a infecção experimental ou para a análise de quimerismo 10 semanas após o transplante.

#### **4.11 Purificação Celular.**

Células peritoneais foram retiradas injetando 8ml de meio DMEM utilizando uma seringa com agulha de 21 Gauge. Células CD11c+ e CD11b+ foram purificadas utilizando o Kit EasySep® para seleção positiva de CD11c e CD11b de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, os baços foram recolhidos a partir de camundongos selvagens e nocautes, e digeridos com colagenase D (Sigma) em DMEM durante 30 minutos. As hemácias foram lisadas e as células foram incubadas com anticorpo anti-receptor Fc durante 10 min, reagente de marcação CD11c ou CD11b PE durante 15 min, coquetel PE de seleção por 15min, e esferas magnéticas durante 10 min. Quando necessário, as células CD11c+ foram marcadas com anti-CD8APC e separados para PE (CD11c+) ou PE/APC (CD11c+/CD8+). A pureza das células foi verificada por FACS.

#### **4.12 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs).**

Para o isolamento das PBMCs humanas, foi utilizado o método de centrifugação por gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich). Um total de 40ml de sangue estéril foi obtido de cada paciente e diluído 1:1 em PBS e adicionado 15ml de Ficoll para cada 35ml de Sangue/PBS. O material foi centrifugado a 400 x g por 30min a temperatura ambiente. O anel contendo as PBMCs foi coletado e posteriormente lavado três vezes com meio DMEM (Sigma Aldrich). Para os experimentos de estimulação celular as mesmas foram contadas em câmara de Neubauer e foram utilizadas  $3 \times 10^5$  células por poço.

#### **4.13 ELISA para dosagem de citocinas.**

Os níveis das citocinas foram dosados em diferentes tempos após as infecções e/ou estimulações *in vitro*. As dosagens foram feitas no lavado peritoneal, soro e nos sobrenadantes de macrófagos, células dendríticas e esplenócitos expostos a diferentes estímulos. Nas amostras experimentais foram dosados os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p40/70, IL-6 e MCP1 utilizando os kits Mouse DuoSet ELISA (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as placas foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em PBS por 16hs à temperatura ambiente e posteriormente foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS + 1% BSA ou PBS 0,1% BSA dependendo da citocina), e as amostras foram plaqueadas e incubadas por 2hs. Após as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por 2hs e estreptavidina-peroxidase por 30min. A revelação foi feita com 10 ml de tampão citrato-fosfato (0.05M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05M  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) contendo 100 $\mu\text{L}$  de TMB e 30 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  40v. A reação foi parada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:20) e a leitura foi feita a 450nm em espectrofotômetro. Os níveis de IL-12p40, IL-12p70, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  humanos foram dosados nos sobrenadantes de PBMCs humanos após a estimulação com os respectivos estímulos utilizando o kit de CBA inflamatório humano (BD Bioscience) ou o kit Human IL-12p40 DuoSet ELISA (R&D Systems) de acordo com o fabricante.

#### 4.14 Citometria de fluxo.

Para verificarmos qual população celular é a responsável pela produção de IL-12 após a infecção por *T. gondii*, utilizamos a técnica de citometria de fluxo. Para este experimento, as células peritoneais foram utilizadas no quinto dia pós infecção. Após obtenção das células peritoneais como descrito anteriormente, as células foram cultivadas por 8h na presença de GolgiPlug (BD Bioscience) para inibição do transporte de proteínas e consequentemente liberação de citocinas. Após a incubação as células foram marcadas durante 30 minutos com anticorpos conjugados contra os marcadores de superfície CD11b, CD11c, GR1, F4/80 e MHC-II (eBioscience) em tampão de incubação (PBS + BSA 1%) para identificação de células dendríticas, neutrófilos e monócitos inflamatórios. Após três lavagens com tampão de incubação, as células foram fixadas com formaldeído 4% por 15min e permeabilizadas com tampão de permeabilização (PBS + 0,5% Tween®20) por 30min. Após este passo, as células foram lavadas por 3 vezes e incubadas com anti-IL12 PE (BD Bioscience) em tampão de permeabilização durante 30 min. As células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo em um citometro LSRII (BD Bioscience). Os dados foram adquiridos com software DIVA (BD Bioscience) e analisados em FlowJo (Tree Star). Para os experimentos utilizando animais quimeras, além dos anticorpos citados anteriormente também foram utilizados os anticorpos para marcação de cd45.1 (células do camundongo WT) e cd45.2 (células do camundongo 3d). Nestes experimentos a infecção foi feita com a Cepa Pru-GFP também do tipo II.

#### 4.15 Real-Time PCR para quantificação de DNA de *T. gondii* e expressão de TLRs.

Células do exudado peritoneal, baço e fígado de camundongos nos dias 0, 3, 5 ou 8 após à infecção com *Toxoplasma gondii* foram recolhidos e o DNA total extraído usando o Tissue and Blood DNeasy kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers utilizados para amplificação do gene B1 do *Toxoplasma gondii* (Direto: 5'-CTGGCAAATACAGGTGAAATG-3' e Reverso: 5'-GTGTACTGCGAAAATGAATCC-3') foram selecionados utilizando o programa PrimerSelect (Lasergene software suite, DNASTAR). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25µl utilizando 5ng de DNA total dos tecidos, 200ng de cada primer e 1x supermix

iQ SYBR Green (BioRad). Análise quantitativa da RT-PCR foi realizada utilizando DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler (MJ Research). A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra por análise da curva de anelamento dos primers. A quantificação relativa foi realizada utilizando análise da curva padrão de DNA purificado de taquizoítos de ME49 e os resultados foram expressos como pg de DNA do parasita por mg de tecido de DNA total. Para quantificação da expressão dos TLRs nas células CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>, as células foram purificadas como descrito anteriormente e o RNA extraído usando RNesy Kit (Qiagen). Após a transcrição reversa de 0,8µg de RNA utilizando ProtoScript® AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs), PCR quantitativo utilizando 1x supermix iQ SYBR Green foi realizado. Os primers utilizados foram: TLR3 direto: 5'-ATAAAATCCTTGCGTTGCGAAGT -3'; TLR3 Reverso: 5'-TGTTCAAGAGGAGGGCGAATAA-3'; TLR7 direto: 5' TCTTTGGGTTTCGATGGTTTCC-3'; TLR7 Reverso: 5'-GCAGTCCACGATCACATGGG -3'; TLR9 direto: 5'-ACGGGAAGTCTACTACAAGA-3'; TLR9 Reverso: 5'-CCCAGCTTGACAATGAGGTTAT-3'; TLR11 direto: 5'-AGAGCTGGCTGGTATGTTCC-3'; TLR11 Reverso: 5'-GTGTTCTTGTCAGGTCCAGAATC-3'; TLR12 direto: 5'-CCAGGACTGCACCTTTTGG-3'; TLR12 Reverso: 5'-GTGACACTGGTTGTACGCAAT -3'.

#### **4.16 Ensaio de Luciferase.**

Para avaliação da ativação de TLR9 humano por oligonucleotídeos contendo motivos CpG derivados do genoma do *Toxoplasma gondii* e identificados como descrito anteriormente, foram utilizadas células HEK293T expressando de forma estável TLR9 humano e o gene da luciferase sob o controle do promotor pELAM contendo sítios sob indução de NF-κB. Utilizou-se também o vetor PRL contendo o gene da luciferase Renilla (Promega) para a expressão constitutiva da proteína para controle positivo da atividade.

No dia anterior, 2 x 10<sup>4</sup> células foram semeadas em placas de 96 wells e 24h após foram estimuladas com diferentes concentrações do oligonucleotídeos derivados de *T. gondii* ou CpG 2007 ou 2395 como controles positivos ou deixadas somente em meio DMEM. Após 24h de estimulação, as células foram lavadas com PBS e o ensaio foi realizado de acordo com o fabricante do Kit Dual Luciferase Report Assay (Promega). As células foram lisadas por 15 min em 50ul de

tampão de lise e 30ul foram transferidos para uma placa branca de 96 wells. Inicialmente foram adicionados 30ul do substrato de luciferase e rapidamente lido em leitor de Elisa. Na sequência foi adicionado o substrato Stop and Glo para medir a atividade constitutiva da Renilla e também lido rapidamente em leitor de Elisa. As unidades relativas de luciferase foram calculadas através da normalização dos valores de luminescência emitidos pela atividade da luciferase divididas pelo valor de emissão pela atividade constitutiva da Renilla.

#### **4.17 Imunoprecipitação e Western Blotting.**

Para os experimentos de imunoprecipitação, células HEK293T foram semeadas em placas de 6 wells e transfectadas com Genejuice (Novagen) de acordo com as instruções do fabricante. Nos experimentos, foi utilizado o plasmídeo pRH-TLR11Ha como isca e os plasmídeos pcDNA3-TLR3FLAG, pcDNA3-TLR4FLAG, pcDNA3-TLR7FLAG, pRZ-TLR11ceruleanFLAG, pRZ-TLR12ceruleanFLAG como presa. Quarenta e oito horas após a transfecção as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Sigma) com adição de inibidores de Protease (Roche). Os lisados celulares foram centrifugados e as proteínas foram dosadas por Bradford. Um miligrama de proteína total foi utilizado para imunoprecipitação com 2ug de anticorpo monoclonal anti-hemaglutinina (Sigma) e 30ul de proteína A agarose (Invitrogen). Após 24h as beads de agarose foram lavadas com PBS. Primeiramente, as amostras foram fracionadas em SDS-PAGE 8% e em seguida transferidas para uma membrana de PVDF por 1h a 250mA no gelo. Posteriormente a membrana foi incubada em solução de bloqueio (PBS1x 0,01M de NaHPO<sub>4</sub>, 0,15M de NaCl, pH 7,2, 5% de leite em pó desnatado, 0,1% Tween®20), por 1h sob agitação à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram diluídos na mesma solução. Foi utilizado o anti-FLAG (FLAG: *Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys*) (Sigma), na diluição de 1:2000, e o anticorpo monoclonal anti-Ha (Ha: *Tyr, Pro, Tyr, Asp, Val, Pro, Asp, Tyr, Ala*) (Sigma), na diluição 1:1500. O anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Bio-Rad) foi utilizado na diluição de 1:15000. Entre os anticorpos primários e secundários, a membrana foi lavada por 10 min por três vezes com PBS1x pH 7,2 com 0,1% Tween®20. A revelação foi feita em câmara escura utilizando reagente para quimioluminescência “ECL plus *Western Blotting* Detection System” (Amersham Biosciences) e revelado em filme Raio-X (Kodak).

#### **4.18 Análise estatística.**

Todos os dados foram analisados utilizando o teste T de student não pareado de duas caudas com um intervalo de confiança de 95% (Prism; GraphPad Software, Inc.). Todos os dados foram representados como  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ .



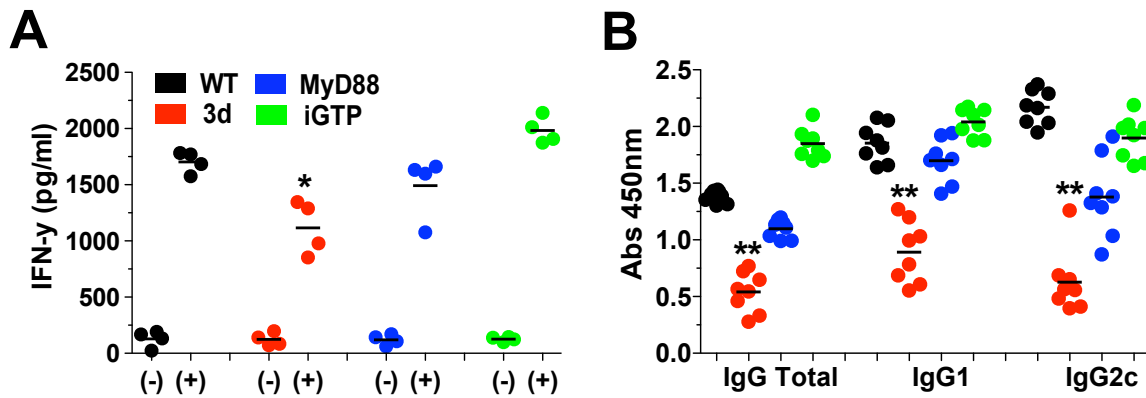
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Células expressando UNC93B1 mutada (3d) são capazes de controlar a infecção por *Toxoplasma gondii* *in vivo* após vacinação com a cepa CPS 1.1.

Tabeta e colaboradores, utilizando a técnica de indução de mutações em células da linhagem germinativa, e posterior triagem, identificaram que uma mutação pontual no gene da proteína UNC93B1, gerava uma proteína incapaz de responder aos agonistas dos TLRs 3, 7 e 9 (Tabeta et al., 2006). Nosso grupo demonstrou que animais 3d são altamente susceptíveis à infecção pela cepa avirulenta do tipo II, ME49 (Melo et al., 2010). Esses animais possuem um grande defeito na produção de IL-12 e atraso na produção de IFN- $\gamma$ . Os autores demonstraram que após a infecção de macrófagos imortalizados com taquizoítos de *T. gondii*, UNC93B1 transloca para o PV, indicando um possível papel de UNC93B1 no controle do crescimento do parasita no PV, e não somente na translocação dos TLRs. Também foi demonstrado que macrófagos 3d infectados *in vitro*, são mais permissíveis ao crescimento do parasita (Melo et al., 2010).

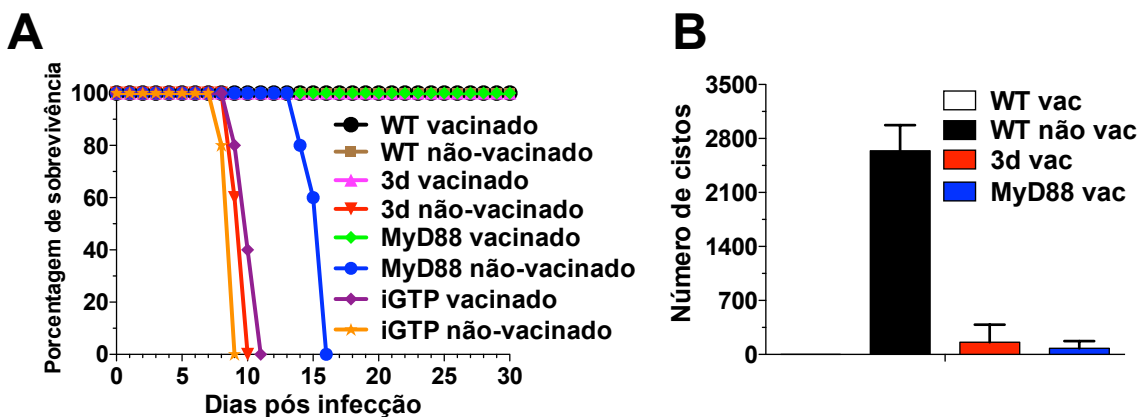
Para avaliar o papel de UNC93B1 no controle da infecção pelo *T. gondii* *in vivo*, utilizamos um protocolo de vacinação anteriormente utilizado (Sukhumavasi et al., 2008), para avaliar a geração de uma resposta imune capaz de controlar a infecção. Animais deficientes na molécula adaptadora MyD88 são altamente susceptíveis a infecção por *T. gondii* (Scanga et al., 2002), mas quando vacinados com a cepa cps1.1 auxotrófica para uracil, se tornam resistentes ao desafio com a cepa ME49 (Sukhumavasi et al., 2008).

Utilizando o mesmo protocolo de vacinação com os camundongos 3d, vimos que estes animais são capazes de desenvolver uma resposta imune com linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 5A), e linfócitos B produtores de anticorpos anti-*T. gondii* (Figura 5B). Ambas as respostas foram significativamente menores quando comparadas aos animais selvagens e iGTP nocautes.



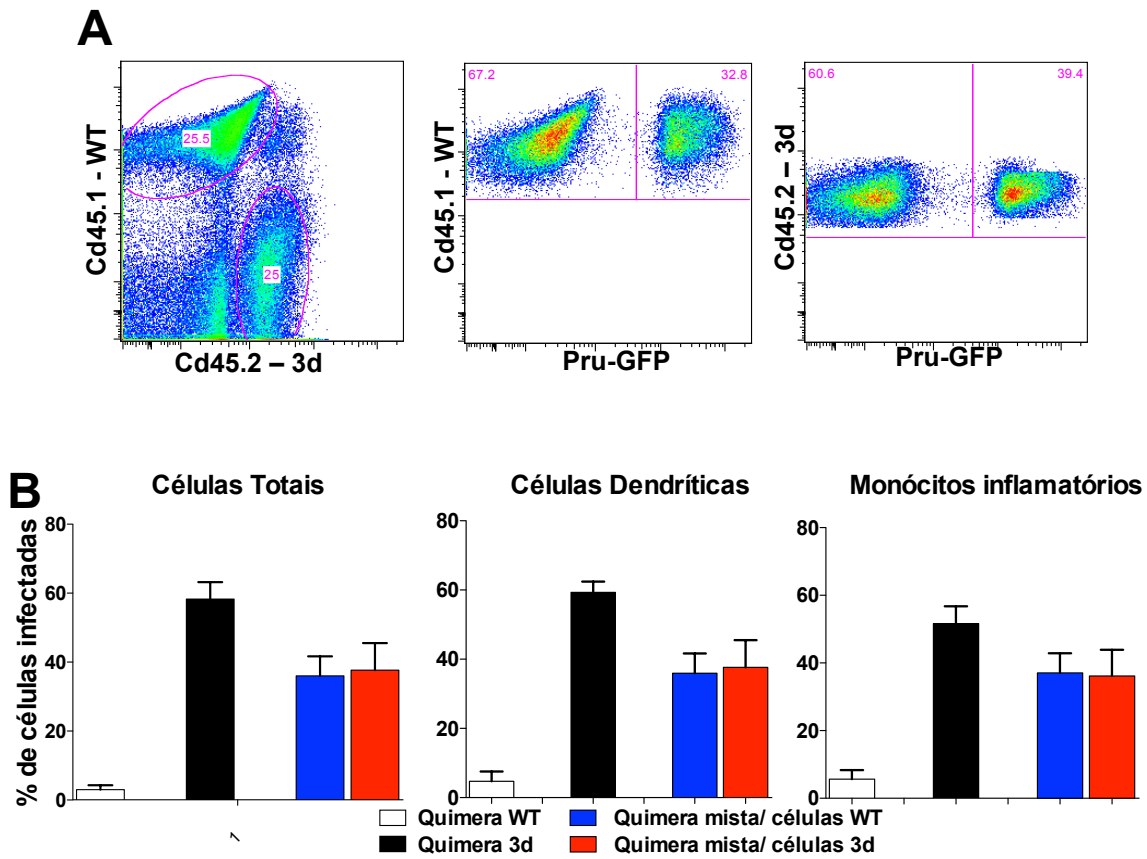
**Figura 5- Camundongos 3d são capazes de montar uma resposta imune após vacinação com uma cepa de *T. gondii* atenuada.** Camundongos WT, 3d, MyD88 e iGTP foram vacinados 3 vezes por via intraperitoneal em intervalos de 15 dias com a cepa cps1.1 de *T. gondii*. (A) Dezesete dias após a terceira imunização as células do baço foram cultivadas na presença de STAg (+) ou meio (-). Os níveis de IFN- $\gamma$  foram dosados 48 hrs após estimulação. (B) Oito dias após a terceira imunização animais foram sangrados e níveis de anticorpos avaliados por ELISA. Lisado total de taquizoítos foram utilizados como antígeno (STAg).

Apesar da resposta imune reduzida, a mesma foi suficiente para controlar a infecção após o desafio intraperitoneal com a cepa ME49 (Figura 6A e 6B). Portanto, animais 3d são capazes de desenvolver uma resposta imune após infecção com a cepa cps1.1 e sobreviver ao desafio com a cepa ME49.



**Figura 6- Camundongos 3d vacinados sobrevivem ao desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*.** Camundongos WT, 3d, MyD88 e iGTP foram vacinados 3 vezes via intraperitoneal em intervalos de 15 dias com a cepa cps1.1 de *T. gondii*. (A) Todos os grupos foram desafiados com 25 cistos, via intraperitoneal, da cepa ME49 vinte um dias após a terceira imunização, e a mortalidade avaliada. (B) Os animais sobreviventes foram mortos no dia 30 após o desafio e cistos presentes no cérebro foram contados. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos.

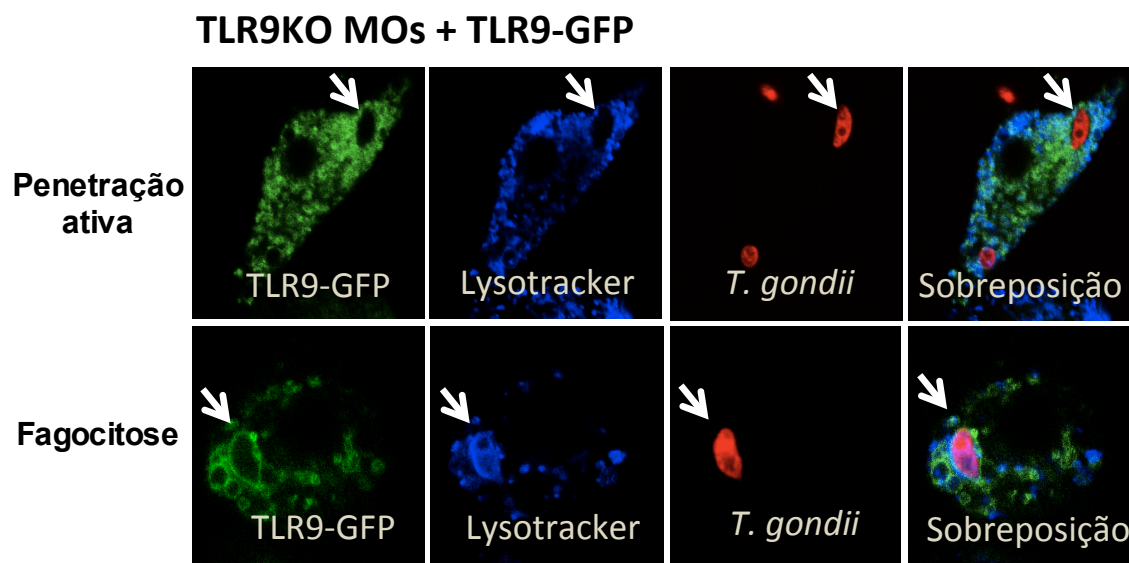
Para avaliar o papel de UNC93B1 no controle do crescimento do parasita *in vivo*, foram gerados camundongos quimeras a partir de animais selvagens e 3d. Animais selvagens, portadores do receptor cd45.1 foram irradiados, e posteriormente repopulados com células da medula óssea de camundongos selvagens, camundongos 3d, ou uma mistura de 50% de células provenientes de animais selvagens e 50% de animais 3d. Após 10 semanas os animais foram utilizados para experimentos de infecção com a cepa do tipo II Pru-GFP. Camundongos quimeras repopulados com células de camundongos WT são resistentes a infecção por *T. gondii*, ao passo que camundongos repopulados com células provenientes de camundongo 3d são susceptíveis (Melo et al., 2010). Quando avaliamos a taxa de infecção do parasita em camundongos quimeras mistas, com população de 50% de células mieloides e linfoides de animais selvagens e 50% de animais 3d, o parasita infecta na mesma proporção células provenientes de ambos animais (Figura 7A). Avaliando especificamente infecção em monócitos inflamatórios/macrófagos e em células dendríticas, observamos que o parasita é capaz de infectar e proliferar tanto nas células selvagens quanto nas células 3d (Figura 7B), sugerindo que UNC93B1, ao contrário de iGTP (Collazo et al., 2002; Melzer et al., 2008), não tem um papel direto no controle do crescimento do parasita.



**Figura 7- Células WT e 3d são igualmente infectadas pelo *T. gondii*.** Camundongos B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ (WT)(cd45.1+) e 3d (cd45.2+) foram utilizados nos experimentos de transplante de medula. Dez semanas após os transplante os animais foram infectados com 25 cistos da cepa Pru-GFP. (A) Animais repopulados com 50% de células provenientes de animais WT e 50% 3d, foram sacrificados 8 dias após a infecção e células peritoneais avaliadas por FACS para presença do parasita GFP+. Células totais foram avaliadas para os marcadores cd45.1 (WT) e cd45.2 (3d) (B) Células totais retiradas 8 dias após infecção de animais repopulados com células cd45.1+, ou células cd45.2+, ou 50% de células cd45.1 e 50% cd45.2 foram separadas em células dendríticas e monócitos inflamatórios e a porcentagem de células infectadas foi avaliada. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com 5 animais por grupo.

## 5.2 Ambos RNA e DNA purificados de taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* ativam APCs via TLRs.

Camundongos 3d são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, entretanto nenhum dos camundongos deficientes em TLRs que reconhecem ácidos nucleicos tiveram defeito na resposta imune ou foram susceptíveis à infecção (Melo et al., 2010). Tem sido constantemente demonstrado que TLRs que reconhecem ácidos nucleicos são importantes receptores no reconhecimento de vírus, bactérias e protozoários. (Alexopoulou et al., 2001; Bartholomeu et al., 2008; Drennan et al., 2005; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2000). Diferentes trabalhos tem demonstrado o papel de TLR7 e TLR9 no reconhecimento do parasita *Trypanossoma cruzi* (Bafica et al., 2006; Bartholomeu et al., 2008; Caetano et al., 2011) e também de TLR9 no reconhecimento da hemozoína do Plasmodium (Parroche et al., 2007). Para avaliarmos o papel de TLR9 no reconhecimento de *T. gondii*, macrófagos murinos imortalizados deficientes em TLR9 foram transduzidos com vírus carreando o cDNA para TLR9 murino fusionado a GFP. Os macrófagos, primados ou não com IFN- $\gamma$ , foram infectados *in vitro* com taquizoítos da cepa ME49 marcados com CMTPX vermelho e avaliados após duas horas de infecção. As células foram marcadas com LysoTracker, marcador de organelas ácidas, e avaliadas por microscopia confocal. Nossos resultados demonstram que quando o parasita penetra ativamente na célula, formando o vacúolo parasitóforo (negativo para lysotracker), não ha translocação de TLR9, mas quando o parasita é fagocitado, TLR9 transloca para o endolisossomo (positivo para lysotracker) (Figura 8).



**Figura 8- Translocação de TLR9 para o endolisossomo após fagocitose do *T. gondii*.** Macrófagos deficientes em TLR9 e expressando estavelmente TLR9-GFP não primados (superior) e primados com IFN- $\gamma$  (inferior) foram infectados com *T. gondii* corados com CMTPIX vermelho. Após 2 hrs as células foram marcadas com Lysotracker e analisadas por microscopia confocal. As setas indicam parasitas internalizados.

Este resultado sugere um potencial papel para TLR9 no reconhecimento de ácidos nucleicos liberados do parasita após fagocitose e destruição no endolisossomo. Para avaliar o papel de TLR7 e TLR9 no reconhecimento do *T. gondii*, RNA e DNA foram purificados a partir de taquizoítos altamente purificados e utilizados para estimulação *in vitro* de macrófagos imortalizados e DCs purificadas do baço. Os nossos resultados mostram que tanto RNA quanto DNA purificados do parasita foram capazes de ativar macrófagos e DCs, de uma maneira dependente de TLR7 e TLR9, respectivamente, induzindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 (Figura 9A).

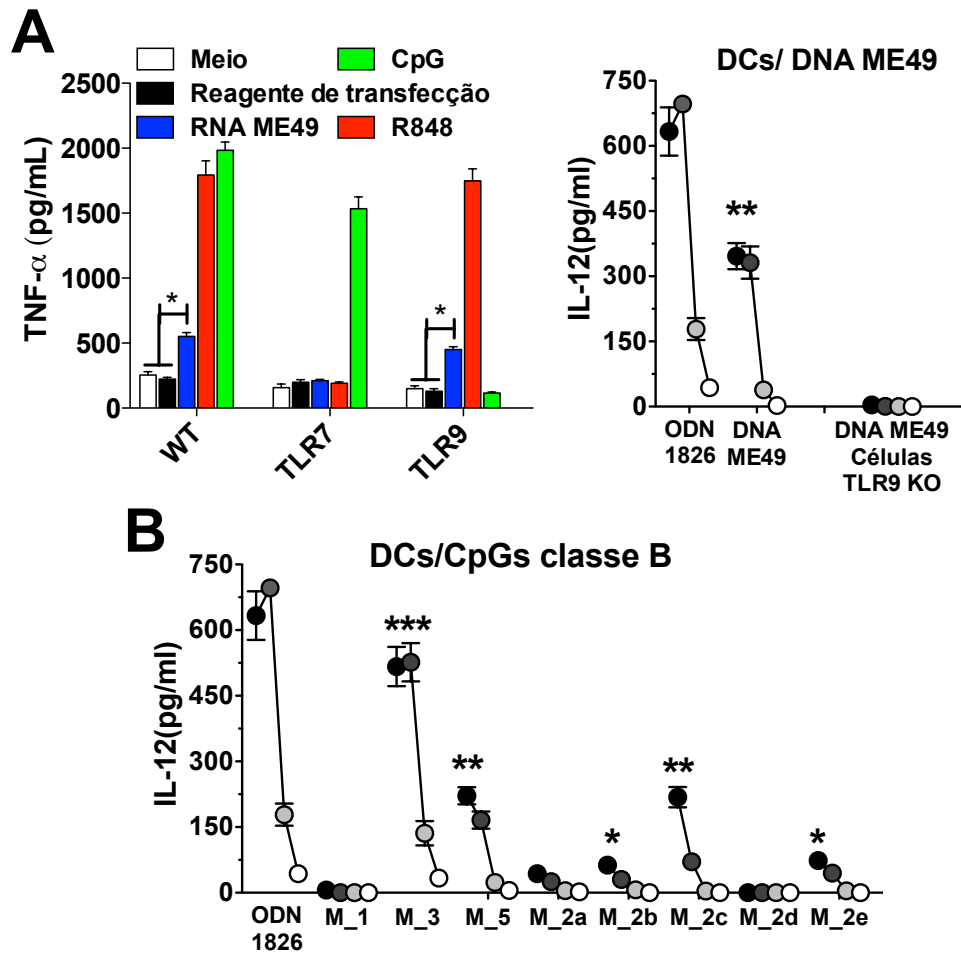
O genoma do *Toxoplasma gondii* está completamente sequenciado e disponível para consulta no banco de dados do ToxoDB website (<http://toxodb.org/common/downloads/>). Utilizando ferramentas de bioinformática previamente utilizadas (Bartholomeu et al., 2008; Parroche et al., 2007), foi procurado no genoma do *T. gondii* possíveis sequências estimulatórias contendo motivos CpG. No genoma foram identificados 93 possíveis motivos murinos de classe B, 363 possíveis motivos humanos de classe B e 67 possíveis motivos humanos de classe C, estando alguns destes representados na Tabela 1 (Anexo).

Células dendríticas purificadas do baço de camundongos selvagens foram utilizadas para estimulação *in vitro* com os oligonucleotídeos sintéticos identificados no genoma do *T. gondii*. Como visto na Figura 9B, oligonucleotídeos identificados no genoma do *Toxoplasma* contendo motivos CpG foram capazes de ativar a produção de citocinas em DCs, o que também foi observado para *T. cruzi* (Bartholomeu et al., 2008) e *Plasmodium falciparum* (Parroche et al., 2007).

### **5.3 Deficiência de receptores do tipo Toll de reconhecimento de ácidos nucléicos não recupera o fenótipo de susceptibilidade observado em camundongos 3d.**

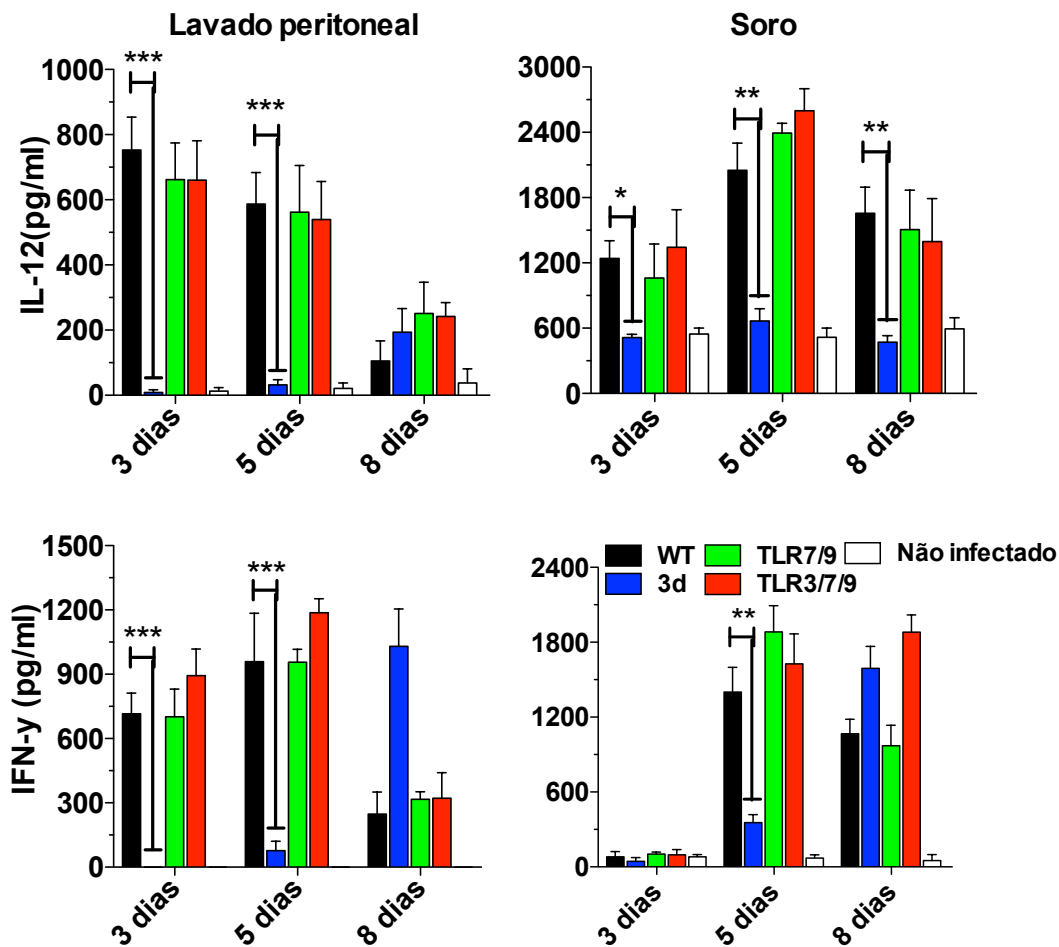
Uma mutação pontual na proteína UNC93B1, identificada por Tabeta e colaboradores, gera uma proteína incapaz de interagir com os TLRs intracelulares (TLR3, TLR7 e TLR9), sendo os mesmos inativos no camundongo 3d (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008; Tabeta et al., 2006). Camundongos 3d são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, entretanto nenhum dos camundongos deficientes em TLRs que reconhecem ácidos nucléicos, tiveram defeito na resposta imune (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) ou foram susceptíveis à infecção (Melo et al., 2010).

Nossos resultados prévios sugeriram que uma deficiência combinada de TLRs que reconhecem ácidos nucléicos, explicaria o dramático fenótipo observado nos camundongos 3d. Para respondermos esta questão, foram geradas diferentes combinações de camundongos deficientes em TLRs endossomais, como os duplos nocautes TLR3/TLR7 e TLR7/TLR9, e o triplo nocaute TLR3/TLR7/TLR9. Para avaliar a resposta imune e a susceptibilidade dos diferentes nocautes ao *T. gondii*, os animais foram infectados via intraperitoneal com 25 cistos da cepa ME49. Como mostrado na Figura 10, os camundongos TLR7/9 e TLR3/7/9 deficientes, foram capazes de responder à infecção com produção normal das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , tanto no lavado peritoneal quanto no soro, em níveis comparados aos camundongos selvagens.



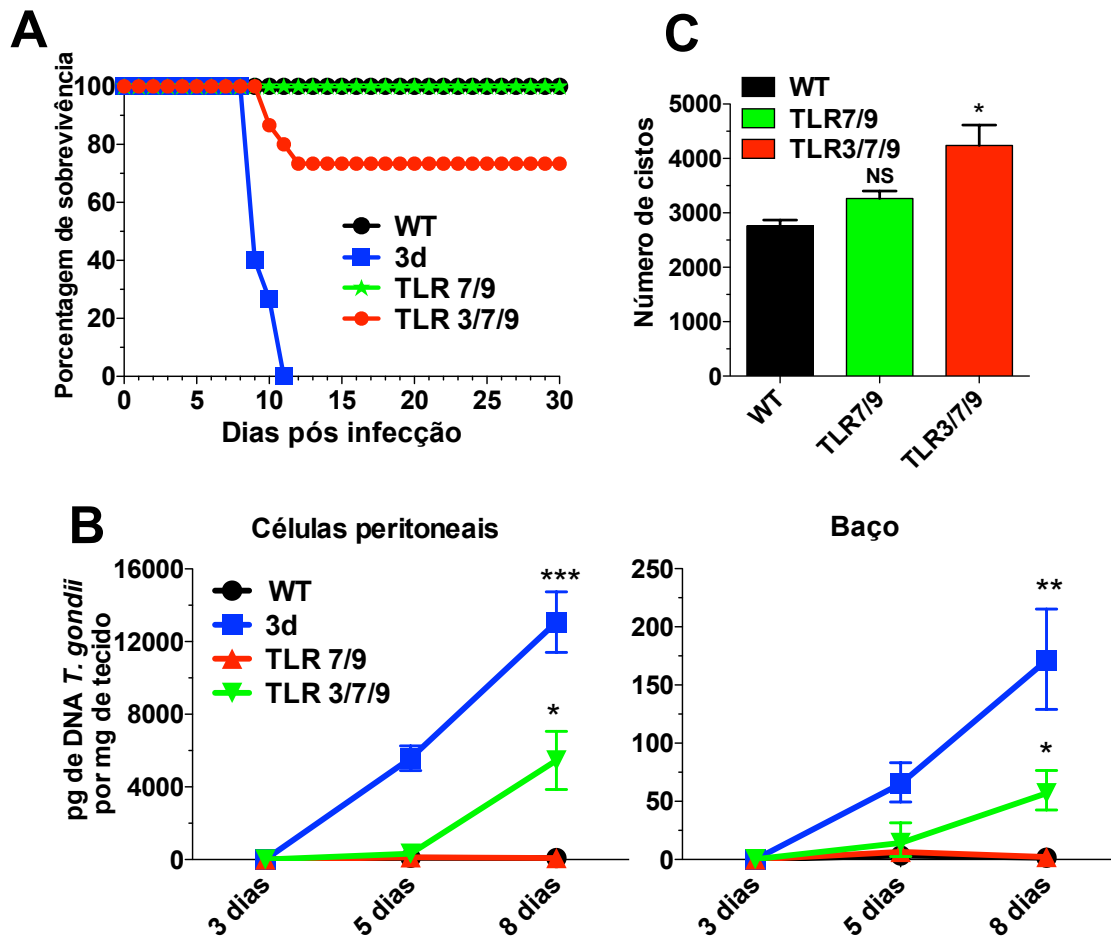
**Figura 9- Ativação de macrófagos e células dendríticas *in vitro* por RNA e DNA de *T. gondii*.** (A) Macrófagos imortalizados WT, TLR7 e TLR9 deficientes foram estimulados com RNA de ME49 a 2 $\mu$ g/ml associado a DOTAP. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram dosados no sobrenadante 24 hrs após estimulação. R848 foi utilizado como agonista de TLR7 e CpG 1826 como agonista de TLR9; painel a esquerda. Células dendríticas foram estimuladas com DNA de ME49 associado com DOTAP a 10, 5, 1 e 0.1 $\mu$ g/ml. Níveis de IL-12p40 foram dosados no sobrenadante 24hrs pós estimulação; painel da direita. (B) Células dendríticas foram estimuladas com oligonucleotídeos derivados de *T. gondii* contendo motivos CpG de classe B associados a DOTAP. Níveis de IL-12p40 foram dosados 24 hrs após estimulação. As concentrações do oligonucleotídeos foram 3 $\mu$ M (círculos pretos), 1 $\mu$ M (cinza escuro), 0.3 $\mu$ M (cinza claro) e 0.1 $\mu$ M (brancos). Dados representativos de 3 experimentos independentes. \*0.01 <  $p$  < 0.05, \*\*0.001 <  $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001.





**Figura 10- Produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  normal em camundongos TLR7/TLR9 e TLR3/TLR7/TLR9 deficientes infectados com *T. gondii*.** Animais foram infectados com 25 cistos da cepa ME49. (A) Níveis de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  foram dosados 3, 5 e 8 dias após a infecção no lavado peritoneal e soro. Dados representativos de 3 experimentos independentes. \* $0.01 < p < 0.05$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

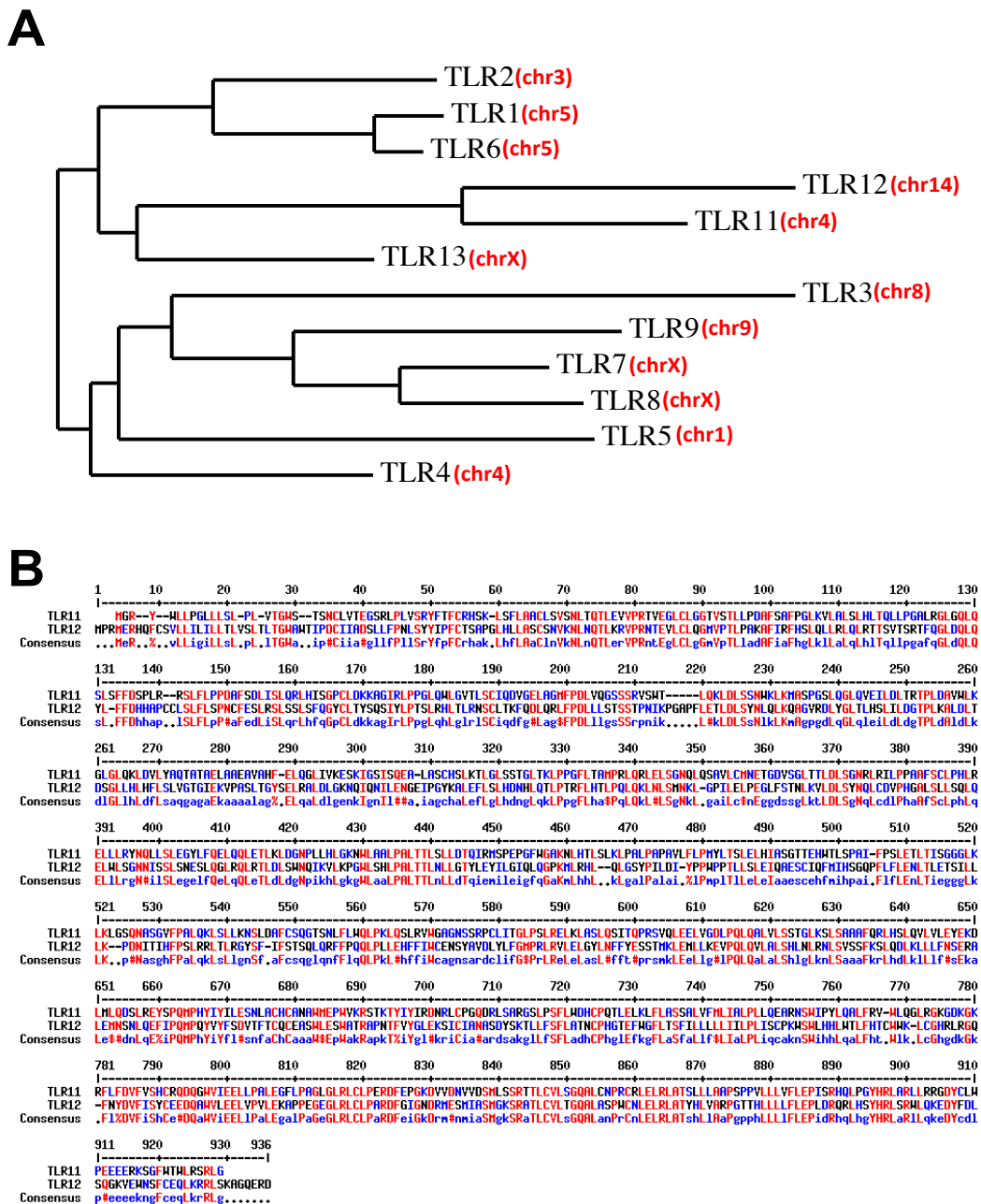
Mas apesar da produção normal de IL-12 e IFN- $\gamma$ , camundongos deficientes em TLR3/7/9 foram parcialmente susceptíveis à infecção (Figura 11A), apresentando um aumento da carga parasitária na fase aguda (Figura 11B) e na fase crônica (Figura 11C). Estes resultados foram surpreendentes pois do nosso conhecimento, TLR3, TLR7, TLR9 e TLR13, e mais recentemente TLR11, eram os TLRs endossomais mediados por UNC93B1 (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008; Pifer et al., 2011; Tabeta et al., 2006).



**Figura 11- Camundongos TLR3/TLR7/TLR9 deficientes são parcialmente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.** Camundongos foram infectados com 25 cistos da cepa ME49. (A) Gráfico de sobrevivência de animais WT (n=20), 3d (n=16) TLR7/9 (n=20) e TLR3/7/9 (n=20) de 4 experimentos independentes. (B) Análise por Real-time PCR quantitativo foi realizado para avaliação do nível de infecção nos diferentes tecidos 3, 5 e 8 dias após a infecção. Resultados expressos como pg de DNA do parasita por mg de tecido total. Dados representativos da média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes. (C) Os cistos cerebrais foram contados 30 dias após a infecção nos animais sobreviventes. Os cistos representam a média  $\pm$  desvio padrão dos 4 experimentos. \*0.01 < p < 0.05, \*\*0.001 < p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

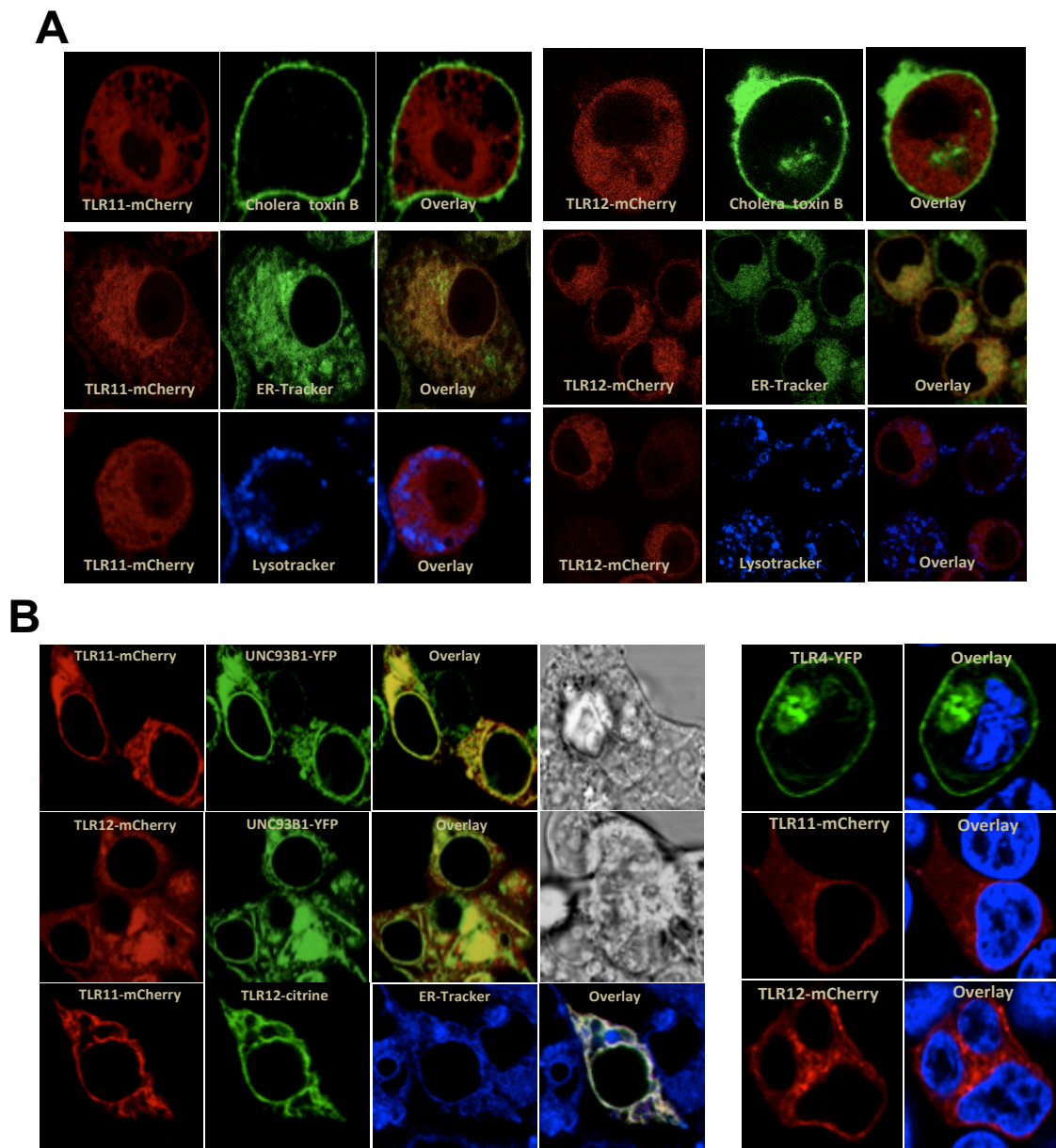
#### **5.4 Além de TLR3, TLR7 e TLR9, TLR11 e TLR12 também se localizam no Retículo endoplasmático.**

Como a resistência à infecção experimental pelo *T. gondii* foi pouco afetada nos camundongos TLR3/TLR7/TLR9 nocautes, decidimos investigar o papel de outros TLRs, cuja função também é dependente de UNC93B1. Para melhor responder a essa questão, utilizamos as sequências de aminoácidos dos TLRs murinos obtidos no banco de dados do NCBI, e utilizando um programa de bioinformática (Phylogeny.fr) geramos uma árvore molecular dos TLRs murinos (Figura 12A) (Anisimova and Gascuel, 2006; Dereeper et al., 2010). Esta análise indicou que TLR12 é um TLR muito próximo a TLR11, e agrupados próximo a TLR13, ambos TLRs endossomais mediados por UNC93B1 (Brinkmann et al., 2007; Shi et al., 2011). Fazendo o alinhamento da sequência de aminoácidos de TLR11 e TLR12 através do programa Multalin (Corpet, 1988), estes TLRs apresentaram uma identidade de sequência de 35% (Figura 12B). Tendo em vista a alta homologia, é razoável especular que ambos TLRs possam ter a mesma localização e/ou até a mesma função.



**Figura 12- TLR11 e TLR12 possuem alta similaridade de sequência.** (A) As sequências de aminoácidos dos TLRs murinos foram obtidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) e utilizando o programa Phylogeny.fr foi gerada uma árvore molecular. Entre parênteses esta o cromossomo onde o TLR esta localizado. (B) Alinhamento entre TLR11 e TLR12 gerado por Multalin. Aminoácidos presentes em ambas sequencias estão representados em vermelho.

Para caracterizar a localização subcelular de TLR11 e TLR12, geramos vírus carreando o cDNA para TLR11 e TLR12, e transduzimos macrófagos imortalizados para expressão estável de ambos TLRs fusionado às proteínas fluorescentes mcherry e citrine. Utilizando a técnica de microscopia confocal e diferentes marcadores celulares como subunidade B da toxina de cólera fusionada à FITC para marcação da membrana celular, ER Tracker para marcação do retículo endoplasmático e Lysotracker para marcação de organelas ácidas, demonstramos que ambos TLR11 e TLR12 são TLRs intracelulares e localizados no RE (Figura 13A). Também foram cotransfectadas transientemente células HEK293T com os plasmídeos que codificam UNC93B1 fusionada a YFP e TLR11 ou TLR12 fusionados a mcherry. Como mostrado na Figura 13B, todas as proteínas colocalizaram no RE. Como controle, foram transfectadas células HEK293T com o plasmídeo codificando TLR4 fusionado a YFP. O padrão de distribuição celular para TLR4, como esperado (Latz et al., 2004), foi bastante diferente de TLR11 e TLR12 (Figura 13B), sendo expresso na membrana celular.



**Figura 13- TLR11 e TLR12 são ambos TLRs intracelulares localizados no Retículo endoplasmático.** (A) Microscopia confocal de macrófagos imortalizados estavelmente expressando TLR11 e TLR12 fusionados a mCherry. As imagens foram adquiridas após marcação com Toxina B de cólera FITC para marcação da membrana plasmática, LysoTracker para marcação de compartimentos ácidos e ER-tracker para marcação do retículo endoplasmático. (B) Microscopia confocal de células HEK293T cotransfectadas com TLR11-mcherry ou TLR12-mcherry com UNC93B1-YFP (painel esquerdo). HEK293T transfectadas com TLR4-YFP, TLR11-mcherry e TLR12-mcherry e marcadas com Hoechst 33342 (marcador de núcleo) foi usado como controle de localização (painel direito).

## 5.5 TLR11 e TLR12 são altamente expressos em células dendríticas CD8 $\alpha$ + e tem função mediada por UNC93B1

Ao longo dos anos tem se discutido o papel de diferentes populações celulares na infecção por *T. gondii*. Vários estudos demonstraram que a população de DC que expressa ambos CD11c e CD8 é a principal fonte de IL-12, e desempenha papel importante na resistência do hospedeiro à infecção por *T. gondii* (Hou et al., 2011; Mashayekhi et al., 2011; Reis e Sousa et al., 1997). Além disso, a indução de IL-12 por células dendríticas expostas a taquizoítos de *T. gondii* é mediada por TLR11 de forma dependente de UNC93B1 (Pifer et al., 2011).

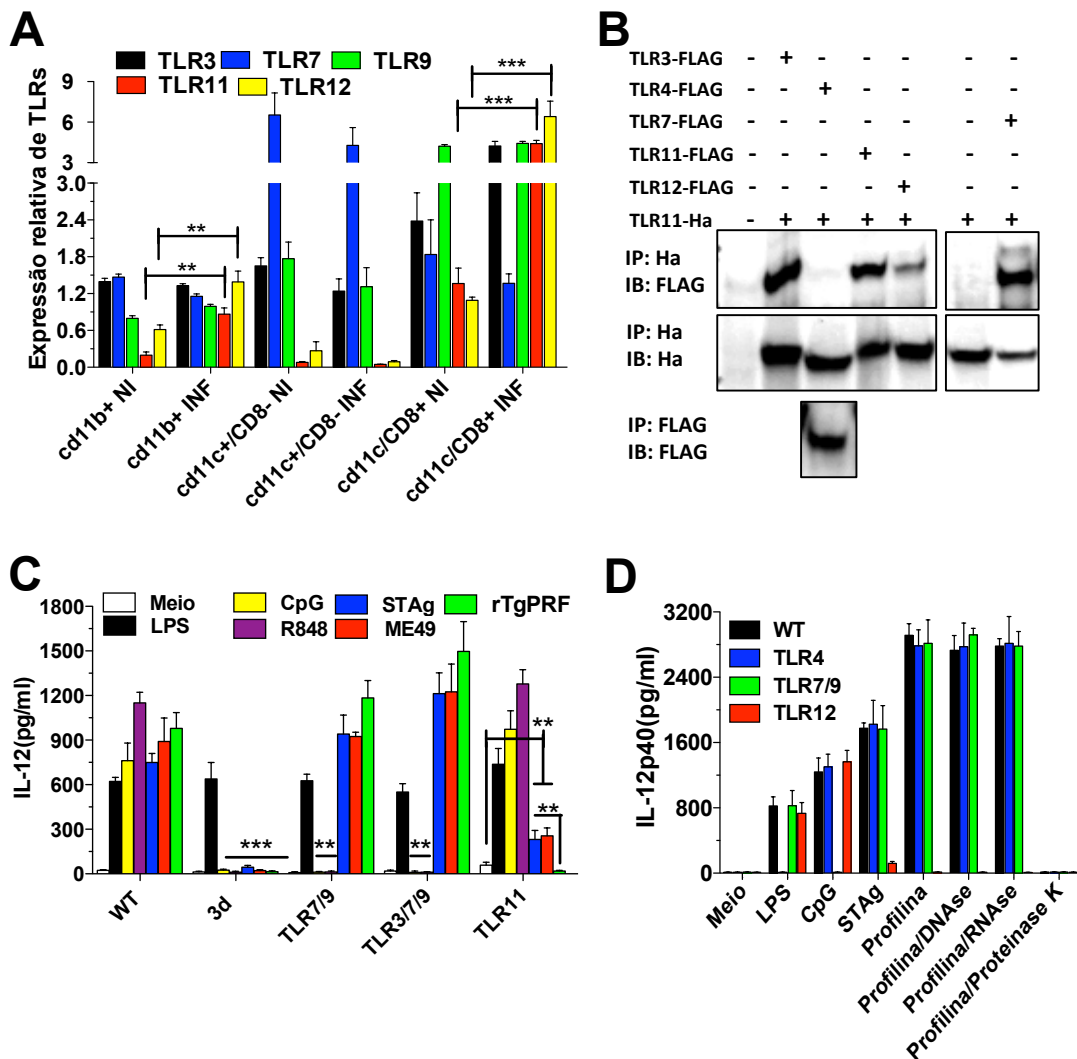
Como ambos macrófagos e células dendríticas são importantes fontes de IL-12 durante a infecção por *T. gondii* em camundongos (Gazzinelli et al., 1994; Mashayekhi et al., 2011), decidimos avaliar a expressão do mRNA de TLRs endossomais em células CD11b+, CD11c+/CD8-, e CD11c+/CD8+ em camundongos infectados ou não com *T. gondii*. Como demonstrado na Figura 14A, o mRNA de TLR3, TLR9, TLR11 e TLR12 foram expressos em altos níveis nas células CD11c+/CD8+, enquanto que a expressão do mRNA de TLR7 foi maior em células CD11c+/CD8-. Após a infecção, a expressão do mRNA de TLR3, TLR11 e TLR12 foi induzida principalmente em células CD11c+/CD8+. Uma baixa expressão de TLR11 e TLR12 foi observada em células CD11c+/CD8-. Os macrófagos também expressaram RNA para os vários TLRs endossomais, mas em menor quantidade do que as DCs, e com indução de ambos TLR11 e TLR12.

Para avaliar se TLR11 e TLR12 estão associados a outros TLRs endossomais, células HEK293T foram transientemente cotransfectadas com diferentes TLRs (i.e. TLR3, TLR4, TLR7, TLR11 e TLR12) fusionados ao epítipo FLAG, e TLR11 fusionado ao epítipo Ha. Após 48 hrs de transfecção, as células foram lisadas com tampão RIPA (Sigma) e o extrato total utilizado no experimento de imunoprecipitação. TLR11 foi utilizado como isca sendo precipitado com anticorpo monoclonal anti-Ha ligado à proteína A agarose. Como mostrado (Figura 14B), TLR3, TLR7, TLR11 e TLR12, mas não TLR4, coimunoprecipitaram com TLR11. Como foi descrito que UNC93B1 interage fisicamente com o TLR3, TLR7, TLR9, TLR11 e TLR13 (Brinkmann et al., 2007; Pifer et al., 2011), a interpretação deste resultado é que quando se precipita TLR11, TLR3, TLR7, TLR11 e TLR12 coimunoprecipitam juntamente pois todos os TLRs endossomais estão diretamente ligados a UNC93B1.

Como tem sido descrita a importante função de DCs na infecção por *T. gondii*, purificamos células CD11c<sup>+</sup> do baço de diferentes camundongos selvagens, nocautes (i.e. TLR7/9, TLR3/7/9 e TLR11) e 3d para avaliação da produção de IL-12 após a estimulação com diferentes agonistas de TLRs, lisado total de taquizoítos (STAg), infecção por taquizoítos de ME49 e profilina recombinante (rTgPRF). Células dendríticas de camundongos 3d responderam ao estímulo por LPS, mas não para R848 (agonista de TLR7), oligonucleotídeo CpG (agonista de TLR9), STAg, ME49, ou rTgPRF (Figura 14C). A falta de TLR11, mas não de TLR3/TLR7/TLR9 teve um grande impacto sobre a produção de IL-12 por DCs do baço expostos a STAg, ME49 ou rTgPRF, indicando que TLR11/profilina são o principal receptor/agonista presente na infecção por *T. gondii*. Entretanto, quando comparamos à resposta pelo estímulo por rTgPRF, DCs provenientes de camundongos TLR11 deficientes ainda produzem quantidades significativas de IL-12 quando exposto a STAg ou ME49 (Figura 14C). Como esperado, DCs de camundongos TLR3/TLR7/TLR9 nocautes não responderam a R848 ou CpG, enquanto que DCs de camundongos TLR11 nocautes produziram níveis elevados de IL-12 em resposta a estes agonistas de TLR (Figura 14C).

Células CD11c<sup>+</sup> também foram purificadas de camundongos TLR12 nocautes e utilizadas em estimulações *in vitro*. Os resultados demonstraram que, como as DCs deficientes em TLR11, DCs TLR12 deficientes não respondem a rTgPRF. Após o tratamento com proteinase K, mas não com RNase ou DNase, rTgPRF perdeu a capacidade de ativar células CD11c<sup>+</sup> (Figura 14D). Nossos resultados indicam fortemente que ambos TLR11 e TLR12 são intracelulares e tem a sua função mediada por UNC93B1 na resposta a TgPRF.

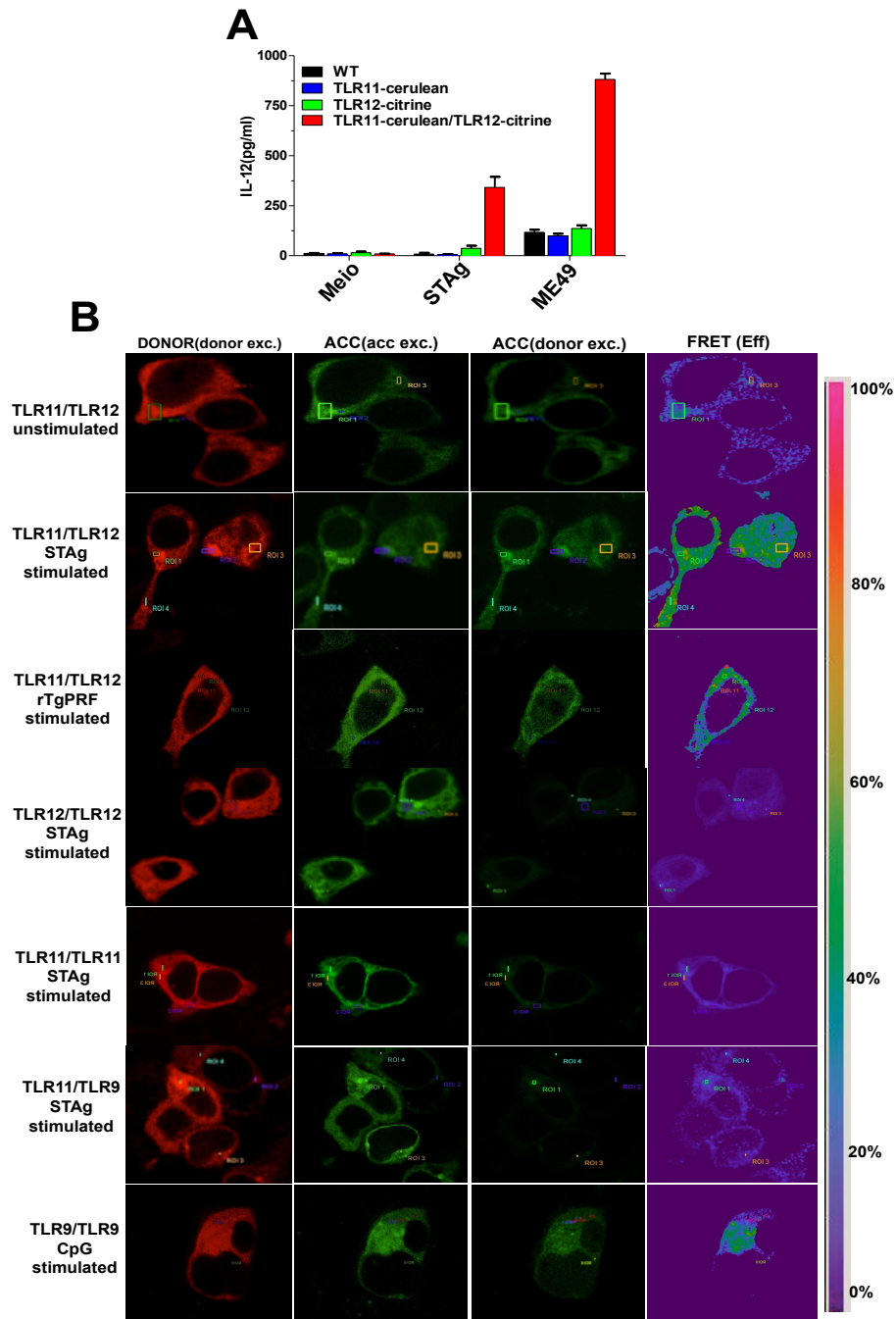




**Figura 14- Ambos TLR11 e TLR12 tem função mediada por UNC93B1 e são altamente expressos em DCs CD8<sup>+</sup>.** (A) Avaliação dos níveis de expressão de TLR3, TLR7, TLR9, TLR11 e TLR12 por Real-Time PCR em células CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> purificadas de baço de animais não infectados e 5 dias após infecção. Os níveis de expressão foram normalizados para Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). (B) HEK293T foram transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos e o lisado total foi imunoprecipitado (IP) com anti-Ha (superiores) e anti-FLAG (inferior) e analisado por Imuno Blot (IB) com anti-FLAG (superior e inferior). (C) Células cd11c<sup>+</sup> foram purificadas do baço de animais WT, 3d, TLR7/TLR9, TLR3/TLR7/TLR9 e TLR11 KO e estimuladas com LPS, CpG 1826, R848 ou infectado com ME49. (D) Células cd11c<sup>+</sup> purificadas de animais WT, TLR4, TLR7/TLR9 e TLR12 KO foram estimuladas com LPS, CpG 1826, STAg, ou rTgPRF não tratada, ou tratada com DNase, RNase ou Proteinase K. (C-D) Níveis de Il-12 foram dosados 24 hrs após estimulação. (\*0.01 < p < 0.05, \*\*0.001 < p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

## 5.6 TLR11 e TLR12 formam heterodímeros após estimulação e são ambos requeridos para resposta à infecção por *T. gondii*.

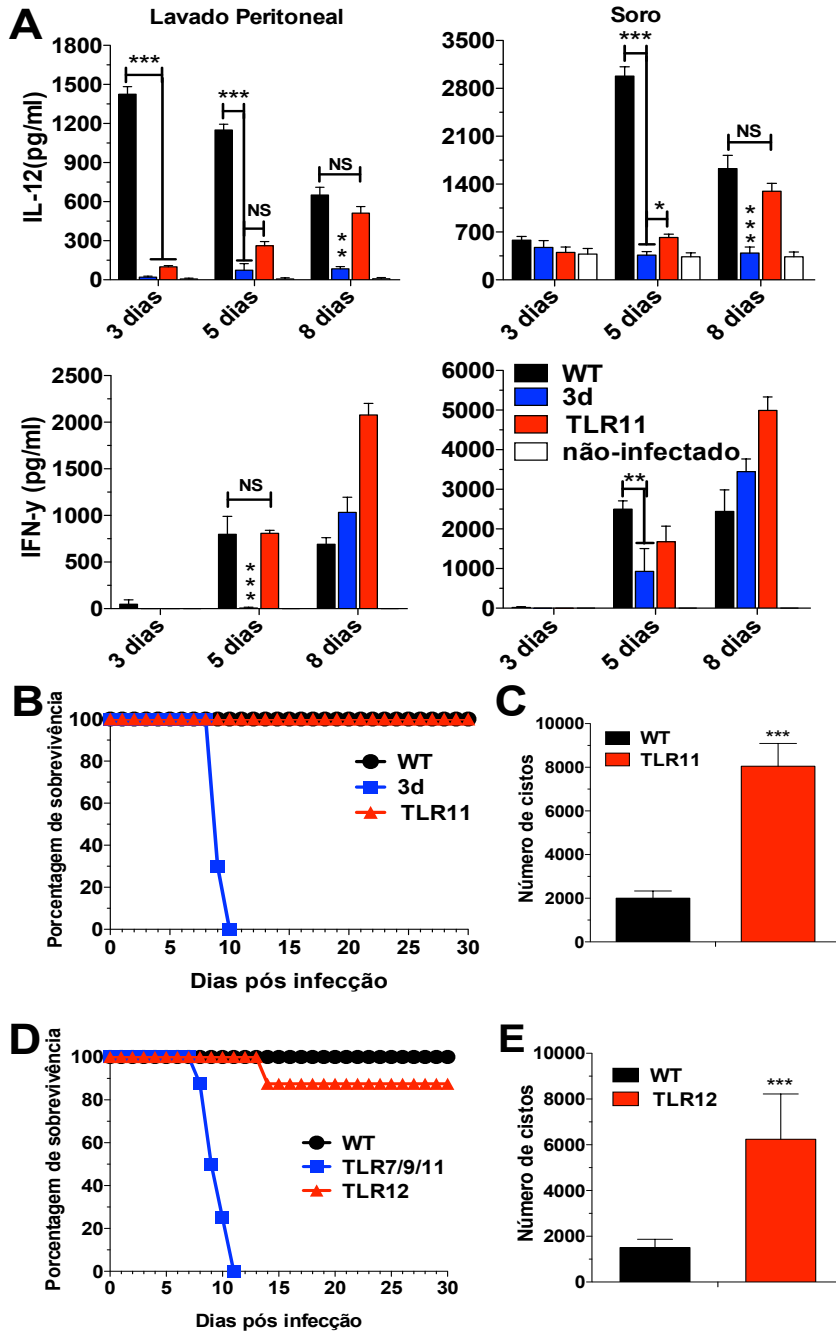
Para avaliar o papel de TLR11 e TLR12 no reconhecimento de moléculas presentes no *Toxoplasma*, utilizamos macrófagos expressando estavelmente TLR11, TLR12 ou ambos TLR11 e TLR12 em experimentos de estimulação e infecção *in vitro*. Como demonstrado na Figura 15A, macrófagos imortalizados expressando estavelmente ambos TLR11 e TLR12, mas não TLR11 ou TLR12 isoladamente, produziram níveis elevados de IL-12 em resposta a STAg ou taquizoítos de ME49. Para que os TLRs sinalizem, a dimerização dos TLRs parece ser um processo necessário, como demonstrado para os homodímeros de TLR3 e TLR9 e para os heterodímeros TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 (Latz et al., 2007; Leonard et al., 2008; Triantafilou et al., 2006; Wyllie et al., 2000). Para avaliarmos se TLR11 e TLR12 formam homo ou heterodímeros, utilizamos a técnica de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), que permite avaliar a distância intermolecular entre os domínios TIR dos TLRs antes e após a estimulação com o agonista desejado. Esta técnica permite que moléculas que estão a uma distância de até 10nm, suficiente para a transferência de energia, sejam avaliadas. Para isso, células HEK293T foram cotransfectadas com diferentes combinações de TLRs fusionados a proteínas fluorescentes, sendo a proteína cerulean utilizada como doador, e citrine comoceptor. Como mostrado na (Figura 15B), após estimulação por STAg ou rTgPRF, um forte sinal de FRET foi observado em células cotransfectadas com TLR11 e TLR12. Em contraste, o sinal de FRET não foi observado em células cotransfectadas com TLR11/TLR11, TLR12/TLR12 ou TLR11/TLR9, quando estimuladas com STAg ou rTgPRF (Figura 15B). Para controle do experimento, após estimulação com CpG, observou-se um forte sinal de FRET para o homodímero TLR9/TLR9. Em conjunto, os nossos resultados sugerem que oligomerização entre TLR11 e TLR12 é necessária para o reconhecimento de moléculas do *T. gondii* (TgPRF) e para a resposta à infecção.



**Figura 15- TLR11 e TLR12 formam heterodímeros após estimulação e são ambos necessários para a resposta à profilina de *T. gondii*.** (A) Macrófagos imortalizados expressando TLR11, TLR12 ou ambos, foram estimulados com STAg (10 µg/ml) ou infectados com a cepa ME49. Os níveis de IL-12p40 foram dosados no sobrenadante 24 hrs após estimulação. (B) Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos codificando as proteínas indicadas na Figura; 48 hrs após a transfecção foram estimuladas com STAg, rTgPRF ou CpG 1826 para TLR9/TLR9. FRET entre as respectivas proteínas foi calculado medindo a emissão entre as proteínas através do programa FRET SE wizard no microscópio Leica SP2. Para cada combinação de plasmídeo, cerulean (representado em vermelho) foi utilizado como doador, e citrine (representado em verde) comoceptor..

### **5.7 Camundongos TLR11 e TLR12 nocautes tem defeito na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ mas são resistentes à infecção por *T. gondii***

Com base nos resultados descritos anteriormente, é plausível a hipótese de que TLR11 e TLR12 respondem a profilina e sinalizam como heterodímeros, e a deficiência de qualquer um destes TLRs resultaria na produção diminuída de IL-12 após a infecção por *T. gondii*. Camundongos selvagens, 3d e TLR11 nocautes foram infectados via intraperitoneal com cistos de *T. gondii* e a resposta imune avaliada. Como visto na Figura 16A, apesar de uma diminuição significativa da produção de IL-12, tanto no lavado peritoneal quanto no soro, camundongos TLR11 deficientes ainda são capazes de controlar o crescimento do parasita e sobreviver à fase aguda da infecção com *T. gondii* (Yarovinsky et al., 2005). Quando comparamos os níveis de IL-12 nos camundongos TLR11 nocautes e 3d, os níveis foram mais elevados do que nos camundongos 3d, sendo suficientes para indução de IFN- $\gamma$  (Figura 16A), e controle da infecção na fase aguda (Figura 16B). No entanto, os camundongos TLR11 nocautes tiveram um grande aumento no número de cistos cerebrais (Figura 16C) quando comparado aos camundongos selvagens. Como esperado, devido aos nossos resultados prévios, camundongos TLR12 deficientes são igualmente resistentes à camundongos TLR11 após infecção por *T. gondii* (Figura 16D), com aumento de cistos na fase crônica (Figura 16E).

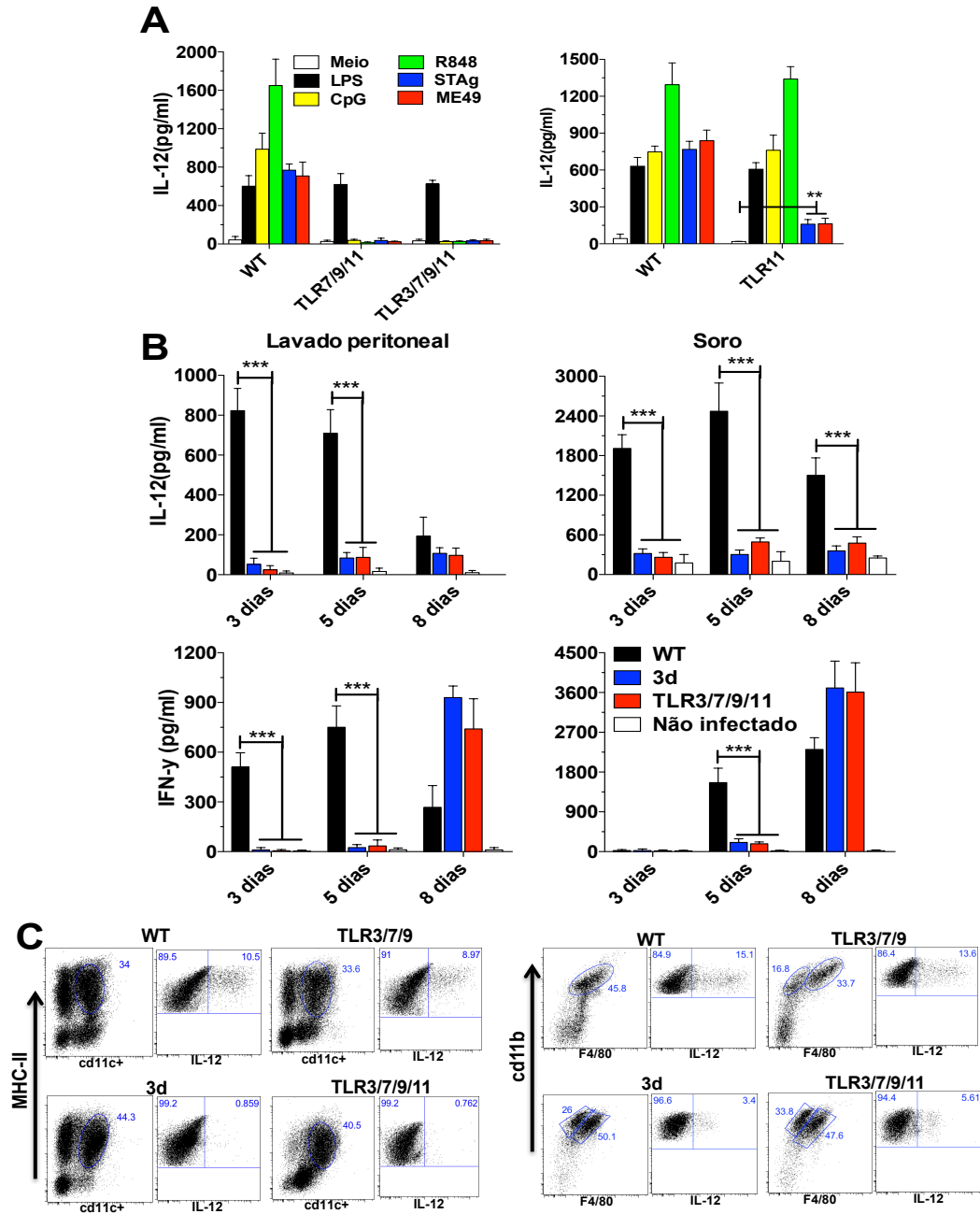


**Figura 16 - Apesar do defeito na produção de IL-12, camundongos TLR11 e TLR12 deficientes são resistentes à infecção por *T. gondii*.** Camundongos foram infectados com 25 cistos da cepa ME49. (A) Níveis de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  foram dosados na cavidade peritoneal e soro 3, 5 e 8 dias após a infecção. (B) Gráfico de sobrevivência de animais WT (n=15), 3d (n=12) e TLR11 (n=15) de 3 experimentos independentes. (C) Os cistos cerebrais foram contados 30 dias após a infecção nos animais sobreviventes. Os cistos representam a média  $\pm$  desvio padrão dos 3 experimentos. (D) Gráfico de sobrevivência de animais WT (n=6), TLR7/9/11 (n=6) e TLR12 (n=8). (E) Os cistos cerebrais foram contados 30 dias após a infecção nos animais sobreviventes. \*0.01 < p < 0.05, \*\*0.001 < p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

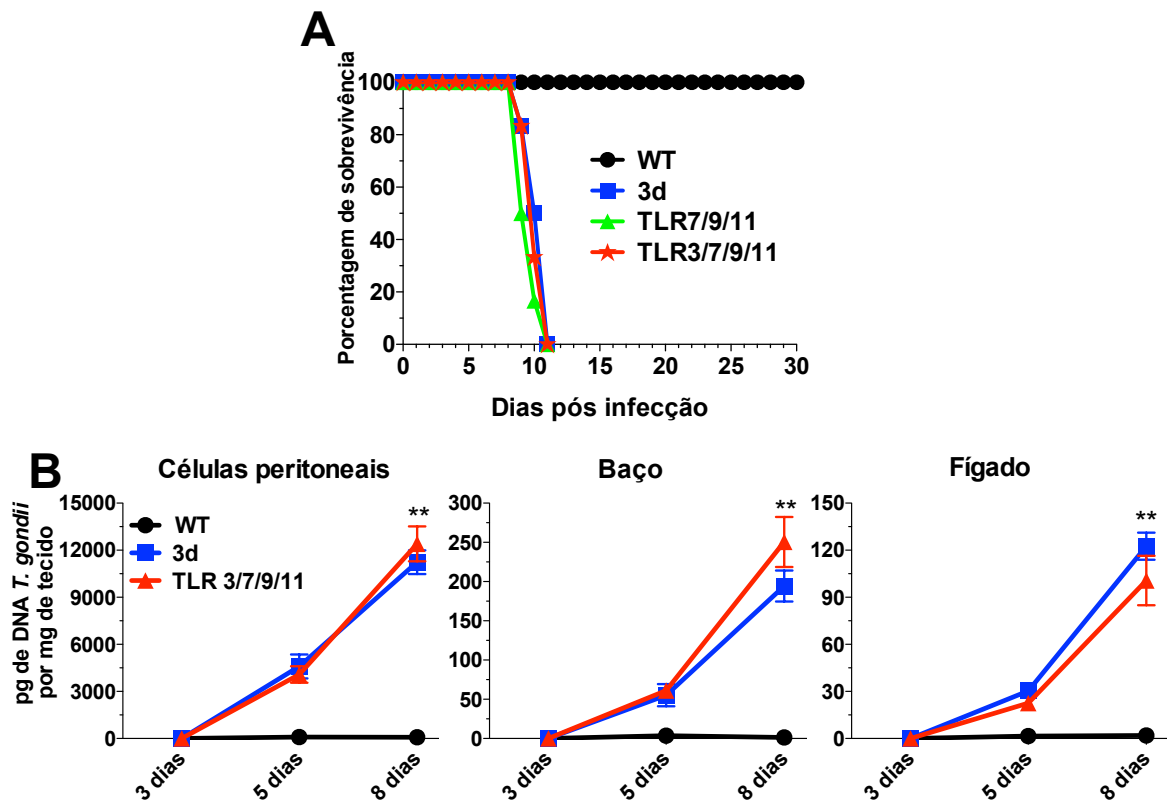
## **5.8 Camundongos deficientes em TLR7/TLR9/TLR11 são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.**

Avaliando todos os nossos resultados prévios, chegamos a conclusão que apesar dos TLRs de reconhecimento a ácidos nucleicos e também TLR11/12 serem importantes no reconhecimento de moléculas do parasita *T. gondii* e início da resposta imune, nenhum destes animais foram susceptíveis como os animais 3d após a infecção por *T. gondii* (Melo et al., 2010).

Por isso, decidimos gerar camundongos triplos TLR7/TLR9/TLR11 e quádruplos TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 deficientes e avaliar a resposta imune e susceptibilidade frente à infecção. Em experimentos *in vitro*, DCs purificadas de ambos camundongos TLR7/TLR9/TLR11 e TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 não produzem IL-12 após estimulação por STAg ou infecção por taquizoítos de ME49 (Figura 17A). Após infecção com cistos da cepa ME49, como demonstrado na Figura 17B, animais quádruplo nocaute tem um grande defeito na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  em níveis comparados aos camundongos 3d. Quando avaliada a produção de IL-12 por citometria de fluxo em DCs e monócitos inflamatórios, observamos que ambas as populações tem uma grande redução na produção de IL-12 (Figura 17C). Este defeito faz com que esses animais sejam extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii* (Figura 18A) devido a alta carga parasitária em células peritoneais e órgãos como baço e fígado (Figura 18B).



**Figura 17- Camundongos quádruplo nocaute tem grande defeito na produção de IL-12/IFN- $\gamma$ .** Camundongos foram infectados com 25 cistos da cepa ME49 via intraperitoneal. (A) Células CD11c<sup>+</sup> foram purificadas do baço de camundongos WT, TLR7/TLR9/TLR11, TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 e TLR11 KO e estimulados com LPS, CpG 1826, R848, STAg, ou infectados com taquizoítos de ME49 taquizoítos. (B) Níveis de IL-12p40 e IFN- $\gamma$  foram dosados na cavidade peritoneal e soro 3, 5 e 8 dias após a infecção. Dados representativos da média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. (C) Camundongos infectados com *T. gondii* foram sacrificados e as células retiradas do baço 5 dias após infecção e avaliadas por FACS para produção de IL-12 intracelular. Células dendríticas (esquerda) foram avaliados para CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup>. Monócitos inflamatórios (direita) foram avaliados primeiro para GR1<sup>+</sup> e depois para CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>.

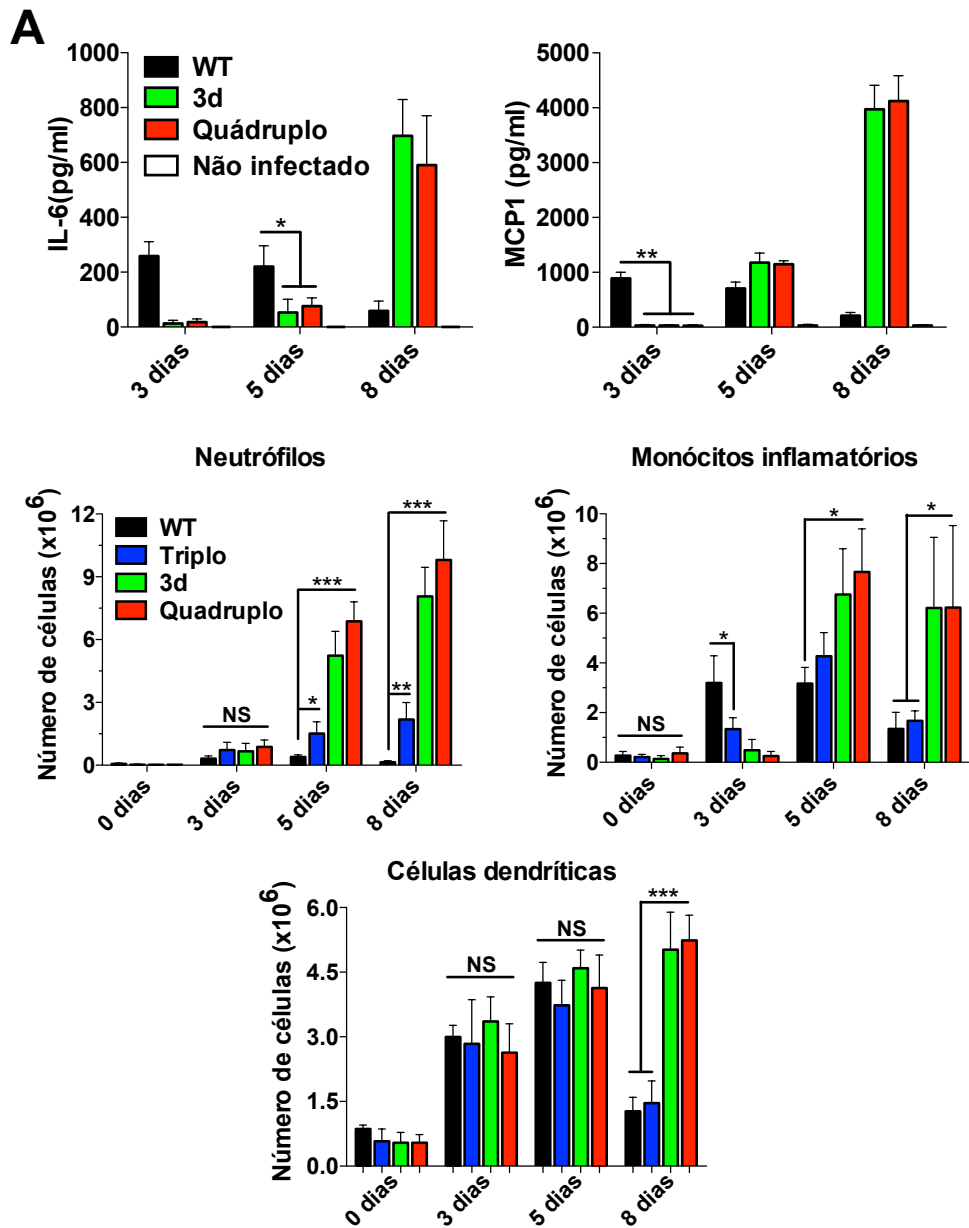


**Figura 18- Camundongos quádruplo nocautes são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*.** Camundongos foram infectados com 25 cistos de ME49. (A) Gráfico de sobrevivência de animais WT (n=15), TLR7/9/11 (n=10) e TLR3/7/9/11 (n=15) de pelo menos 2 experimentos independentes. (B) Análise por Real-time PCR quantitativo foi realizada para avaliação do nível de infecção nos diferentes tecidos, 3, 5 e 8 dias após a infecção. Resultados expressos como pg de DNA do parasita por mg de tecido total. Dados representativos da média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes. \*0.01 < p < 0.05, \*\*0.001 < p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

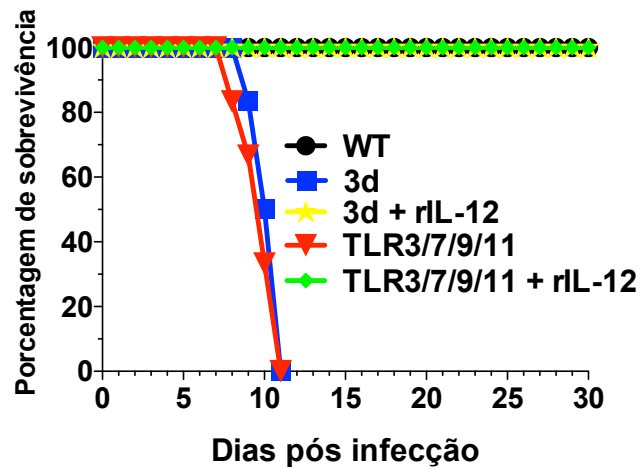


Além do defeito na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , camundongos 3d e quádruplo nocaute também apresentam defeito na produção de IL-6 e MCP1 (Figura 19A). Tem sido demonstrada a importância de monócitos inflamatórios na infecção por *T. gondii* (Dunay et al., 2008; Dunay et al., 2010; Dunay and Sibley, 2010). Além do defeito na produção de IL-12 que culmina com atraso na produção de IFN- $\gamma$ , o atraso na produção de MCP1 implica em uma redução no recrutamento de monócitos inflamatórios (Figura 19B), o que pode contribuir para a susceptibilidade de camundongos 3d e quádruplo nocaute à infecção.

Para verificarmos se o defeito na produção de IL-12 por camundongos 3d e TLR3/7/9/11 deficientes é a causa primordial da susceptibilidade, os animais foram infectados com 25 cistos da cepa ME49 e receberam via intraperitoneal 100ng de IL-12p70 recombinante do primeiro ao sexto dia após a infecção. Camundongos 3d e quádruplo deficientes que receberam IL-12p70, foram capazes de controlar a infecção com sobrevivência por mais de 60 dias, já animais não tratados sucumbiram à infecção na fase aguda (Figura 20).

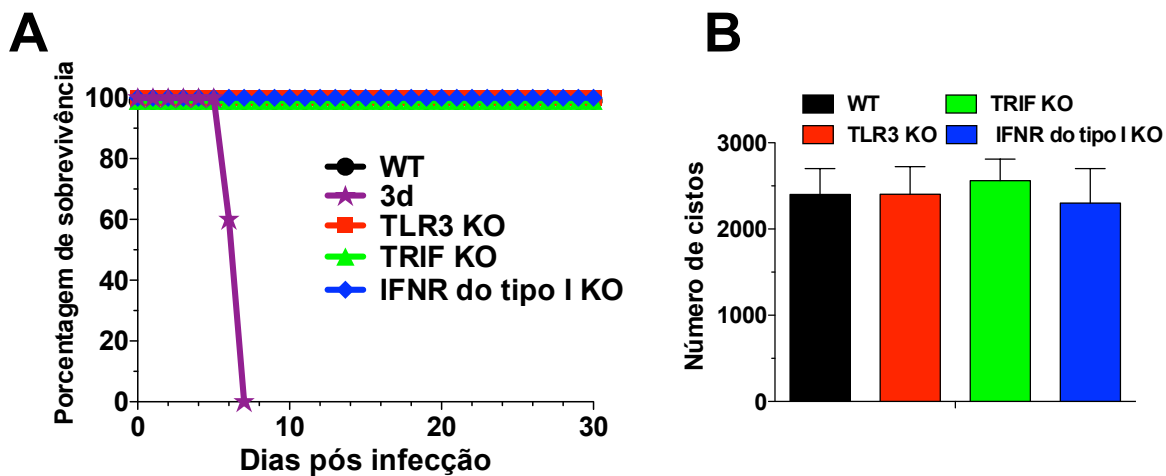


**Figura 19- Atraso na produção de citocinas e quimiocinas culmina com um recrutamento celular tardio.** Camundongos foram infectados com 25 cistos da cepa ME49. (A) Níveis de IL-6 e MCP1 foram dosados 3, 5 e 8 após infecção no lavado peritoneal. Dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. (B) Camundongos WT, 3d, triplo e quádruplo nocautes foram infectados e as populações celulares avaliadas na cavidade peritoneal 3, 5 e 8 dias após infecção. Neutrófilos (GR1+, CD11b+, F4/80-), Células dendríticas (CD11c+, MHC-II+) e monócitos inflamatórios (GR1+, CD11b+, F4/80+) foram quantificados por FACS. \* $0.01 < p < 0.05$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 20-** Tratamento com IL-12 recombinante após à infecção, torna camundongos 3d e quádruplos nocautes resistentes à infecção por *T. gondii*. Animais foram infectados com 25 cistos da cepa ME49 e tratados ou não com IL-12p70 recombinante do 1º ao 6º dia após a infecção e mortalidade avaliada. Dados representativos de 2 experimentos independentes com resultados idênticos.

É importante ressaltar que também foram gerados camundongos triplos TLR7/TLR9/TLR11 deficientes, e que os mesmos foram tão susceptíveis quanto os camundongos 3d e quádruplo deficiente (Figura 18A). Este resultado indica que TLR3 é de importância marginal na resposta ao parasita e na resistência do hospedeiro. Como o adaptador TRIF e IFN do Tipo I são, respectivamente, a molécula adaptadora principal e o resultado da ativação de TLR3, também infectamos camundongos TLR3, TRIF, IFNR deficientes. Os nossos resultados mostram que quando comparado aos camundongos WT, nenhum desses animais exibiram susceptibilidade aumentada para a infecção por *T. gondii* (Figuras 21A e 21B). Consequentemente, fomos incapazes de detectar qualquer aumento na produção de IFN- $\alpha$  no lavado peritoneal, culturas de esplenócitos, ou soros de animais WT infectados com *T. gondii*.



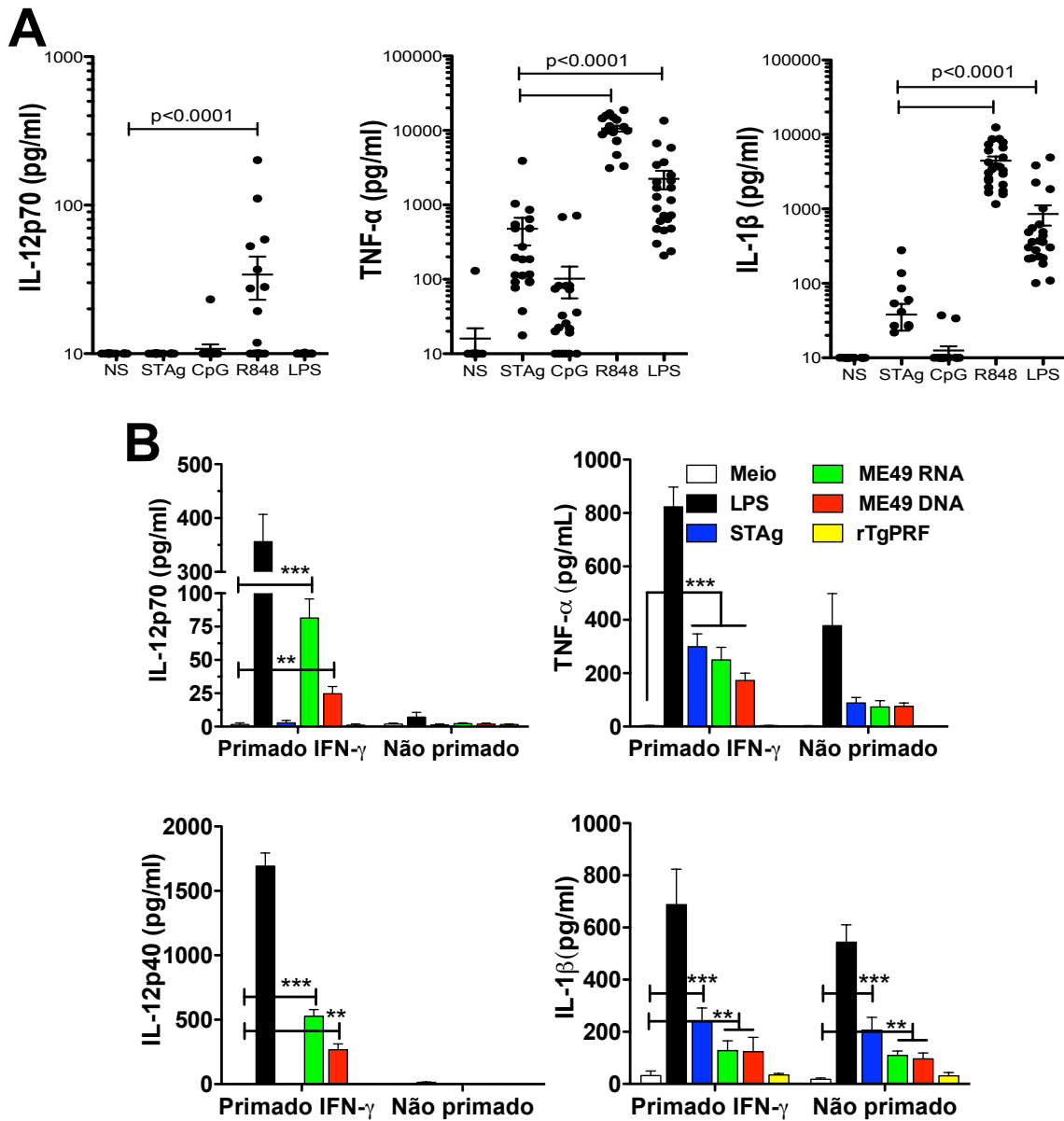
**Figura 21- Camundongos deficientes em TLR3, TRIF e Receptor de IFN do tipo I são resistentes à infecção por *T. gondii*.** Animais foram infectados com 25 cistos da cepa ME49. (A) Gráfico representativo da mortalidade de animais WT (n=10), 3d (n=8), TLR3 (n=10), TRIF (n=10) e IFNR do tipo I (n=8). Dados representativos da média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos. (B) Os cistos cerebrais foram contados 30 dias após a infecção nos animais sobreviventes. Os cistos representam a média  $\pm$  desvio padrão dos 2 experimentos.

### 5.9 Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) produzem níveis elevados de IL-12 em resposta a DNA e RNA de *T. gondii*, mas não a rTgPRF.

Nossos resultados demonstraram que TLRs de reconhecimento a ácidos nucleicos, TLR7 para RNA, e TLR9 para DNA, são importantes na infecção por *T. gondii* em camundongos. Outros receptores que se mostraram muito importantes, e são os principais envolvidos na resposta e indução de IL-12, foram TLR11 e TLR12, que funcionam como heterodímeros no reconhecimento da profilina. Considerando que TLR11 e TLR12 são importantes para o reconhecimento de *T. gondii* em camundongos, mas que não são expressos em células humanas (Lauw et al., 2005; Zhang et al., 2004), surgiu a hipótese de que os TLRs que reconhecem ácidos nucleicos são importantes para o reconhecimento do *T. gondii* por células humanas.

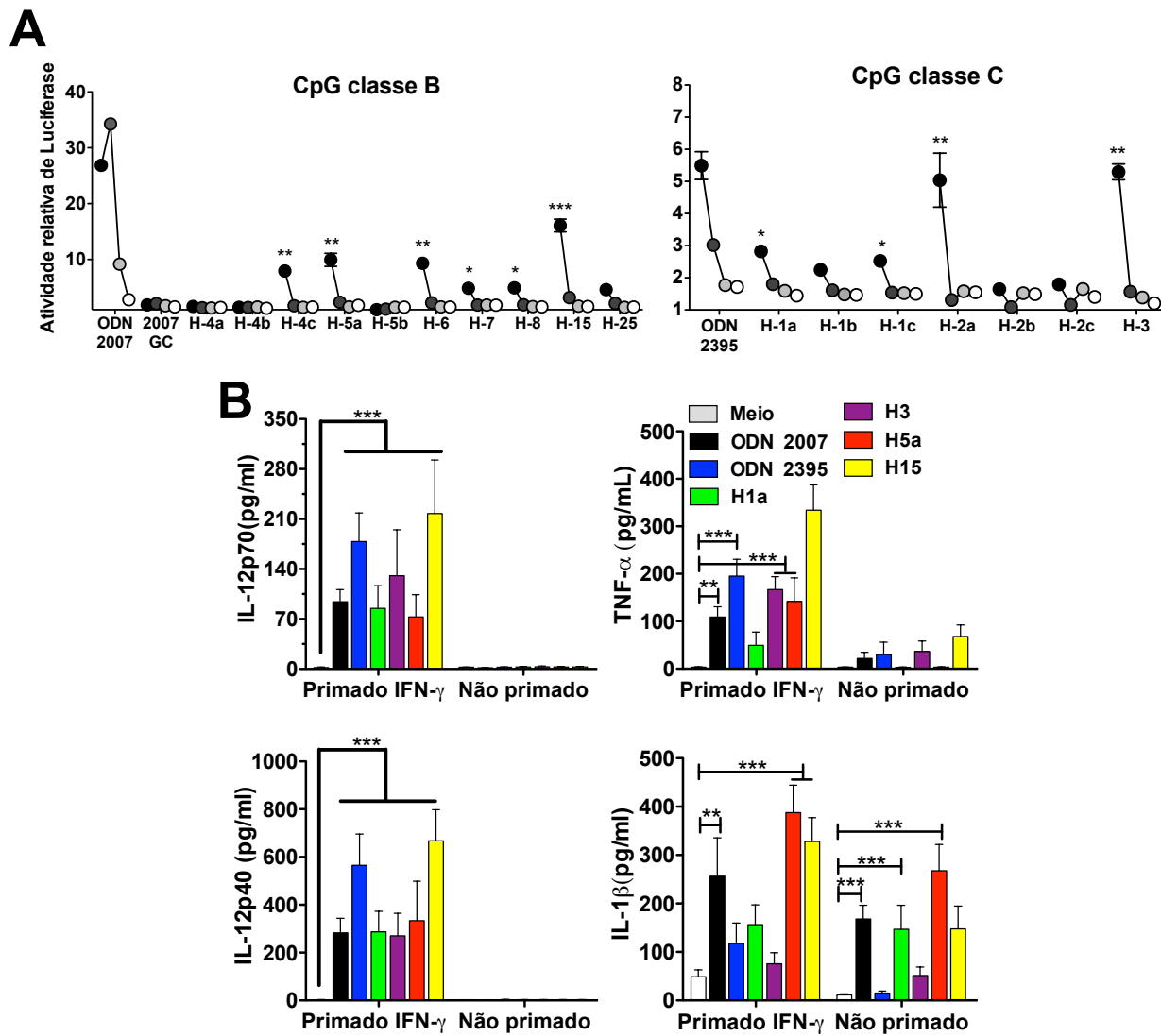
Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram purificadas de indivíduos saudáveis, e utilizadas *in vitro* para estimulação com diferentes agonistas de TLR e STAg. Os resultados apresentados na Figura 22A demonstram que quando comparado a R848 (agonista para

TLR8 humano) e LPS (agonista de TLR4), STAg é um fraco estimulador da produção de IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  por PBMCs humanas, como já demonstrado (Bliss et al., 1999). Confirmando nossas expectativas, não fomos capazes de detectar a produção de qualquer citocina (incluindo IL-12p70) em resposta à rTgPRF (Figura 22B). Entretanto, RNA e DNA purificados de taquizoítos de *T. gondii*, foram capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12p40 e IL-12p70, as quais foram mais pronunciadas quando PBMCs foram primadas com IFN- $\gamma$  (Figura 22B).



**Figura 22- RNA e DNA purificados de *T. gondii*, mas não rTgPRF, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs humanas.** PBMCs purificadas de doadores saudáveis foram estimuladas *in vitro* com STAg (10  $\mu$ g/ml), ODN 2007 (1  $\mu$ M), R848 (2  $\mu$ M) ou LPS (100 ng/ml). Dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. (B) PBMCs primadas ou não com IFN $\gamma$  humano recombinante (200 U/ml) foram estimuladas com LPS (100 ng/ml), STAg (10  $\mu$ g/ml), RNA ME49 (2  $\mu$ g/ml), DNA ME49 (5  $\mu$ g/ml), ou rTgPRF (1  $\mu$ g/ml). DNA e RNA do parasita foram associados com DOTAP. \*0.01 <  $p$  < 0.05, \*\*0.001 <  $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001.

Utilizamos também as sequências identificadas no genoma do *Toxoplasma* contendo motivos CpG estimulatórios para TLR9 humano em ensaios de luciferase (Tabela I - Anexo). Um dado interessante é que o número de motivos CpG humanos no genoma de *T. gondii* foi pelo menos 4 vezes maior, que o de camundongo. Células HEK293T expressando estavelmente TLR9 humano, foram transfectadas com um plasmídeo que tem a expressão de luciferase induzida por NF- $\kappa$ B, portanto sendo utilizado para avaliar indiretamente a ativação de NF- $\kappa$ B. Os nossos resultados indicam que ambos oligonucleotídeos sintéticos de classe B e classe C foram capazes de induzir a ativação de NF- $\kappa$ B (Figura 23A). Os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para estimulação de PBMCs. Como demonstrado na Figura 23B, os oligonucleotídeos contendo motivos CpG ativaram a produção de citocinas pró-inflamatórias, e em especial IL-12p40 e IL-12p70, em PBMCs humanas primadas com IFN- $\gamma$ .



**Figura 23- Oligonucleotídeos contendo motivos CpGs sinalizam via TLR9 humano e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs humanas.** (A) Células HEK293T expressando TLR9 humano e transfectadas com plasmídeo codificando Luciferase induzido por NF- $\kappa$ B foram estimuladas com oligonucleotídeos humanos contendo motivos CpG de classe B e C derivados de *T. gondii* na concentrações de 3  $\mu$ M (círculo preto), 1  $\mu$ M (cinza escuro), 0.3  $\mu$ M (cinza claro) e 0.1  $\mu$ M (branco). Asteriscos indicando quando são significantes estatisticamente quando ml) foram estimuladas com oligonucleotídeos humanos contendo motivos CpG de classe B e C derivados de *T. gondii* (5  $\mu$ M). Os níveis das citocinas foram dosados após 18 hrs de estimulação. Dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $0.01 < p < 0.05$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , e \*\*\* $p < 0.001$ .



## 6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose causada pelo parasita *T. gondii* é uma das infestações mais comuns em humanos, e mais de 350 espécies de aves e mamíferos já foram descritas como alvos deste parasita (Dubey, 2009). Apesar da alta frequência dentro das populações humanas, a ocorrência de sinais clínicos da toxoplasmose é baixa em indivíduos imunologicamente competentes, pois leva ao desenvolvimento de uma forte resposta imune celular, a qual resulta no controle eficaz do parasita, no entanto, o parasita permanece alojado no organismo do indivíduo sob a forma de cistos sem ocasionar sinais clínicos da doença (Miller et al., 2009). Infecções pelo *T. gondii* induzem uma rápida resposta imune com perfil pró-inflamatório, necessária para sobrevivência do hospedeiro, mas que também garante a persistência do parasita (Gazzinelli and Denkers, 2006). Essa resposta recruta uma ampla gama de células, tais como linfócitos T CD4+ e T CD8+, macrófagos, DCs e NKs (Miller et al., 2009).

Os TLRs são proteínas transmembrana responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs (Beutler, 2009; Hoffmann, 2003). Tem sido constantemente demonstrado que esta família de receptores é a principal maneira pela qual o sistema imune inato reconhece e responde a presença de microrganismos e de outros agentes infecciosos (Gazzinelli and Denkers, 2006; Takeda et al., 2003). Na Toxoplasmose murina, TLR2, TLR4 e TLR11 têm papel importante no reconhecimento de moléculas do parasita. O TLR11 atua como principal receptor da resposta imune inata contra o *T. gondii* na indução de IL-12, reconhecendo a proteína profilina, cuja função esta ligada à polimerização de actina para motilidade e invasão celular (Daher et al., 2010; Plattner et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). Já TLR2 e TLR4, reconhecem âncoras GPI isoladas da superfície celular do parasita (Debierre-Grockiego et al., 2007). Apesar de animais deficientes em TLRs individuais não apresentarem aumento na susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (Debierre-Grockiego et al., 2007; Yarovinsky et al., 2005), animais deficientes em MyD88, são extremamente susceptíveis (Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008). Nosso grupo demonstrou que camundongos 3d são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, tendo um grande defeito na produção de IL-12 e atraso na produção de IFN- $\gamma$ , levando a morte do hospedeiro (Melo et al., 2010). Nesta tese de doutorado tivemos como objetivo principal de nosso trabalho a identificação dos TLRs responsáveis pelo reconhecimento ao *T. gondii*, e pelo fenótipo de susceptibilidade observado em camundongos 3d após a infecção por *T. gondii*.

Neste trabalho demonstramos que além de TLR3, TLR7, TLR9 e TLR11 (Kim et al., 2008; Pifer et al., 2011; Tabeta et al., 2006), TLR12 também é um TLR intracelular presente no ER e tem sua função mediada por UNC93B1, e além disso, que TLR11 e TLR12 funcionam como heterodímeros no reconhecimento de moléculas do *T. gondii* (profilina). Utilizando diferentes combinações de camundongos deficientes em TLRs intracelulares, demonstramos que TLR7, TLR9 e TLR11 são os principais responsáveis pelo reconhecimento ao *T. gondii* em camundongos, e que TLR7, TLR9 e possivelmente outros receptores reconhecem o parasita e iniciam a resposta imune em humanos.

UNC93B1 é uma proteína chaperone presente no ER que medeia a translocação de TLR3, TLR7, TLR9 e TLR11 a partir deste compartimento para o endolisossomo (Kim et al., 2008; Pifer et al., 2011; Tabeta et al., 2006). UNC93B1 interage diretamente com TLR3, TLR7 e TLR9 e o complexo transloca para o endolisossomo (Brinkmann et al., 2007). Em nosso estudo anterior, foi demonstrado que camundongos 3d, que possuem TLR3, TLR7, e TLR9 não funcionais, são extremamente susceptíveis à infecção com *T. gondii* (Melo et al., 2010). Como animais nocautes somente para TLR3, TLR7 ou TLR9 são resistentes à infecção por *T. gondii*, sugeriu-se que uma deficiência combinada de TLRs de reconhecimento a ácidos nucleicos seria responsável pelo fenótipo observado em camundongos 3d. Também foi observada uma maior replicação de taquizoítos em macrófagos de camundongos 3d, e translocação de UNC93B1 para o PV após infecção com taquizoítos de *T. gondii* (Melo et al., 2010), o que gerou uma segunda hipótese de que UNC93B1 poderia estar envolvida no controle da replicação do parasita no interior do PV.

Nossos resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 demonstraram que após o protocolo de vacinação com a cepa cps1.1, camundongos 3d foram capazes de gerar uma resposta imune adquirida, medida pelos níveis de anticorpos e IFN- $\gamma$ , e foram capazes de controlar a infecção com a cepa ME49. O mesmo resultado foi demonstrado para animais MyD88 nocautes (Sukhumavasi et al., 2008), indicando que apesar dos TLRs mediados por UNC93B1 e MyD88 serem importantes para a resposta imune inata e produção de IL-12 após infecção com *T. gondii*, a falta destes receptores não é totalmente crucial para a geração de uma resposta imune adquirida. Ao contrário do observado para camundongos 3d e MyD88 nocautes, animais iGTP nocautes mesmo desenvolvendo uma resposta imune adquirida normal, não são capazes de controlar a infecção por *T. gondii*. IRGs são induzidas por IFN- $\gamma$  e são importantes no controle do crescimento do parasita no PV (Melzer et al., 2008), portanto mesmo com altos níveis de IFN- $\gamma$ , a falta da molécula efetora

iGTP leva à morte dos camundongos infectados. Esse resultado indica que diferentemente de iGTP, que possui função em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (Collazo et al., 2002), o que também ocorre em relação à IFN- $\gamma$  (Yap and Sher, 1999), UNC93B1 está principalmente envolvida nas células de linhagem hematopoiética na infecção por *T. gondii* para translocação e posterior ativação dos TLRs intracelulares. Nos experimentos de quimera mista, mostrados na Figura 7, os resultados apoiam a hipótese, pois células provenientes de camundongos 3d são tão permissivas quanto as células de camundongo selvagem ao crescimento do parasita. Quando essas células são primadas, ocorre indução normal das IRGs (Irga6, Irgm1 e Irgm3) importantes para o controle do crescimento do parasita (Melo et al., 2010). Tendo em conta estes resultados, propomos que o defeito primário em camundongos 3d é a produção diminuída de IL-12, e consequente atraso na produção de IFN- $\gamma$  e no desenvolvimento adequado de uma imunidade protetora. Este defeito seria gerado pela falta de translocação dos TLRs intracelulares do ER para o endolisossomo para o reconhecimento de moléculas do parasita.

Além do DNA bacteriano ser reconhecido por TLR9 (Hemmi et al., 2000), o DNA contendo motivos CpG presente no genoma de protozoários é capaz de estimular TLR9 humano e murino (Bafica et al., 2006; Bartholomeu et al., 2008; Drennan et al., 2005; Parroche et al., 2007), o mesmo também observado para RNA de *T. cruzi* via TLR7 (Caetano et al., 2011). Além disso, camundongos TLR3/TLR7/TLR9 nocautes são susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Caetano et al., 2011) ou a *Leishmania major* (Schamber-Reis et al., 2013)

No presente trabalho relatamos que ambos DNA genômico e RNA purificados de *T. gondii* ativam DCs e macrófagos via TLR9 e TLR7, respectivamente, induzindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências contendo motivos CpG identificadas no genoma do *Toxoplasma*, também mostraram ser estimulatórias para DCs *in vitro*, semelhante aos resultados obtidos para *T. cruzi* (Bartholomeu et al., 2008) e *P. Falciparum* (Parroche et al., 2007). No entanto, os camundongos triplos TLR3/TLR7/TLR9 nocautes tiveram uma resposta de IL-12 e IFN- $\gamma$  normais após a infecção, e foram apenas um pouco mais susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*. Portanto, levantamos a hipótese de que algum TLR adicional envolvido na imune inata ao *T. gondii* estaria envolvido, e o candidato natural foi TLR11, devido a sua importância na indução de IL-12 (Yarovinsky et al., 2005).

Pifer e colaboradores, demonstraram que TLR11 é também um TLR endossomal, e a sua ativação por TgPRF também é mediada por UNC93B1 (Pifer et al., 2011). Este resultado foi

surpreendente pois até pouco tempo a suposição era de que os TLRs endossomais eram todos sensores de ácidos nucleicos, e que provavelmente co-evoluíram com vírus que ganharam entrada em células por via endossomal. Essa observação foi altamente relevante, tendo em vista que camundongos deficientes em TLR11 tem defeito na produção de IL-12 e aumento da patologia quando infectados com *T. gondii*.

Investigando mais profundamente a relação entre os TLRs, vimos através da geração de uma árvore molecular dos TLRs murinos, que TLR11 e TLR12 são agrupados muito próximos e possuem 35% de similaridade de sequência primária. Através de microscopia confocal, utilizando células HEK293T ou macrófagos expressando TLR11 e TLR12, confirmamos que TLR11 está presente no ER, e que TLR12, como TLR3, TLR7, TLR9 e TLR11 (Kawai and Akira, 2011), também é um TLR intracelular presente no ER. Comumente quando proteínas são superexpressas em células HEK293T, elas se acumulam no ER, dando uma falsa impressão de localização neste compartimento. Os resultados com TLR4 mostraram uma localização diferente a de TLR11 e TLR12, pois TLR4 se localizou na membrana plasmática, como esperado (Latz et al., 2004).

Nossos resultados utilizando camundongos TLR11 deficientes corroboram os dados da literatura, onde camundongos TLR11 deficientes tem uma redução na produção de IL-12, mas níveis de IFN- $\gamma$  suficientes para controlar a proliferação do parasita na fase aguda (Yarovinsky et al., 2005). Quando comparamos a resposta imune de camundongos 3d a de camundongos TLR11 nocautes, vimos que TLR11 nocaute possuem níveis mais elevados de IL-12 e IFN- $\gamma$ , indicando que apesar de profilina/TLR11 serem os principais indutores de IL-12, outro(s) TLR(s) mediado(s) por UNC93B1, também estão envolvidos na indução. Este cenário complicado nos convenceu da necessidade da geração de camundongos quádruplos TLR3/TLR7/TLR9/TLR11 nocautes, e estes animais quando infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* tiveram um grande defeito na produção de IL-12/IFN- $\gamma$  e são altamente susceptíveis à infecção. Paralelamente a nossas descobertas, Koblansky e colaboradores demonstraram que camundongos TLR12 deficientes são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii* (Koblansky et al., 2013). Foi demonstrado que TLR12 também reconhece a proteína profilina de *T. gondii*, e que TLR11 e TLR12 respondem como heterodímeros. A maior susceptibilidade de camundongos TLR12 a camundongos TLR11, é devido ao fato de que em células dendríticas plasmocitóides, TLR11 não é necessário para o reconhecimento da profilina e para a indução de IL-12 e IFN- $\alpha$ , ambos importantes na fase aguda da infecção (Koblansky et al., 2013). Estes resultados vão contra todos nossos dados onde demonstramos que TLR11 e TLR12

são ambos necessários para o reconhecimento da profilina, que TLR12 não formam homodímeros após estimulação com rTgPRF ou STAg, e principalmente onde demonstramos que camundongos TLR12 deficientes não são susceptíveis à infecção por *T. gondii*.

Além da profilina ser importante na indução de IL-12, nossos resultados indicam que DNA e RNA de *Toxoplasma* também possuem papel *in vivo* na indução de IL-12 e início da resposta. Tem sido constantemente demonstrado que DCs são as principais produtoras de IL-12 após a infecção por *T. gondii* (Hou et al., 2011; Mashayekhi et al., 2011; Reis e Sousa et al., 1997; Yarovinsky et al., 2005), e nossos resultados de marcação intracelular de IL-12 corroboram esta hipótese. Além disso, vimos uma redução no recrutamento de monócitos inflamatórios em camundongos 3d e quádruplo nocaute, o que também pode colaborar com a susceptibilidade destes animais (Dunay et al., 2008; Dunay et al., 2010; Dunay and Sibley, 2010). Por volta do oitavo dia após a infecção, camundongos 3d e quádruplo nocaute possuem um elevado número de células (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) na cavidade peritoneal. Acreditamos que o defeito na indução de IL-12 e IFN- $\gamma$ , e recrutamento celular atrasado, seja a causa da mortalidade durante a fase aguda. Recentemente, foi demonstrado que a produção de IL-12 ocorre principalmente via DCs plasmocitoides (Goldszmid et al., 2012), mas esses dados não são suportados por nossos dados, onde demonstramos que DCs CD8<sup>+</sup> expressam altos níveis de TLR11 e TLR12, e também pela literatura existente que demonstrou que DCs CD8<sup>+</sup> são as principais produtoras de IL-12 após a infecção por *T. gondii* (Mashayekhi et al., 2011; Yarovinsky et al., 2005).

Outro fato importante é que camundongos deficientes em TLR7/TLR9/TLR11, também são altamente susceptíveis à infecção, indicando que TLR3 tem um papel marginal na infecção quando combinado à deficiência de TLR7/TLR9/TLR11. Apesar de não evidenciado, principalmente por animais deficientes em TLR3, TRIF e receptor de IFN do tipo 1 serem resistentes à infecção por *T. gondii*, TLR3 parece ser importante pois animais TLR3/TLR7/TLR9 nocautes são parcialmente susceptíveis à infecção, ao passo que camundongos TLR7/TLR9 são resistentes.

A sobreposição aparente e a função aditiva dos TLRs endossomais, levou-nos a gerar nossa própria árvore filogenética para considerar novas possibilidades sobre como essas moléculas funcionam e se relacionam. Uma descoberta surpreendente foi a similaridade elevada de TLR11 e TLR12, levando-nos a sugerir uma função similar para ambos. Como previamente observado para TLR1, TLR2 e TLR6 (Stewart et al., 2010; Triantafilou et al., 2006; Wyllie et al., 2000) que são também muito próximos filogeneticamente, esta característica sugeriu que TLR11 e TLR12

poderiam funcionar como heterodímeros (Roach et al., 2005). De fato, observamos que tanto TLR11 e TLR12 colocalizam com UNC93B1 quando transfectados em células HEK293T, e uma forte interação, medida por FRET, foi induzida entre TLR11/TLR12 após a estimulação com STAg ou rTgPRF. Este resultado não foi observado quando os TLRs foram expressos isoladamente, sugerindo que a homodimerização não ocorre. Assim propomos que em camundongos, o papel principal de UNC93B1 na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. gondii* é mediar a translocação e função de TLR7, TLR9, TLR11/TLR12 e indução da resposta imune.

A localização de TLR11 e TLR12 no ER, em contraste com os TLRs presentes na superfície da membrana e que reconhecem os componentes da parede celular de bactérias (por exemplo, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), é uma descoberta importante. Nossas descobertas, juntamente com dados da literatura sobre a resposta imune à infecção por protozoários parasitas, indicam que TLRs intracelulares são críticos para o reconhecimento destes protozoários *in vivo* (Bafica et al., 2006; Bartholomeu et al., 2008; Caetano et al., 2011; Parroche et al., 2007; Schamber-Reis et al., 2013; Yarovinsky et al., 2005), e que os ligantes para estes TLRs parecem residir dentro do parasita (DNA, RNA, profilina). Após fagocitose, o parasita é destruído no endolisossomo, ocorrendo liberação dos ligantes e ativação dos TLRs. Conforme mostrado para TLR9, é razoável especular que ambos TLR11 e TLR12 transloquem e reconheçam os componentes do parasita nos endolisossomos, e não no PV, que é uma organela que evita fusão com proteínas do hospedeiro, incluindo os lisossomos (Mordue et al., 1999).

Um fato bastante interessante é que exceto para TLR11 e TLR12, todos os outros TLRs endossomais, incluindo TLR13, o qual o agonista foi descrito recentemente, reconhecem DNA ou RNA (Alexopoulou et al., 2001; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2000; Oldenburg et al., 2012). Profilinas são pequenas proteínas de ligação à actina presentes apenas em células eucarióticas, e sua função é de promover a polimerização da actina, trocando ADP por ATP na actina monomérica e a entrega do complexo ATP-actina aos filamentos em crescimento (Pollard et al., 1994). TgPRF possui um papel fundamental na motilidade do taquizoíto, importante para a invasão e saída da célula (Daher et al., 2010). É tentador especular que TgPRF poderia servir como um carreador de sequências nucleotídicas específicas, tornando as acessíveis a TLR11/TLR12 nos endolisossomos, papel similarmente descrito para hemozoína em infecção por *Plasmodium* (Parroche et al., 2007). Contudo, esta hipótese não é suportada pelos nossos resultados, onde mostramos que o tratamento com proteinase K, e não com DNase ou RNase, destrói a capacidade

da profilina em ativar TLR11 e TLR12. Curiosamente, apesar de significativa homologia das profilinas derivadas de protozoários do filo apicomplexa, TLR11 parece ser um receptor altamente específico para TgPRF, praticamente não sendo ativado por proteínas homólogas de outros parasitas relacionados (Yarovinsky et al., 2005). De fato, foi demonstrado que uma porção presente na profilina do *Toxoplasma*, mas não na do Plasmodium, é essencial para ativação de TLR11 (Kucera et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que animais TLR11 deficientes são mais susceptíveis à infecção por *Salmonella typhimurium*, e que TLR11 reconhece a flagelina presente na bactéria. Este resultado demonstrou que além de TLR5, TLR11 também reconhece flagelina (Mathur et al., 2012).

Outro aspecto intrigante da biologia de TLR11 e TLR12 é a sua especificidade em diferentes espécies. *TLR11* em humanos é um pseudogene (Lauw et al., 2005; Zhang et al., 2004), enquanto que *TLR12* não está presente no genoma humano. Roedores como camundongos e ratos, são hospedeiros intermediários naturais do *T. gondii*, por isso especulamos que TLR11 não só foi mantido nestes animais como receptor funcional, mas também duplicado como um mecanismo de resistência do hospedeiro ao parasita. Esta interpretação tem um precedente, que é a família das IRGs, que são altamente expandidas em camundongos, mas não estão presentes no genoma humano, e tem como função o controle da replicação do parasita no PV (Howard et al., 2011; Hunn et al., 2011). Embora não haja nenhuma evidência do envolvimento de TLR11 no reconhecimento de *T. gondii* durante a infecção humana, pode-se imaginar que TLR11 desempenhe um papel indireto na doença humana, devido ao papel que os ratos/camundongos tem na transmissão do parasita para gatos, que podem então infectar os seres humanos.

Outro fato interessante é que em camundongos, TLR8 não possui um ligante conhecido, ao passo que TLR7 é amplamente expresso e funciona como receptor para ssRNA (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Considerando humanos, TLR7 possui uma distribuição celular muito restrita, sendo que DCs mieloides e monócitos não expressam TLR7. Nestas populações ssRNA são reconhecidos via TLR8. Em DCs plasmocitóides (não expressam TLR8), TLR7 é ativo e responde às infecções por vírus de RNA (Forsbach et al., 2008). Assim, levando em consideração a ausência da expressão de TLR11 e TLR12 em seres humanos, estes dados permitem concluir mais uma diferença entre camundongos e humanos, e especular que TLR7, TLR8 e TLR9 são os TLRs importantes na toxoplasmose humana.

É importante notar que em relação a LPS (TLR4 agonista) e R848 (TLR7 agonista), PBMCs humanas purificadas de doadores saudáveis não infectados são pouco responsivas à STAg, e não possuem qualquer resposta a TgPRF. No entanto, produziram níveis significativos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando estimulados com ambos DNA ou RNA purificados de taquizoítos de ME49, bem como oligonucleotídeos contendo motivos CpG derivados do genoma do *Toxoplasma*. Foi demonstrado que a estimulação de células do cordão umbilical com IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  inibe a replicação do *T. gondii* nestas células, sendo importante para o controle da transmissão congênita (Dimier and Bout, 1993). Além disso, quando sensibilizados com IFN- $\gamma$ , as PBMCs humanas produziram níveis elevados de IL-12p40/70 após estimulação com DNA ou RNA de *Toxoplasma*, mas não com STAg ou TgPRF. O precedente para a importância de IFN- $\gamma$  na produção de IL-12 também existe no modelo de toxoplasmose murina (Gazzinelli et al., 1994; Goldszmid et al., 2012). Um grande número de mecanismos tem sido descrito com efetivos no controle da infecção pelo *T. gondii* em camundongos, tal como NO (Adams et al., 1990), espécies reativas de oxigênio (Murray and Cohn, 1979), depleção de ferro (Dimier and Bout, 1998) e depleção de triptofano (Pfefferkorn, 1984), já os mecanismos em macrófagos humanos não são bem definidos. Enquanto que o papel de NO é controverso (Murray and Teitelbaum, 1992; Peterson et al., 1995; Schneemann et al., 1993), a depleção de triptofano parece ser muito importante em humanos (Pfefferkorn, 1986) e espécies reativas de oxigênio parecem ser em parte responsáveis pela defesa anti-Toxoplasma (Murray et al., 1985).

O papel de IFN- $\gamma$  na toxoplasmose murina é bem caracterizado (Denkers and Gazzinelli, 1998; Gazzinelli et al., 1994; Miller et al., 2009; Suzuki et al., 1988), mas na toxoplasmose humana é um pouco controverso, uma vez que pacientes com diferentes tipos de mutação que levam a fenótipos mais ou menos severos na sinalização via IFN- $\gamma$  não são mais susceptíveis à infecção por *T. gondii*, mas sim por *S. Typhimurium* (Janssen et al., 2002). Apesar dos monócitos destes pacientes serem mais permissivos ao crescimento do *T. gondii* *in vitro*, acredita-se que *in vivo*, TNF- $\alpha$  tenha uma papel compensatório para a falta de IFN- $\gamma$ . Mas outros trabalhos mostraram a importância de IFN- $\gamma$  na infecção por *T. gondii*. Foi demonstrado que baixos níveis de IL-8 e IFN- $\gamma$  no sangue de pacientes infectados pelo *Toxoplasma* pode levar a reativação da toxoplasmose ocular (Czepiel et al., 2011) e que pacientes cronicamente infectados possuem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Prigione et al., 2006).



Em relação a TNF- $\alpha$ , diversos trabalhos tem demonstrado sua importância na toxoplasmose humana. Foi descrito que células THP-1 infectadas com *T. gondii*, tem redução na produção de TNF- $\alpha$  após estimulação com IFN- $\gamma$  e LPS, e que além do controle da expressão de TNF- $\alpha$ , a expressão do receptor de TNF também é reduzida (Belloni et al., 2003). Também foi demonstrado que a inibição do crescimento do *T. gondii* em DCs imaturas e monócitos é dependente da expressão do receptor de TNF (Giese et al., 2004).

Apesar dos humanos serem considerados hospedeiros intermediários acidentais, um terço da população humana no mundo esta cronicamente infectada com *T. gondii* (Robert-Gangneux and Darde, 2012). Apesar da alta taxa de infecção dentro da população humana, a manifestação de sinais clínicos da doença é um fato raro em indivíduos saudáveis. A forma severa da doença aparece em indivíduos imunossuprimidos e também em recém-nascidos que são infectados por via congênita (Elmore et al., 2010).

Embora possamos especular as pressões evolutivas que deram origem à *TLR11* em camundongos, não se sabe por que o gene tornou-se não-codificante em humanos. Uma possibilidade seria que devido a ativação via TLR11 gerar uma alta resposta pró-inflamatória, a mesma poderia ser deletéria para humanos, onde indivíduos sem a presença de TLR11 gerariam uma resposta suficiente para o controle da infecção. Uma outra possibilidade seria que devido a deleção de *TLR12* do genoma humano, TLR11 deixou de ser funcional devido a falta de pressão de seleção. Nossa segunda hipótese se baseia em dados não publicados que demonstram que animais como Chimpanzé (*Pan troglodytes*), Bonobo (*Pan paniscus*) e Gorila (*Gorilla gorilla*) que também não possuem *TLR12* no genoma, todos possuem *TLR11* como um pseudogene.

Nossos resultados têm implicações importantes para a Toxoplasmose humana, pois devido a ausência de *TLR11* e *TLR12* funcionais no genoma humano, TLRs alternativos, como também outros receptores da imunidade inata seriam responsáveis pela detecção do parasita, gerando uma resposta imune inata e adaptativa após à infecção pelo *T. gondii*. Nossos dados aqui apresentados mostram que PBMCs humanas produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, em resposta a RNA e DNA de *T. gondii*, mas não a rTgPRF. Finalmente, um estudo recente relata uma associação de um polimorfismo único em TLR9 e o desenvolvimento de toxoplasmose ocular (Peixoto-Rangel et al., 2009).

Assim, propomos que diferentemente de camundongos, onde TLR11 e TLR12 possuem uma função importante na resposta imune ao *T. gondii*, em humanos os TLRs de reconhecimento a ácidos nucleicos, bem como as vias de sinalização que eles ativam, são importantes na resistência à infecção e nos resultados clínicos da toxoplasmose humana.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, concluímos que além da importância previamente demonstrada para TLR11 na infecção por *Toxoplasma gondii*, demonstramos que TLR12 também é um TLR intracelular mediado por UNC93B1, e reconhece a proteína profilina de *T. gondii* através da formação de heterodímeros com TLR11. RNA e DNA de *T. gondii* ativam células humanas e murinas e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, e quando combinamos a ausência de TLR7, TLR9 e TLR11 em camundongos, os mesmos são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*, recuperando o fenótipo observado em camundongos 3d. Portanto os TLRs importantes para o reconhecimento do *T. gondii* são todos intracelulares, condizente com o modo de infecção do mesmo.

Como ambos TLR11 e TLR12 estão ausentes em humanos, concluímos que TLR7 e TLR9 são importantes para o reconhecimento e início da resposta imune após a infecção pelo *T. gondii* em humanos, não descartando a existência de outros receptores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, L.B., Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., and Krahenbuhl, J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. J Immunol **144**, 2725-2729.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature **413**, 732-738.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B., and Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol **1**, 83-87.
- Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Syst Biol **55**, 539-552.
- Araujo, P.R., and Ferreira, A.W. (2008). Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. Rev Soc Bras Med Trop **41**, 142-147.
- Arsenijevic, D., Bilbao, F.D., Giannakopoulos, P., Girardier, L., Samec, S., and Richard, D. (2001). A role for interferon-gamma in the hypermetabolic response to murine toxoplasmosis. Eur Cytokine Netw **12**, 518-527.
- Avelino, M.M., Campos, D., Jr., Parada, J.B., and Castro, A.M. (2004). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. Braz J Infect Dis **8**, 164-174.
- Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (2006). Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol **177**, 3515-3519.
- Bahia-Oliveira, L.M., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C., Orefice, F., and Addiss, D.G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis **9**, 55-62.
- Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L., and Barton, G.M. (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. Annu Rev Immunol **29**, 185-214.
- Barber, G.N. (2011). Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. Curr Opin Immunol **23**, 10-20.
- Barragan, A., and Hitziger, N. (2008). Transepithelial migration by *Toxoplasma*. Subcell Biochem **47**, 198-207.

- 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.
- Batista, M.V., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Clemente, W.T., Girao, E.S., Rosa, D.R., Ianhez, L.E., Bonazzi, P.R., Lima, A.S., Fernandes, P.F., *et al.* (2011). Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. Trop Med Int Health **16**, 1134-1142.
- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., and Sibley, L.D. (2011). Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. Proc Natl Acad Sci U S A **108**, 9631-9636.
- Belloni, A., Villena, I., Gomez, J.E., Pelloux, H., Bonhomme, A., Guenounou, M., Pinon, J.M., and Aubert, D. (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha and its specific receptors during *Toxoplasma gondii* infection in human monocytic cells. Parasitol Res **89**, 207-213.
- Berger, F., Goulet, V., Le Strat, Y., and Desenclos, J.C. (2009). Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. Rev Epidemiol Sante Publique **57**, 241-248.
- Beutler, B.A. (2009). TLRs and innate immunity. Blood **113**, 1399-1407.
- Bhadra, R., Guan, H., and Khan, I.A. (2010). Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against *Toxoplasma gondii*. PLoS One **5**, e10842.
- Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev **64**, 607-623.
- Blader, I.J., Manger, I.D., and Boothroyd, J.C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. J Biol Chem **276**, 24223-24231.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. Immunity **32**, 305-315.
- Bliss, S.K., Marshall, A.J., Zhang, Y., and Denkers, E.Y. (1999). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. J Immunol **162**, 7369-7375.
- Boia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Sodre, F.C., Pinto, G.M., and Amendoeira, M.R. (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**, 17-20.
- Bojar, I., and Szymanska, J. (2010). Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. Ann Agric Environ Med **17**, 209-214.
- Boothroyd, J.C., and Dubremetz, J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. Nat Rev Microbiol **6**, 79-88.

Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol **67**, 508-514.

Bradley, P.J., and Sibley, L.D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. Curr Opin Microbiol **10**, 582-587.

Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., *et al.* (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem **280**, 34245-34258.

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.

Buffolano, W. (2008). Congenital toxoplasmosis: the state of the art. Parasitologia **50**, 37-43.

Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., and Denkers, E.Y. (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. PLoS Pathog **7**, e1002236.

Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., and Denkers, E.Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. J Immunol **167**, 2193-2201.

Butcher, B.A., Kim, L., Panopoulos, A.D., Watowich, S.S., Murray, P.J., and Denkers, E.Y. (2005). IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. J Immunol **174**, 3148-3152.

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.

Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol **167**, 416-423.

Carellos, E.V., Andrade, G.M., and Aguiar, R.A. (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**, 391-401.

Carruthers, V., and Boothroyd, J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Curr Opin Microbiol **10**, 83-89.

Casrouge, A., Zhang, S.Y., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., Puel, A., Yang, K., Alcais, A., Picard, C., Mahfoufi, N., Nicolas, N., *et al.* (2006). Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. Science **314**, 308-312.

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

Collazo, C.M., Yap, G.S., Hieny, S., Caspar, P., Feng, C.G., Taylor, G.A., and Sher, A. (2002). The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments. Infect Immun **70**, 6933-6939.

Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F., Sher, A., and Taylor, G.A. (2001). Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. J Exp Med **194**, 181-188.

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

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res **16**, 10881-10890.

Couvreur, J., Thulliez, P., Daffos, F., Aufrant, C., Bompard, Y., Gesquiere, A., and Desmonts, G. (1993). In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. Fetal Diagn Ther **8**, 45-50.

Czepiel, J., Biesiada, G., Sobczyk-Krupiarz, I., Miklasszewska, G., Fedak, D., Solnica, B., Mach, T., and Garlicki, A. (2011). [Interleukin 8 and interferon gamma in ocular toxoplasmosis]. Klin Oczna **113**, 149-152.

Dabritz, H.A., and Conrad, P.A. (2010). Cats and Toxoplasma: implications for public health. Zoonoses Public Health **57**, 34-52.

Daher, W., Plattner, F., Carlier, M.F., and Soldati-Favre, D. (2010). Concerted action of two formins in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog **6**, e1001132.

de Medeiros, B.C., de Medeiros, C.R., Werner, B., Loddo, G., Pasquini, R., and Bleggi-Torres, L.F. (2001). Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. Transpl Infect Dis **3**, 24-28.

Debierre-Grockiego, F., Azzouz, N., Schmidt, J., Dubremetz, J.F., Geyer, H., Geyer, R., Weingart, R., Schmidt, R.R., and Schwarz, R.T. (2003). Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages. J Biol Chem **278**, 32987-32993.

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.

Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.M., and Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. BMC Evol Biol **10**, 8.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science **303**, 1529-1531.

Dimier, I.H., and Bout, D.T. (1993). Co-operation of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Immunology **79**, 336-338.

Dimier, I.H., and Bout, D.T. (1998). Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. Immunology **94**, 488-495.

Drennan, M.B., Stijlemans, B., Van den Abbeele, J., Quesniaux, V.J., Barkhuizen, M., Brombacher, F., De Baetselier, P., Ryffel, B., and Magez, S. (2005). The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. J Immunol **175**, 2501-2509.

Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol **126**, 57-72.

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

Dubey, J.P., Gomez-Marin, J.E., Bedoya, A., Lora, F., Vianna, M.C., Hill, D., Kwok, O.C., Shen, S.K., Marcet, P.L., and Lehmann, T. (2005). Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. Vet Parasitol **134**, 67-72.

Dubey, J.P., Graham, D.H., Blackston, C.R., Lehmann, T., Gennari, S.M., Ragozo, A.M., Nishi, S.M., Shen, S.K., Kwok, O.C., Hill, D.E., *et al.* (2002). Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol **32**, 99-105.



- Dubey, J.P., Lago, E.G., Gennari, S.M., Su, C., and Jones, J.L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology **139**, 1375-1424.
- Dubremetz, J.F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. Cell Microbiol **9**, 841-848.
- 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.
- Dunay, I.R., Fuchs, A., and Sibley, L.D. (2010). Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. Infect Immun **78**, 1564-1570.
- Dunay, I.R., and Sibley, L.D. (2010). Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Opin Immunol **22**, 461-466.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends Parasitol **26**, 190-196.
- Ferreira Ade, M., Vitor, R.W., Gazzinelli, R.T., and Melo, M.N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. Infect Genet Evol **6**, 22-31.
- Ferreira, M.S., and Borges, A.S. (2002). Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz **97**, 443-457.
- Forsbach, A., Nemorin, J.G., Montino, C., Muller, C., Samulowitz, U., Vicari, A.P., Jurk, M., Mutwiri, G.K., Krieg, A.M., Lipford, G.B., *et al.* (2008). Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. J Immunol **180**, 3729-3738.
- Gazzinelli, R.T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J.M., and Sher, A. (1996). Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol **219**, 127-139.
- 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-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol **153**, 2533-2543.
- Giese, A., Stuhlsatz, S., Daubener, W., and MacKenzie, C.R. (2004). Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF-alpha receptor 2. J Immunol **173**, 3366-3374.

- Giraldo, M., Cannizzaro, H., Ferguson, M.A., Almeida, I.C., and Gazzinelli, R.T. (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**, 1453-1460.
- 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-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. Immunity **36**, 1047-1059.
- 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., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature **408**, 740-745.
- Hill, D., and Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect **8**, 634-640.
- Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. Nature **426**, 33-38.
- Hofhuis, A., van Pelt, W., van Duynhoven, Y.T., Nijhuis, C.D., Mollema, L., van der Klis, F.R., Havelaar, A.H., and Kortbeek, L.M. (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**, 530-538.
- Hou, B., Benson, A., Kuzmich, L., DeFranco, A.L., and Yarovinsky, F. (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**, 278-283.
- 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.
- Howe, D.K., Honore, S., Derouin, F., and Sibley, L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol **35**, 1411-1414.
- Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis **172**, 1561-1566.
- Hunn, J.P., Feng, C.G., Sher, A., and Howard, J.C. (2011). The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. Mamm Genome **22**, 43-54.

- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., and Remington, J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infect Immun **62**, 2818-2824.
- Innes, E.A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health **57**, 1-7.
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annu Rev Immunol **20**, 197-216.
- Janssen, R., Van Wengen, A., Verhard, E., De Boer, T., Zomerdijk, T., Ottenhoff, T.H., and Van Dissel, J.T. (2002). Divergent role for TNF-alpha in IFN-gamma-induced killing of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella typhimurium* contributes to selective susceptibility of patients with partial IFN-gamma receptor 1 deficiency. J Immunol **169**, 3900-3907.
- Johnson, L.L., and Sayles, P.C. (2002). Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. Infect Immun **70**, 185-191.
- Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., and Wilson, M. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. Am J Trop Med Hyg **77**, 405-410.
- Jordan, K.A., and Hunter, C.A. (2010). Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. Exp Parasitol **126**, 318-325.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol **11**, 373-384.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity **34**, 637-650.
- Khan, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., and Luster, A.D. (2006). CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. PLoS Pathog **2**, e49.
- Kijlstra, A., and Jongert, E. (2009). Toxoplasma-safe meat: close to reality? Trends Parasitol **25**, 18-22.
- Kim, K., and Weiss, L.M. (2008). Toxoplasma: the next 100 years. Microbes Infect **10**, 978-984.
- 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.

- Kravetz, J.D., and Federman, D.G. (2005a). Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. Infect Dis Obstet Gynecol **13**, 161-165.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. Immunity **38**, 119-130.
- Kravetz, J.D., and Federman, D.G. (2005b). Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med **118**, 212-216.
- Kucera, K., Koblansky, A.A., Saunders, L.P., Frederick, K.B., De La Cruz, E.M., Ghosh, S., and Modis, Y. (2010). Structure-based analysis of *Toxoplasma gondii* profilin: a parasite-specific motif is required for recognition by Toll-like receptor 11. J Mol Biol **403**, 616-629.
- Lago, E.G., Conrado, G.S., Piccoli, C.S., Carvalho, R.L., and Bender, A.L. (2009). *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-infected pregnant women and the risk of congenital toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**, 345-351.
- Laliberte, J., and Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Cell Mol Life Sci **65**, 1900-1915.
- LaRosa, D.F., Stumhofer, J.S., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Taylor, D.K., Hunter, C.A., and Turka, L.A. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A **105**, 3855-3860.
- 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.
- Lauw, F.N., Caffrey, D.R., and Golenbock, D.T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. Trends Immunol **26**, 509-511.
- Lebech, M., Larsen, S.O., and Petersen, E. (1993). Prevalence, incidence and geographical distribution of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women in Denmark. Scand J Infect Dis **25**, 751-756.
- Lejeune, M., Miro, J.M., De Lazzari, E., Garcia, F., Claramonte, X., Martinez, E., Ribera, E., Arrizabalaga, J., Arribas, J.R., Domingo, P., *et al.* (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**, 662-670.

- 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 U S A **105**, 258-263.
- Levine, N.D. (1988). Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. J Protozool **35**, 518-520.
- Liu, C.H., Fan, Y.T., Dias, A., Esper, L., Corn, R.A., Bafica, A., Machado, F.S., and Aliberti, J. (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.
- Lock, J.A. (1953). Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture in mammalian cells. Lancet **1**, 324-325.
- Lopes, F.M., Mitsuka-Bregano, R., Goncalves, D.D., Freire, R.L., Karigyo, C.J., Wedy, G.F., Matsuo, T., Reiche, E.M., Morimoto, H.K., Capobianco, J.D., *et al.* (2009). Factors associated with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Parana, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz **104**, 378-382.
- Luder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M.J., and Gross, U. (2001). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. Eur J Immunol **31**, 1475-1484.
- Lunde, M.N., and Jacobs, L. (1983). Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol **69**, 806-808.
- Lykens, J.E., Terrell, C.E., Zoller, E.E., Divanovic, S., Trompette, A., Karp, C.L., Aliberti, J., Flick, M.J., and Jordan, M.B. (2010). Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. J Immunol **184**, 877-885.
- Mahmoud, A.A., Warren, K.S., and Strickland, G.T. (1976). Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. Nature **263**, 56-57.
- 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., *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.
- 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., Konen-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.
- Melzer, T., Duffy, A., Weiss, L.M., and Halonen, S.K. (2008). The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. Infect Immun **76**, 4883-4894.
- Messier, V., Levesque, B., Proulx, J.F., Rochette, L., Libman, M.D., Ward, B.J., Serhir, B., Couillard, M., Ogden, N.H., Dewailly, E., *et al.* (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). Zoonoses Public Health **56**, 188-197.
- Mets, M.B., Holfels, E., Boyer, K.M., Swisher, C.N., Roizen, N., Stein, L., Stein, M., Hopkins, J., Withers, S., Mack, D., *et al.* (1996). Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. Am J Ophthalmol **122**, 309-324.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., and Smith, N.C. (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol **39**, 23-39.
- Miller, N.L., Frenkel, J.K., and Dubey, J.P. (1972). Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. J Parasitol **58**, 928-937.
- Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. Lancet **363**, 1965-1976.
- Mordue, D.G., Hakansson, 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.
- Mun, H.S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Piao, L.X., Takeuchi, O., Akira, S., Ishikura, H., and Yano, A. (2003). TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. Int Immunol **15**, 1081-1087.
- Murray, H.W., and Cohn, Z.A. (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. J Exp Med **150**, 938-949.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y., Carriero, S.M., Harris, A.M., and Jaffee, E.A. (1985). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J Immunol **134**, 1982-1988.
- Murray, H.W., and Teitelbaum, R.F. (1992). L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. J Infect Dis **165**, 513-517.
- Nakano, S., Morimoto, S., Suzuki, S., Watanabe, T., Amano, H., and Takasaki, Y. (2010). Up-regulation of the endoplasmic reticulum transmembrane protein UNC93B in the B cells of patients with active systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford) **49**, 876-881.

Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., *et al.* (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. Science **337**, 1111-1115.

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

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 U S A **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.

Pena, H.F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., and Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol **38**, 561-569.

Pena, H.F., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., and Gennari, S.M. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res Vet Sci **81**, 58-67.

Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., and Su, C. (2009). *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiol **4**, 1363-1379.

Pergola, G., Cascone, A., and Russo, M. (2010). Acute pericarditis and myocarditis by *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man: a case report. Infez Med **18**, 48-52.

Peterson, P.K., Gekker, G., Hu, S., and Chao, C.C. (1995). Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. J Infect Dis **171**, 516-518.

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc Natl Acad Sci U S A **81**, 908-912.

Pfefferkorn, E.R., Eckel, M., and Rebhun, S. (1986). Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. Mol Biochem Parasitol **20**, 215-224.

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.
- Pollard, T.D., Almo, S., Quirk, S., Vinson, V., and Lattman, E.E. (1994). Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. Annu Rev Cell Biol **10**, 207-249.
- Prigione, I., Chiesa, S., Taverna, P., Ceccarelli, R., Frulio, R., Morandi, F., Bocca, P., Cesbron-Delauw, M.F., and Pistoia, V. (2006). T cell mediated immune responses to *Toxoplasma gondii* in pregnant women with primary toxoplasmosis. Microbes Infect **8**, 552-560.
- Reese, M.L., Zeiner, G.M., Saeij, J.P., Boothroyd, J.C., and Boyle, J.P. (2011). Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. Proc Natl Acad Sci U S A **108**, 9625-9630.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med **186**, 1819-1829.
- Resende, M.G., Fux, B., Caetano, B.C., Mendes, E.A., Silva, N.M., Ferreira, A.M., Melo, M.N., Vitor, R.W., and Gazzinelli, R.T. (2008). The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. An Acad Bras Cienc **80**, 85-99.
- Ribeiro, A.C., Mutis, M.S., and Fernandes, O. (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**, 591-594.
- 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 U S A **102**, 9577-9582.
- Robben, P.M., Mordue, D.G., Truscott, S.M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L.D. (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. J Immunol **172**, 3686-3694.
- Robert-Gangneux, F., and Darde, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev **25**, 264-296.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 588-593.
- Rogers, N.M., Peh, C.A., Faull, R., Pannell, M., Cooper, J., and Russ, G.R. (2008). Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. Transpl Infect Dis **10**, 71-74.



- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D., and Saeij, J.P. (2011). Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. J Exp Med **208**, 195-212.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., and Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. Trends Parasitol **21**, 476-481.
- Santiago, H.C., Oliveira, M.A., Bambilra, E.A., Faria, A.M., Afonso, L.C., Vieira, L.Q., and Gazzinelli, R.T. (1999). Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. Infect Immun **67**, 4939-4944.
- 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.
- Schamber-Reis, B.L., Petritus, P.M., Caetano, B.C., Martinez, E.R., Okuda, K., Golenbock, D., Scott, P., and Gazzinelli, R.T. (2013). UNC93B1 and nucleic acid-sensing Toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. J Biol Chem.
- Schneemann, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L., and Schaffner, A. (1993). Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J Infect Dis **167**, 1358-1363.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci U S A **90**, 10188-10192.
- 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.
- Sibley, L.D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. Curr Opin Biotechnol **21**, 592-598.
- Silveira, C., Ferreira, R., Muccioli, C., Nussenblatt, R., and Belfort, R., Jr. (2003). Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. Am J Ophthalmol **136**, 370-371.
- Soares, J.A., Nasser, L.S., Carvalho, S.F., and Caldeira, A.P. (2011). [Ocular findings in children with congenital toxoplasmosis]. Arq Bras Oftalmol **74**, 255-257.
- Sobral, C.A., Amendoeira, M.R., Teva, A., Patel, B.N., and Klein, C.H. (2005). Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. Am J Trop Med Hyg **72**, 37-41.

- Spalding, S.M., Amendoeira, M.R., Klein, C.H., and Ribeiro, L.C. (2005). Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop **38**, 173-177.
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2010). Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. PLoS Biol **8**, e1000576.
- Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., *et al.* (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol **11**, 155-161.
- Stutz, A., Kessler, H., Kaschel, M.E., Meissner, M., and Dalpke, A.H. (2012). Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. Immunobiology **217**, 28-36.
- 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., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science **240**, 516-518.
- Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L.E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H., and Gufwoli, E. (2000). IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol **164**, 5375-5382.
- Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., and Zaborowski, P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect **11**, 170-176.
- 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.
- Tait, E.D., and Hunter, C.A. (2009). Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. Mem Inst Oswaldo Cruz **104**, 201-210.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. Annu Rev Immunol **21**, 335-376.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., *et al.* (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. Science **314**, 1776-1780.

Tenter, A.M. (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz **104**, 364-369.

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

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.

Velasco-Castrejon, O., Salvatierra-Izaba, B., Valdespino, J.L., Sedano-Lara, A.M., Galindo-Virgen, S., Magos, C., Llausas, A., Tapia-Conyer, R., Gutierrez, G., and Sepulveda, J. (1992). [Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico]. Salud Publica Mex **34**, 222-229.

Velmurugan, G.V., Dubey, J.P., and Su, C. (2008). Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. Vet Parasitol **155**, 314-318.

Vollmer, J. (2006). CpG motifs to modulate innate and adaptive immune responses. Int Rev Immunol **25**, 125-134.

Wallon, M., Gaucherand, P., Al Kurdi, M., and Peyron, F. (2002). Toxoplasma infections in early pregnancy: consequences and management]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **31**, 478-484.

Whitmarsh, R.J., Gray, C.M., Gregg, B., Christian, D.A., May, M.J., Murray, P.J., and Hunter, C.A. (2011). A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. Cell Host Microbe **10**, 224-236.

Wyllie, D.H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S.C., Boussouf, S., Segal, D.M., Duff, G.W., and Dower, S.K. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol **165**, 7125-7132.

Yap, G.S., and Sher, A. (1999). Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med **189**, 1083-1092.

Yarovinsky, F. (2008). Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. Immunol Lett **119**, 17-21.

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., *et al.* (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.

## 10. APÊNDICE

O artigo anexado no final da tese foi resultado do trabalho realizado durante meu doutorado, no qual publicamos o artigo intitulado “Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice, publicado em janeiro de 2013 na revista *Cell Host & Microbe*. Agradeço a todos os coautores do trabalho pela ajuda durante a realização do mesmo.