



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ANA TEREZA CERQUEIRA LIMA

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DO ANTÍGENO SOLÚVEL
DE *TOXOPLASMA GONDII* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS *IN*
*VITRO***

Salvador, BA
2015

ANA TEREZA CERQUEIRA LIMA

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DO ANTÍGENO SOLÚVEL
DE *TOXOPLASMA GONDII* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS *IN*
*VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo
Co-orientador (a): Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Salvador, BA
2015

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Miudete Cerqueira Lima e José Elson de Lima e aos meus irmãos Helder, Fábria e Vânia e ao meu pequeno e amado sobrinho Caio. A Deus por ter me permitido chegar até aqui me dando força e coragem. A todos os meus familiares que sempre me apoiaram .

AGRADECIMENTOS

Este é um “tempo” especial da minha vida. Momento de agradecer por uma etapa importantíssima. Etapa esta que foi construída ao longo de quatro anos sob muitas expectativas, algumas vezes frustradas, algumas vezes realizadas. Mas acredito que tudo conspirou para que eu chegasse aqui... Momento de fazer estes agradecimentos. São muitas pessoas que fizeram parte deste sonho, seja de forma direta ou indireta. Sem dúvidas agradeço primeiro a Deus pela proteção, por me fazer companhia e por me permitir nascer dos meus pais Miudete Cerqueira Lima e Jose Elson de Lima, pois me ajudaram a formar o caráter e educação que tenho hoje. Obrigada por me compreenderem. Agradeço a Deus por ser irmã de Helder, Fábria e Vânia e por ser tia de Caio e Laise vocês me incentivam a viver e dar o melhor de mim, ainda que seja pouco para alguns.

Obrigada Deus pelos meus tios, primos que me deram carinho e apoio, das mais variadas formas possíveis. Um especial agradecimento a Tia Lourdes, Tia Dal e Tio Cícero. Mas todos foram especiais

Obrigada pelos amigos aqueles que realmente estiveram comigo e pelos quais tenho um carinho muito grande, alguns amigos de longas datas outros que fiz durante a minha jornada no doutorado: Loula, Gabi, Gera, Lilite, Bela, July, Best, Pito, Konrad, Gabriel “ o Baiano” e Gabriel “Marcelo”, Tati, Kenia, Paulo , Mila, Mari e Mila. Agradeço também aos incontáveis colegas que fiz ao longo destes anos que me deram suporte de alguma forma. Agradeço aos colegas que fiz na Universidade de Leiden, Holanda. Em especial a Maria Kaysar , Alwin, Elias , Dra. Maria Yazdanbakhsh por me dar a oportunidade de realização de um sonho e ao meu querido supervisor Dr. Bart Everts quem me deu brilhantes direções na pesquisa.

Agradecimento especial a Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, Dra. Silvia Lima Costa e ao Dr. Ricardo Wagner de Almeida

Agradeço a minha orientadora Dra. Camila Figueiredo. Exemplo de Ética, profissionalismo e respeito. Muito obrigada por ter feito parte de minha vida por tantos anos, dez anos, obrigada pelo respeito com o qual sempre me tratou, obrigada pela CONFIANÇA e pelos ensinamentos você é mil!

Por fim agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

A vida ainda não terminou. E já dizia o poeta "que os sonhos não
envelhecem..."
Vai em frente. Sorriso no rosto e firmeza nas decisões.

Padre Fábio de Melo

"Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém
que acredite que ele possa ser realizado".

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório cuja resposta adaptativa é fortemente TH1. Apesar desta forte resposta TH1, existem fortes evidências da produção de mecanismos imunoregulatórios como a produção de IL-10. Além de participar do controle da resposta adaptativa a IL-10 é produzida durante a resposta imune inata. Esta resposta é caracterizada pela participação de células como macrófagos, células dendríticas e citocinas como IL-12 e TNF- α . A interação entre estas células e o parasito, para a produção destas citocinas, parece ser intermediado por receptores da imunidade inata do tipo Toll: Os receptores Toll Like. A literatura não deixa muito claro qual o verdadeiro papel do Toll Like 4 na interação entre *T. gondii* e células dendríticas. O nosso geral objetivo foi demonstrar o efeito da interação de células dendríticas humanas e o antígeno solúvel de *T. gondii* e qual o envolvimento do TLR-4 na resposta imunológica contra *T. gondii*. Foram utilizadas células dendríticas humanas e antígeno solúvel de *T. gondii*. Após 48 horas da interação das células com antígeno foram avaliados marcadores de maturação e produção de citocinas como a IL-10 e IL-12. A produção de IL-12 foi também avaliada após a interação das células dendríticas com células J558(mimetizam ligação CD40-CD40L) e a expressão de IL-10, IL-12 e TGF- β foi avaliada por PCR. No primeiro artigo, portanto, demonstramos que o antígeno solúvel do parasito estimulou marcadores de maturação CD40(p<0,05), CD80(p<0,05), CD83 (p<0,01), CD86(p<0,05) e HLA-DR (p < 0,05). Produziu significativamente IL-10(p < 0,01) e IL-12(p< 0,05), mas a produção de IL-10 é superior a de IL-10/IL-12(p < 0,01). A IL-12 não foi produzida quando as células dendríticas estiveram em contato com a linhagem de células J558. A expressão de IL-10 (p < 0,01) e de IL-12 (p < 0,01) por PCR foi também observada quando as células dendríticas tiveram contato com o antígeno. A expressão de TGF- β não foi observada. No segundo artigo, no qual bloqueamos o TLR-4 nas células dendríticas a produção de IL-10 e IL-12 foram avaliadas. Foi possível demonstrar que o bloqueio deste receptor impede a produção de IL-10(p < 0,05) e IL-12(p < 0,05). Sendo assim este Toll Like é importante para a resposta inata contra o parasito, mas também é importante para a resposta regulatória demonstrada no primeiro trabalho. Neste trabalho de tese concluímos que o antígeno solúvel dos taquizoítos do parasito *T. gondii* é capaz de estimular resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória através das células dendríticas e que a produção de IL-10 é superior a de IL-12. Concluímos ainda que a produção destas citocinas esta associada ao receptor Toll Like 4.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Imunoregulação. Imunidade inata. Células dendríticas. Receptor Toll Like 4. .

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite whose adaptive response is strongly TH1. Despite this strong TH1 response, there is strong evidence of the production of immunoregulatory mechanisms, such as IL-10 production. Besides participating in the control of adaptive response to IL-10 is produced during the innate immune response. This response is characterized by the involvement of cells such as macrophages, dendritic cells and cytokines such as IL-12 and TNF- α . The interaction between these cells and the parasite, for the production of these cytokines appears to be mediated by the innate immunity receptor Toll like, Toll like receptors. The literature does not very clear what the true role of Toll like 4 in the interaction between *T. gondii* and dendritic cells. Our main objective was to demonstrate the effect of the interaction of dendritic cells and human soluble *T. gondii* antigen and which involvement of TLR-4 in immune response against *T. gondii*. Human dendritic cells and soluble *T. gondii* antigen were used. After 48 hours the interaction of antigen with cell maturation markers were evaluated and the production of cytokines such as IL-10 and IL-12. The production of IL-12 was also evaluated after the interaction with dendritic cells J558 cells (CD40-CD40L binding mimic), and the expression of IL-10, IL-12 and b-GFR was assessed by PCR. In the first article, thus demonstrated that soluble parasite antigen-stimulated maturation markers CD40 ($p < 0.05$), CD80 ($p < 0.05$), CD83 ($p < 0.01$), CD86 ($p < 0.05$) and HLA-DR ($p < 0.05$). IL-10 produced significantly ($p < 0.01$) and IL-12 ($p < 0.05$), but IL-10 production is higher than the IL-10 / IL-12 ($p < 0.01$). IL-12 was not produced when dendritic cells were in contact with the line of J558 cells. The IL-10 expression ($P < 0.01$) and IL-12 ($p < 0.01$) by PCR was also observed when dendritic cells had been in contact with the antigen. The TGF- β was not observed. In the second article, in which block the TLR-4 dendritic cells IL-10 and IL-12 were assessed. It has been shown that blockade of this receptor prevents IL-10 production ($p < 0.05$) and IL-12 ($p < 0.05$). Thus, this Toll like is important for the innate response against the parasite, but it is also important for the regulatory response demonstrated the first working. In this thesis work we conclude that the soluble antigens of the parasite tachyzoites of *T. gondii* is able to stimulate pro-inflammatory and anti-inflammatory response by dendritic cells and IL-10 production is higher than that of IL-12. We conclude that the production of these cytokines is associated with a Toll like receptor 4

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Immunoregulation. Innate Immunity . Dendritic cells . Toll Like receptor 4. .

LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

APC : Célula Apresentadora de Antígeno

ISSAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood

PBMC: Células mononucleares periféricas

ESLA: antígenos excretório/secretório larval

CO₂ : Dióxido de Carbono

IFN-γ : Interferon-gama

LPS : Lipopolisacarideo

NO: Óxido Nítrico

PAMPs : Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS : Tampão de fosfato salina

TGF-β: Fator de Crescimento Transformante-beta

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-alfa

IL: Interleucina

NF-κB: Fator nuclear potencializador de células B ativadas

NK: Célula matadora natural

NO: Óxido nítrico

FOXP3+: Fator de transcrição de células T regulatória

IκBa: Fator nuclear inibidor de células B

IFN-γ: Interferon gama

CD4: Grupamento de diferenciação de linfócito T auxiliar

CD8: Grupamento de diferenciação de linfócito T citotóxico

CD25: Grupamento de diferenciação de linfócito T regulatório

PMN: Polimorfonuclear

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

MyD88: Proteína mieloide de diferenciação primária

IRAK: Proteína cinase associada ao receptor de interleucinas

TRAF6: Fator de Necrose de Tumor da proteína

TAK 1: Fator de crescimento β associado a cinase 1

IKK α , β , γ : subunidade reguladora que permite a ativação ou inibição da proteína quinase

NEMO: Modulador essencial de NF- κ B

MAPKAs: Proteínas quinases

JNK: Proteína JNK (do inglês, c-Jun N-terminal kinases)

P38: Proteína quinase ativada por mitógeno

ERK 1 / 2: Proteína quinase ativada por mitógeno

J558: Linhagem de célula que mimetizam ligação CD40-CD40L

HBSS: Hanks' balanced salt solution

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito e macrófagos

TH2: Linfócito T auxiliar do tipo 2

TH1: Linfócito T auxiliar do tipo 1

TH17: Linfócito T auxiliar do tipo 1

T reg: Linfócito regulatório

OVA: Ovalbumina

PBS: Solução fosfato tamponada bisódica

ELISA: Ensaio imunoenzimático

TLR – Receptor Toll Like

STAT6: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

Figuras da Revisão de Literatura:

Figura 1: Resposta imunológica contra *Toxoplasma gondii*22

Figuras e tabela do artigo I:

Tabela 1: Sequencia dos primes IL-10, TGF-b, IL-12p40 e GAPDH, tempo de anelamento e ciclos usados por cada prime.....34

Figura 1: Avaliação do efeito do antígeno de *T. gondii* sob a expressão de marcadores de maturação37

Figura 2: Avaliação da produção de IL-10 pelas células dendríticas39

Figura 3: Avaliação da produção de IL-12 pelas células dendríticas40

Figura 4: Relação entre a produção de IL-10 e IL-12 por células dendríticas41

Figura 5: Produção de IL-12 por células dendríticas quando foram adicionadas células da linhagem J55842

Figura 6: Avaliação da expressão de RNAm em células dendríticas por PCR real time...43

Figuras do artigo II:

Figura 1: Produção de IL-8 por células HEK-293-CD14/TLR453

Figura 2: Avaliação do efeito do antígeno de *T. gondii* sob a expressão de marcadores de maturação54

Figura 3: Avaliação da produção de IL-10 pelas células dendríticas sob o bloqueio do TLR-4.....55

Figura 4: Avaliação da produção de IL-12 pelas células dendríticas sob o bloqueio do TLR-456

Figura 5: Razão sobre a produção de IL-10 e IL-12 pelas células dendríticas sob o bloqueio de TLR-457

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Toxoplasma gondii e a sua relação com a Hipotese da Higiene	18
2.2	<i>Toxoplasma gondii</i>	21
2.3	Toxoplasmose humana.....	22
2.4	Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	23
2.5	Resposta imune à <i>Toxoplasma gondii</i> e evidências da sua capacidade imunorreguladora.....	26
2.6	Envolvimento da imunidade inata na regulação imunológica induzida pela infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	27
3	HIPOTESE E OBJETIVOS	29
3.1	Hipótese.....	29
3.2	Objetivo geral.....	29
3.1	Objetivos específicos.....	29
4	CAPITULO I: Antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> induz marcadores de maturação e fenótipo regulatório em cultura de células dendríticas humanas.....	31
4.1	Introdução	31
4.2	Materiais e Métodos	33
4.2.1	Preparação do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
4.2.2	Obtenção de monócitos do sangue periférico	33
4.2.3	Diferenciação de células dendríticas.....	33
4.2.4	Estimulação das células dendríticas com antígeno de <i>Toxoplasma gondi</i>	34
4.2.5	Avaliação de marcadores de maturação celular de células dendríticas por citometria de fluxo	34
4.2.6	Co-cultura das células dendríticas com linhagem de células J558	34
4.2.7	Dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas	34

4.2.8	Avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-12) e anti-inflamatórias por (IL-10 e TGF- β) PCR.....	34
4.3	Resultados	37
4.3.1	Efeito do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i> sobre os marcadores de ativação celular expressos pelas células dendríticas	37
4.3.2	Produção de IL-10 pelas células dendríticas induzida pelo antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	39
4.3.3	Produção de IL-12 pelas células dendríticas induzida pelo antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	40
4.3.4	Relação entre a produção de IL-10 e IL-12 pelas células dendríticas.	41
4.3.5	Produção de IL-12 pelas células dendríticas induzida pela presença de células J558	42
4.3.6	Expressão de <i>IL-10</i> , <i>IL-12p40</i> e <i>TGF-β</i> nas células dendríticas estimuladas pelo antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	43
4.4	Discussão	44
4.5	Conclusão	46
4.6	Referencias do artigo I	47
5	CAPITULO II: Receptor Toll Like 4: Implicação deste receptor na resposta imunológica contra <i>Toxoplasma gondii</i> em modelo de células dendríticas <i>in vitro</i>	48
5.1	Introdução	48
5.2	Materiais e Métodos	49
5.2.1	Avaliação do efeito do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> sobre linhagem de células HEK	49
5.2.2	Preparação do antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	49
5.2.3	Obtenção de monócitos do sangue periférico	50
5.2.4	Diferenciação de células dendríticas	50
5.2.5	Estimulação das células dendríticas com antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i> e bloqueio do receptor toll-like-4	51
5.2.6	Avaliação de marcadores de maturação celular de células dendríticas por citometria de fluxo	52
5.2.7	Avaliação de marcadores de maturação celular de células dendríticas por citometria de fluxo	52
5.2.8	Dosagem de citocinas a partir da cultura de células dendríticas	52
5.3	Resultados	53

5.3.1	Efeito do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> sobre a linhagem de células HEK	53
5.3.2	Efeito do bloqueio do TLR-4 sobre os marcadores de ativação celular expressos pelas células	54
5.3.3	Efeito do bloqueio do TLR-4 sobre os marcadores de ativação celular expressos pelas células dendríticas	55
5.3.4	Efeito do bloqueio do TLR-4 sobre a produção de IL-10	56
5.3.5	Produção de IL-12 pelas células dendríticas induzida pelo antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>	57
5.3.6	Relação entre a produção de IL-10 e IL-12 pelas células dendríticas	58
5.4	Discussão	60
5.5	Conclusão	62
5.6	Referencias do artigo II	62
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERENCIAS.....	66

1- INTRODUÇÃO GERAL

Os casos de doenças imunomediadas como a asma, doenças alérgicas e autoimunes vêm aumentando em todo o mundo, especialmente em Países considerados desenvolvidos (Bousquet et al., 2005). Muitos estudos têm tentado explicar esse aumento especialmente nesses locais onde às condições estruturais de vida são melhores. Uma das explicações mais plausíveis é que infecções, hábitos menos higiênicos e contato com os irmãos mais velhos ou através de outras exposições podem conferir proteção contra doenças imunomediadas. (Strachan, em 1989). A “Hipótese da Higiene” postulada por Strachan, em 1989, tem sustentado essa diferente distribuição de doenças alérgicas e mais recentemente também para as doenças autoimunes entre países desenvolvidos e emergentes.

Ao longo das duas últimas décadas estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar tanto epidemiologicamente e experimentalmente essa associação entre infecções e doenças imunomediadas como as alergias e doenças autoimunes (Mutius, 2007; Wagner et al 2009; Okada et al., 2010; Alcantara-Neves et al., 2012; Janse et al., 2014). Agentes infecciosos como *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris suis* e *Toxocara canis* têm mostrado, em alguns estudos, uma associação inversa com as alergias respiratórias e doenças autoimunes ou mecanismos indicativos destas como modulação de citocinas (Júnior et al., 2003; Rodrigues et al., 2008 ; Alcantara-Neves et al., 2012; Janse et al., 2014). Em áreas endêmicas para o parasito *S. mansoni*, há uma redução das internações hospitalares decorrentes de asma (Ponte et al., 2014). Em estudos transversais foi possível observar que indivíduos infectados pelos helmintos *S. mansoni* e *S. haematobium* tiveram menor frequência de teste cutâneo positivo para aeroalérgenos (van den Biggelaar et al .,2000 ; Araujo et al. 2000). A administração de ovos de *T. suis* em pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn levou a melhora dos sintomas destas patologias (Summers et al.,2005 a). Outra parasita que vem mostrando relação inversa ao desenvolvimento de doenças imunomediadas como as alergias respiratórias é *Toxoplasma gondii* (Yazdanbakhsh e Matricardi., 2004; Janse et al., 2014).

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório de baixa especificidade, pois infecta provavelmente quaisquer animais homeotérmicos (Dubey et al., 1970), invadindo vários tecidos, células nucleadas e líquidos orgânicos. A toxoplasmose é prevalente na maioria das regiões do mundo e geralmente é a infecção é assintomática, porém, manifestações clínicas mais graves podem acontecer nos indivíduos imunocomprometidos e recém-

nascidos sendo a meningoencefalite um dos principais acometimentos clínicos causados pela toxoplasmose em pacientes HIV positivos (Tenter et al. 2000; Vesco et al., 2007). Durante o período inicial da resposta contra *T. gondii* as células dendríticas são as mais importantes apresentadoras de antígeno e principal fonte de IL-12, citocina esta importante para o desenvolvimento da resposta inflamatória contra *T. gondii*. A infecção por este parasita, como em outras infecções causadas por parasito intracelulares, apresenta um mecanismo dependente de uma resposta imune celular, ocorrendo à indução de uma resposta Th1 altamente polarizada (Aliberti, 2005). A produção de IL-12, induz a diferenciação e proliferação de uma resposta baseada em células T auxiliares do tipo 1 com o IFN- γ sendo produzidos pelos linfócitos T, tanto CD4 quanto CD8, e pelas células matadoras naturais (NK). As células NK são células fundamentais para o estímulo a diferenciação das células T auxiliares principalmente através da produção de IFN- γ (Denkers e Gazzinelli, 1998).

Durante a resposta inflamatória contra o parasita *T. gondii* ocorre à produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . Estudos tem mostrado a importante participação destas citocinas no curso da infecção contra este parasita (Gazzinelli et al., 1996; Langermans et al., 2001; Aliberti, 2005; O'Garra e Vieira 2007 ; Neves, 2011; Długońska , 2014). Essa seria uma estratégia do parasita para prejudicar a ativação de macrófagos e inibir a produção de IFN- γ e assim evitar a sua eliminação pelo sistema imunológico. Estudos utilizando camundongos deficientes de IL-10 mostraram um aumento da mortalidade durante a infecção aguda pelo *T. Gondii* (O'Garra e Vieira 2007). Foi demonstrado, também, que em camundongos BALB/c deficientes de FOXP3+ e que foram infectados pelo *T. gondii* pela via oral, ocorreu um aumento da carga parasitária, uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e agravamento do quadro histopatológico (Tenorio et al., 2010; Morampudi et al., 2011). O papel da IL-10 parece ser tão importante para a modulação de doenças imunomediadas que ensaios clínicos utilizando IL-10 intravenosa em pacientes com doenças autoimunes mostraram melhora na sintomatologia destas patologias (Summers et al., 2005 a ; Summers et al., 2005 b).

Nos últimos anos tem sido dada importância à participação da resposta imune inata e seus componentes e mecanismos no desenvolvimento da resposta imunoregulatória. Dentre esses componentes, além, das citocinas os receptores da resposta inata, como os *Toll Like* receptores. Esses receptores funcionam como reconhecimento de padrão (PRR) presentes em células tais como macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são expressos por muitos agentes infecciosos, como bactérias gram-

positivas e gram-negativas, vírus DNA e RNA, protozoários e fungos. No início da resposta contra *T. gondii* dois receptores, em humanos, tem sido considerados importantes o TLR-2 e TLR-4 (Yarovinsky et al, 2005 ; Mun et al, 2003 ; Debierre-Grockiego et al., 2007). Além destes receptores os mecanismos intracelulares associados à ação destes receptores, NF-Kb e MAPKinases, estão sendo apontados como alvo da ação deste parasita com a intenção de estimular mecanismos imunoregulatórios importantes para a sobrevivência no hospedeiro (Denkes et al., 2004). De acordo com o exposto acima este trabalho de Tese apresentara o efeito do antígeno solúvel de *T. gondii* sob a resposta imune inata e seus mecanismos como os receptores Toll Like importantes para a interação de parasitos com as células dendríticas. Em especial avaliando o possível papel imunoregulatório do antígeno solúvel através desta população de células e o envolvimento da resposta inata neste processo.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOXOPLASMA GONDII E A SUA RELAÇÃO COM A HIPÓTESE DA HIGIENE

Nos últimos anos vem ocorrendo um acentuado crescimento da prevalência de asma e doenças alérgicas em vários países do mundo, assim como, uma distribuição diferenciada desta patologia nos países do globo terrestre (Aberg et al., 1995; Kamradt et al., 2005; Bousquet et al., 2005). Esta diferente distribuição passou a ser observada em alguns estudos como o ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) no qual foi encontrado que países desenvolvidos tinham mais casos de crianças com sintomas de asma e alergias respiratórias do que países em desenvolvimento (ISAAC, 1998). Existem algumas explicações para esta distribuição diferenciada, uma delas é a "Hipótese da Higiene" a qual foi proposta pela primeira vez por Strachan, em 1989, sugerindo que infecções, hábitos menos higiênicos e contato com os irmãos mais velhos ou através de outras exposições podem conferir proteção contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. Esta hipótese tem evoluído em várias formas na tentativa de explorar o papel das infecções, o significado da exposição ambiental a componentes microbianos, e o seu efeito sobre as respostas imune inata e adaptativa (Mutius, 2007). Recentemente outros pesquisadores têm tentado explicar o aumento das doenças autoimunes como Diabetes tipo I e Esclerose Múltipla em Países desenvolvidos com o postulado pela "Hipótese da Higiene" (Okada et al., 2010). Muitos estudos epidemiológicos e experimentais exploram qual seria o papel das infecções e o significado da exposição ambiental a micróbios sobre o sistema imunológico, em especial, as alergias respiratórias e têm mostrado que o contato com determinados agentes infecciosos (protozoários, vírus, bactérias e helmintos) é um ponto positivo para redução de parâmetros tais como teste cutâneo, sibilância e sorologia positiva para IgE, importantes na fisiopatologia e sintomatologia das alergias respiratórias (Alcantara-Neves et al. 2012 ; Weber et al., 2015). Parasitas como *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trichuris trichiura*, *Toxocara canis* e *Plasmodium falciparum* têm mostrado, em alguns estudos, uma associação inversa com as alergias respiratórias ou parâmetros indicativos desta como, modulação de citocinas, células inflamatórias e teste cutâneo (Araújo et al., 2000; Lell et al., 2001; Yazdanbakhsh et al., 2002; Yazdanbakhsh e Matricardi., 2004; Wagner et al 2009; Alcantara-Neves et al 2012; Janse et al., 2014).

Rodrigues et al 2008 mostraram que crianças que tinham sido infectadas com *Trichuris trichiura* durante os três primeiros anos da infância têm um risco reduzido de desenvolvimento de atopia na adolescência. A infecção humana por *Toxocara canis*

causa uma síndrome denominada larva migrans visceral e ocorre assintomaticamente em altas prevalências nas populações de baixa renda. Indivíduos infectados por este parasita demonstraram ter menos doenças alérgicas respiratórias nestas populações. Este parasita parece imunomodular doenças alérgicas respiratórias em populações de baixa renda nos países em desenvolvimento (Moreira-Silva et al., 1998; Alonso et al., 2000; Campos Júnior et al., 2003). A larva de *T. canis* pode migrar para o pulmão humano, e, como consequência direta, causar sintomatologia que se assemelha à asma crônica (Kuziemski et al., 1999). No entanto, infecção assintomática por este helminto foi encontrada associada à diminuição de reatividade cutânea a aeroalérgenos em crianças (Mendonça et al., 2012). Ponte et al 2014 mostraram que em áreas endêmicas para o parasita *S. mansoni*, há uma redução das internações hospitalares decorrentes de asma. Em estudos transversais foi possível observar que indivíduos infectados pelos helmintos *S. mansoni* e *S. haematobium* tiveram menor frequência de teste cutâneo positivo para aeroalérgenos (van den Biggelaar et al .,2000 ; Araujo et al.m 2000). Em um estudo prospectivo, foi demonstrado que a frequência de sintomas de asma, é menor em pacientes infectados por *S. mansoni* (Medeiros et al.,2003).

Estudos experimentais também têm mostrado a proteção de doenças autoimunes por alguns parasitos. Em um estudo prospectivo, na Argentina, 12 pacientes com Esclerose Múltipla, com altos níveis de eosinófilos no sangue periférico, foram acompanhados. Estes pacientes apresentavam infecções parasitárias e mostraram um menor número de exacerbações da esclerose múltipla, cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destes indivíduos mostraram aumento de IL-10 e TGF- β (Correale e Farez , 2007). Da mesma forma, a administração de ovos do parasita *Trichuris suis* , a cada 3 semanas durante 6 meses a 29 pacientes com doença de Crohn ativa, tiveram melhora nos sintomas em 21 de 29 pacientes (72%), sem efeitos adversos (Summers et al.,2005 a). Os ovos de *T. suis* também foram dados a pacientes com colite ulcerativa, com melhora significativa dos sintomas (melhoria de 43% comparado a 17% do placebo) (Summers et al.,2005 b)

Além da possível proteção frente à asma, alergias respiratórias e doenças autoimunes mostrados nos estudos citados acima, proteção esta que parece ser conferida por alguns parasitos, a literatura aponta uma relação inversa entre o parasito *Toxoplasma gondii* e doenças alérgicas respiratórias tanto a nível epidemiológico como experimental (Matricardi et al., 2000; Yazdanbakhsh e Matricardi., 2004; Wagner et al 2009; Janse et al., 2014). *Toxoplasma gondii* é um parasita de infecção orofecal e que por tanto sua

infecção esta associada, também, a maus hábitos de higiene corroborando com o postulado pela “Hipótese da Higiene” (Strachan 1989).

A principal explicação para o papel protetor das infecções estava a algum tempo sustentado no fato de que contato na infância com bactérias e vírus que estimulam desenvolvimento de resposta TH1 ajudaria no desenvolvimento negativo de doenças inflamatórias de perfil TH2, como exemplo, as alergias respiratórias (Strachan 1998). Com o desenvolvimento de novas pesquisas e questionamentos da comunidade científica o perfil de resposta inflamatória TH1, característicos de doenças autoimunes, não ajudaria no desenvolvimento negativo de doenças desta natureza o que leva a uma contradição de informações, já que estudos têm estendido à proteção de doenças infecciosas às doenças autoimunes (Wilson e Maizels, 2004; Okada, 2010; Tanasescu e Constantinescu, 2014). Para tentar explicar a chave do papel protetor dos parasitas para doenças imunomediadas, estudiosos explicam que tendo os parasitas co-evoluído com mamíferos durante milhões de anos, desenvolveram mecanismos de modular o sistema imunológico dos seus hospedeiros, estimulando a produção de citocinas regulatórias como a IL-10 (Yazdanbakhsh et al., 2002) e TGF- β (Gazzinelli et al., 1996; Gomez-Escobar et al. 1998; O’Garra e Vieira, 2007) de modo a permitir-lhes sobreviver. Sendo assim a produção destas citocinas seria a chave para explicar a redução destas doenças em pessoas expostas a parasitas especialmente na infância, período em que ocorre maturação imunológica (Brito et al., 2010).

Experimentalmente estudos têm mostrado mecanismos que explicam de que forma a presença dos parasitas podem contribuir com o postulado pela “Hipótese da Higiene” e desta forma sustentar a ideia de que os parasitas produzem mecanismos regulatórios e estes mecanismos os permitem viver dentro do hospedeiro. Dentre esses mecanismos tem sido demonstrado que diferentes subtipos de células regulatórias e supressoras podem desempenhar um papel na tolerância periférica, e sua biologia tem sido objeto de intensa investigação (Shevach, 2002). Um dos principais mecanismos relacionados a esta modulação se dá através das células T regulatórias (Treg) que suprimem respostas imunológicas especialmente através de interações célula-célula e / ou a produção de TGF- β e IL-10 (Read e Powrie 2001).

Figueiredo et al 2006 mostraram *in vitro* que células PBMC e macrófagos tratados com antígenos excretório/secretório larval (ESLA) de *T. canis* aumentou a produção de IL-10. Estudo realizado na África mostrou que células estimuladas com antígeno do ovo de espécies de *Schistosoma* produziu altos níveis de IL-10 após 72 horas em contato com antígenos deste parasito (Meurs et al., 2014).

A produção de IL-10 induzida por *Toxoplasma gondii* foi mostrada por Janoy et al 2012. Camundongos sensibilizados por ovalbumina (OVA) tiveram parâmetros inflamatórios reduzidos quando receberam o antígeno de *Toxoplasma gondii*. Este parasito e o papel deste sob o sistema imunológico serão apresentados nos tópicos posteriores

2.1 TOXOPLASMA GONDII

T. gondii foi identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte africano, popularmente chamado de *gondi* (*Ctenodactylus gundi*). Este parasito foi descoberto simultaneamente no ano de 1908 na Tunísia pelos pesquisadores Nicolle Manceaux e no Brasil por Splendore (Kim and Weiss, 2008)

Toxoplasma gondii é um protozoário da família dos coccídios, parasita intracelular obrigatório, com ciclo biológico complexo e que acomete praticamente todas as espécies animais de sangue quente (Dubey; Beattie, 1988).

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, tendo como hospedeiros definitivos representantes da família Felidae, entre eles, o gato doméstico. Os homens e, provavelmente, todos os animais homeotérmicos, são os hospedeiros intermediários (Dubey and Beattie, 1988).

A fase assexuada pode ocorrer em mamíferos e aves, nos quais os taquizoítos se multiplicam rapidamente por meio de endodiogenia ou endopoligenia. Por esses processos o parasito se reproduz internamente gerando duas ou várias células filhas, que rompem da célula mãe e se disseminam através do sangue ou linfa pelo organismo do hospedeiro, caracterizando a fase aguda da doença, quando é observada a sintomatologia. Após esse período de intensa multiplicação, o sistema imune atua sobre esse protozoário. Alguns taquizoítos sobreviventes se refugiam dentro de células, diferenciando-se em bradizoítos (ou cistozoítos). Estes se multiplicam por endodiogenia permanecendo em estado de latência dentro de cistos. Eles são localizados predominantemente no sistema nervoso central (SNC), no olho, como também em músculos esqueléticos e cardíacos, sendo encontrados com menor intensidade em órgãos viscerais como pulmões, fígado, e rins, geralmente na fase crônica da infecção (Dubey, 1994).

A fase sexuada ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae, onde após uma série de esquizogonias acontece a diferenciação de gametas, fecundação e formação de oocistos. Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos imaturos (não esporulados) que, encontrando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento,

se tornam infectantes. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Os oocistos podem permanecer infectantes por meses ou anos no ambiente, contaminando a água ou vegetais e infectando novos hospedeiros definitivos ou intermediários (Dubey, 1998).

Todos os três estágios (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos) são infectantes, tanto para os hospedeiros intermediários como para os hospedeiros definitivos, os quais podem adquirir a infecção por *T. gondii* principalmente através de uma das seguintes rotas: via horizontal, por ingestão de oocistos presentes no ambiente ou por ingestão de cistos encontrados em carne e vísceras cruas ou mal cozida ou, via vertical, por transmissão transplacentária de taquizoítos ou através da ingestão de leite materno contaminado com taquizoítos (Dubey, 1994; Dubey et al., 1998).

2.3 TOXOPLASMOSE HUMANA

Em humanos, a toxoplasmose é difundida igualmente em todas as classes sociais, afetando um terço da população mundial (Tenter et al., 2000). O parasito 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). Na America Latina cerca de 51 a 72% da população, incluindo o Brasil, são soropositivos para *T. gondii* (Pappas et al 2009; Bonfa et al., 2010). Apesar da ampla distribuição do *T. gondii*, a prevalência da toxoplasmose é bastante variada 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). Datoli et al 2011 investigaram os fatores de risco para a aquisição de *Toxoplasma gondii* pós-natal na infância. Foi realizado um inquérito sorológico para IgG anti-*T. gondii* em 1.217 crianças de 4-11 anos de idade, e foi encontrado um prevalência de 17,5% nesta faixa etária.

A toxoplasmose aguda em adultos saudáveis é normalmente assintomática em 60% dos casos (Sawadogo et al., 2005); porém, manifestações graves podem ocorrer nos recém-nascidos e/ou indivíduos imunocomprometidos, a exemplo, de indivíduos com HIV (Tenter et al., 2000). A infecção acontece principalmente pela via oral, pois esta é a via natural da infecção, através da ingestão de cistos ou/e oocistos (Aliberti ,2005). Outra via de infecção é a congênita que pode acontecer quando a mulher grávida é infectada durante a gestação ou em decorrência de uma infecção latente que é reativada (Bonfa et al., 2010).

A infecção congênita pode acontecer, e a gravidade da doença depende do período gestacional em que a infecção materna ocorre, assim como, da competência imunológica da mãe durante a parasitemia ou parasitismo, do número e da virulência dos parasitos transmitidos ao feto, podendo causar aborto, mortalidade neonatal ou anormalidades congênitas (Tenter et al., 2000). Quando infectado, o feto geralmente apresenta toxoplasmose grave quando a mãe se infecta durante a primeira metade da gestação (Dubey, 2004).

Por ser uma infecção oportunista (Cantos et al., 2000), manifestações clínicas mais graves podem acontecer nos indivíduos imunocomprometidos sendo a meningoencefalite, um dos principais acometimentos clínicos causados pela toxoplasmose em pacientes HIV positivos (Vesco et al., 2007).

2.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA *T. GONDII*

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Entretanto, a ação da vertente adaptativa do sistema imune é essencial para uma proteção completa contra infecções. As células que tem um papel central na ativação desta resposta adaptativa são as células dendríticas e as mesmas são as mais importantes apresentadoras de antígeno profissionais do sistema imunológico e este processo é essencial para iniciar a resposta imunológica adaptativa, também contra o *T. gondii* (Christopher e David, 2012).

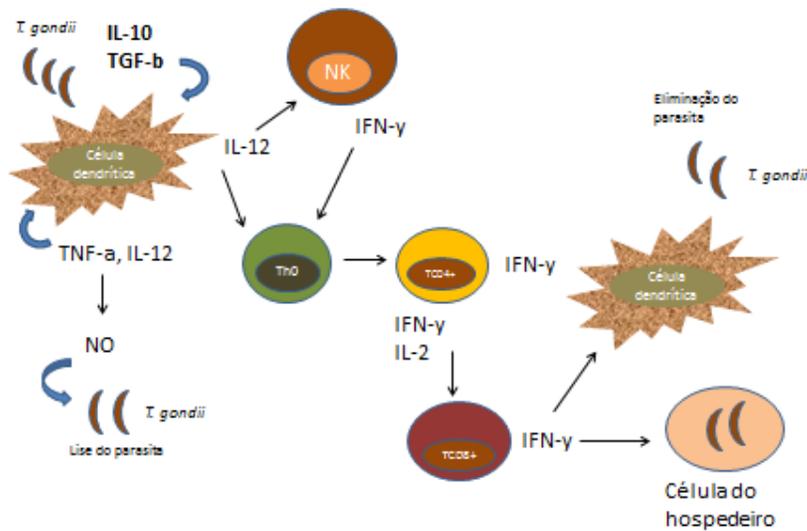
As células dendríticas são caracterizadas por fenótipo heterogêneo, consequência de ampla distribuição tecidual, diferenciação celular variada, resultado de adaptações realizadas por conta dos microambientes onde residem, e responsividade a muitos estímulos endógenos e exógenos (Gordon, 2003). São células essenciais na defesa do hospedeiro, pois são responsáveis por iniciar a resposta imune inata contra microrganismos, através do reconhecimento de produtos microbianos denominados PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) que interagem com receptores específicos para componentes bacterianos, como os "Toll Like Receptors" (TLRs) (Taylor et al., 2005).

A indução da resposta imune adaptativa induzida por células dendríticas contra diferentes classes de patógenos protozoários, vírus, bactérias e helmintos requer uma interação entre estas células da resposta imune inata e células T CD4+ as quais podem controlar diferentes tipos de infecções e assim produzir resposta não estereotipadas (Bronte e Zanovelo, 2005). Uma das respostas específicas, resultado deste contato célula dendrítica

e célula T CD4+, é a diferenciação para o tipo de resposta imune TH1. As células TH1 produzem altos níveis de IFN- γ (Denkers e Gazzinelli, 1998 ; Długońska , 2014). IFN- γ é uma citocina essencial para a resposta imunológica contra patógenos intracelulares, a exemplo dos protozoários. Outro perfil de resposta induzida pelo contato célula dendrítica e células T CD4+ é o TH2. As células que pertencem a esse perfil chamadas de células TH2 são caracterizadas em produzir IL-4, IL-5 e IL-13 e tem papel importante nas infecções causadas por patógenos multicelulares como helmintos. Mais recentemente uma terceira resposta chamada TH17 tem sido apontada como responsável pela resposta contra bactérias extracelulares e fungos (Kapsenberg ,2003 ; Kubach et al 2005- antigo impresso). Finalmente estes três subtipos de resposta são completados por uma quarta, que compõem a resposta T regulatórias cuja a função é a indução e manutenção da tolerância a antígenos próprios, mas que também matem o controle das resposta inflamatórias estimuladas por células TH1, TH2 e TH17. Sendo assim a indução de resposta regulatória pelas células dendríticas na resposta a patógenos pode ter um duplo papel desde que possa ser benéfico para o hospedeiro e também para o patógeno(Kapsenberg,2003; Colonna et al 2006).

A infecção pelo *T. gondii*, como em outras infecções causadas por parasito intracelulares, apresenta um mecanismo dependente de uma resposta imune celular, ocorrendo à indução de uma resposta TH1 altamente polarizada. A resposta contra *T. gondii* começa quando células apresentadoras de antígeno (APCs) produzem IL-12 e esta citocina induz a diferenciação e proliferação de uma resposta baseada em células T auxiliares do tipo I as quais são as importantes fontes de IFN- γ contra o parasito. Além das células T auxiliares do tipo I, os linfócitos T CD4+ quanto os T CD8+, as células matadoras naturais (NK) produzem IFN- γ no inicio da resposta (Aliberti, 2005). As células NK são células fundamentais para o estímulo e diferenciação das células T auxiliares principalmente por causa da produção de IFN- γ (Denkers e Gazzinelli,1998).

Figura 1: Ilustração da resposta imune contra o parasita *T. gondii*



Conforme exemplificado na figura 1, as citocinas IFN- γ e IL-12 se comportam como mediadoras chaves na resposta imunológica frente ao *T. gondii*. O hospedeiro desencadeia durante a fase aguda da infecção, mecanismos inatos de defesa, os quais irão influenciar o desenvolvimento dos mecanismos da resposta adaptativa. O parasita é capaz de estimular diversas células, tais como macrófagos e células dendríticas as quais secretam IL-12 e TNF- α . Os níveis de IL-12 são capazes de induzir as células NK a secretarem IFN- γ que, em sinergismo com TNF- α , potencializa a atividade microbicida das células apresentadoras de antígeno (APCs). Além disso, a ação combinada destas duas citocinas resulta numa significativa produção de óxido nítrico (NO) levando a morte do parasita. Os níveis de IL-12 produzidos desencadeiam a diferenciação de linfócitos CD4+ com perfil TH1, que produzem níveis ainda maiores de IFN- γ . Citocinas produzidas por este grupo de células, IFN- γ e IL-2, estimulam a diferenciação para outra célula TH1, a T CD8+, produzindo mais IFN- γ passo fundamental para a destruição do parasito. Estas células e as citocinas produzidas são fundamentais durante as fases aguda e crônica no controle da infecção por *T. gondii*. (Gazzinelli et al., 1996; Langermans et al., 2001; Aliberti, 2005; O'Garra e Vieira 2007 ; Neves, 2011; Długońska , 2014).

Na resposta imune contra *T. gondii* a interação sistema imune inato e sistema imune adaptativo é parecer importante que a depleção de células dendríticas suprimiu a produção de IL-12 e aumentou a susceptibilidade de ratos para infecção aguda, enquanto que a transferência destas células a partir de camundongos de tipo selvagem para camundongos deficientes destas células antes da infecção restaurou a produção de IL-12 e IFN- γ , e aumentou a resistência à infecção (Liu et al., 2006)

2.5 RESPOSTA IMUNE À *TOXOPLASMA GONDII* E EVIDÊNCIAS DA SUA CAPACIDADE IMUNORREGULADORA

Muitos estudos têm demonstrado que durante a resposta imunológica contra o *T. gondii* há produção de citocinas anti-inflamatórias a exemplo de IL-10 e Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Essa seria uma estratégia do parasita para prejudicar a ativação de macrófagos e inibir a produção de IFN- γ e IL-12 e assim evitar a sua eliminação pelo sistema imunológico. A produção de IL-10, principalmente, desempenharia um papel modulador sobre a síntese de IL-12 e IFN- γ (Figura 1) e também regula a atividade microbicida das células dendríticas, linfócitos T e células NK (Gazzinelli et al., 1996; Langermans et al., 2001; Aliberti, 2005; O'Garra e Vieira 2007 ; Neves, 2011; Długońska , 2014). Esses achados da produção de IL-10 pelo *T. gondii* corroboram com os mecanismos imunoregulatórios estimulados por parasitos que se enquadram nos postulados pela "Hipótese da Higiene", ou seja, *S. mansoni*, *T. suis* e *Toxocara canis* mostraram seu papel imunomodulador na medida em que produziram IL-10(Figueiredo et al., 2006; Correale e Farez , 2007 e Meus et al., 2014)

Alguns trabalhos experimentais, especialmente em modelos animais, têm demonstrado que a produção de IL-10 parece ser inerente à infecção pelo parasita o que pode justificar, em parte, o papel imunomodulador deste parasita. A produção de IL-10 durante a infecção estaria atrelado a um papel antagonista sobre as citocinas IL-12 e IFN- γ (Gazzinelli et al., 1996; Aliberti, 2005; Neves,2011 ; Długońska , 2014)

Estudos utilizando camundongos deficientes de IL-10 mostraram um aumento da mortalidade durante a infecção aguda pelo *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que em camundongos BALB/c infectados pelo *T. gondii* pela via oral, deficientes de FOXP3+, há um aumento da carga parasitária, uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e agravamento do quadro histopatológico (Tenorio et al., 2010; Morampudi et al., 2011).

Wagner et al 2009, mostraram o efeito imunoregulatório da infecção por *T. gondii* em modelo experimental de alergia respiratória induzida pelo antígeno Bet v 1. Na oportunidade foi possível avaliar uma redução do perfil inflamatório característico da resposta inflamatória da alergia respiratória. Este trabalho mostrou que na infecção crônica por este parasita em camundongos expostos ao Bet v 1 há uma maior produção de IL-10, TGF- β e células FOXP3+.

Experimentalmente, o efeito da infecção de *T. gondii* em modelo de asma a ovalbumina (OVA) foi avaliado por Janoy em 2000 e 2012. Foi demonstrado que este parasita possui

a capacidade de reduzir parâmetros importantes na fisiopatologia da asma e aumentar fatores imunomodulatórios a exemplo de IL-10.

Existem também evidências epidemiológicas da participação da infecção e/ou sorologia positiva de *T. gondii* na regulação de doenças imunomediadas.. Matricardi et al 2000, mostrou em um estudo de caso- controle retrospectivo que entre os indivíduos com sorologia positiva para *T. gondii* ou/e outros antígenos orofecais houve uma redução na atopia, asma alérgica (0,4%) e rinite alérgica (7%) . A associação negativa entre alergias respiratórias e parasitas de infecção orofecal como *T. gondii* foi mais uma vez mostrada a nível epidemiológico por Janse et al 2014 onde foi observada uma associação negativa entre a soropositividade para *T. gondii* e alergia respiratória em crianças. Alcantara-Neves et al 2012, mostram em um estudo realizado com 1128 crianças entre 4 e 11 anos que a sorologia negativa para *T. gondii* estava associada a altos níveis de IgE alergenoespecífico.

A associação negativa entre *T. gondii* e diabetes tipo I, foi observada por Krause et al 2009. Neste estudo indivíduos com diabetes tipo I tinham baixos títulos de anticorpos para *T. gondii*.

Diante do exposto acima a IL-10 parece ser o ponto chave dos mecanismos regulatórios induzidos por *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1996; Aliberti, 2005; Neves,2011 ; Długońska , 2014) Esta citocina parece ser tão importante na imunomodulação de doenças imunomediadas que ensaios clínicos realizados em 46 pacientes com doença de Crohn refratária ao tratamento com corticoide mostrou que a administração de IL-10 via intravenosa foi segura e clinicamente eficaz quando comparada ao placebo(Van Deventer et al., 1997). Em um estudo com 10 pacientes com psoríase, a IL-10 se mostrou segura e possivelmente eficaz no controle dos sintomas (Asadullah et al .,1999)

2.6 ENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE INATA NA REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*

Recentemente, grande importância está sendo dada à resposta imune inata, e sua interação com a resposta imunológica adquirida, na defesa contra, e na patogenia de infecções parasitárias e não parasitárias. Vários mecanismos e componentes estão associados à interação do sistema imune inato. Dentre estes estão os “Toll Like Receptors” (TLRs) os quais são receptores ancestrais que conferem especificidade ao sistema imune inato (Medzhitov E Janeway, 1997) e as moléculas co-estimulatórias as quais são essências para o desenvolvimento da resposta imune inata e mais tarde para

as respostas adaptativas. As principais moléculas envolvidas no processo de maturação e interação das células apresentadoras de antígeno (APCs) com células T, por exemplo, são CD80+, CD86+, CD83+, CD40+ e HLA-DR. As moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, expressas principalmente na superfície das células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), possuem participação fundamental na indução de resposta e manutenção de tolerância, motivo pelo qual são consideradas alvos terapêuticos promissores. Essas moléculas promovem o segundo sinal necessário à ativação e proliferação dos linfócitos T por meio da ligação ao receptor CD28 (Subauste e Wessendarp, 2000). CD40 é uma proteína co-estimulatória encontrada em células apresentadoras de antígeno e é necessária para a sua ativação. A ligação do CD40L com CD40 ativa às células apresentadoras de antígenos e induz uma variedade de efeitos através das células T (Chatzigeorgiou et al., 2009)

Os TLRs são proteínas transmembranares altamente conservadas que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos, bem como, na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pro-inflamatórias. Os receptores Toll Like funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares ou PMN), responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são expressos por muitos agentes infecciosos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus DNA e RNA, protozoários e fungos. Sendo assim, a ativação da imunidade inata a partir da associação PRR-PAMP é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (Arancibia et al., 2007; kawai e Akira 2010; Iwasaki e Medzhitov, 2010).

Existem vários mecanismos de sinalização desencadeados quando os TLRs são estimulados pelos PAMPs. Cada receptor Toll Like tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas contra micro-organismos. Quando algum PAMP é reconhecido por algum receptor Toll Like específico, com exceção do TLR3, há um estímulo da produção de citocinas inflamatórias através da proteína MyD88. Esta proteína recruta as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento β associado a cinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e por uma subunidade regulatória (NEMO/ IKK γ). Este complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- κ B), que será translocado

ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (O'Neill,2006; Arancibia et al ., 2010; Hennessy et al.,2010). Além da ativação do fator de transcrição NFkB, as MAPKs (JNK,P38 e ERK 1/2) também estimuladas por MyD88 são importantes estímulos para a expressão de fatores de transcrição(Denkens et al 2004-).

A presença de um equilíbrio entre a ativação e inativação dos receptores Toll Like, torna-se necessária para evitar uma resposta inflamatória ou imunológica excessiva, como ocorre nas doenças crônicas inflamatórias a exemplo das doenças alérgicas e autoimunes. A ativação dos receptores Toll Like pode ser regulada por varias moléculas que mantem um equilíbrio entre saúde e doença, a partir de receptores reguladores intra e extracelulares (Aranciba et al.,2007). Neste sentido, é proposto na literatura a ideia de que além de fazer parte de mecanismos inflamatórios, os receptores Toll Like possam estar também associados a mecanismos regulatórios. Alguns estudos indicam que agentes infecciosos podem promover a proteção, por exemplo, para doenças alérgicas por meio de mecanismos independentes de seus antígenos constitutivos, conduzindo à estimulação de receptores não específicos para o antígeno. Este conceito é bem ilustrado pelo exemplo de receptores Toll like (Okada et al.,2010). Babu e colaboradores (2006) relataram que, em filariose linfática, a inibição da ativação linfocitária e redução da produção de citocinas desencadeada via receptores Toll like está comprometida durante a infecção. Wong et al., 2008 mostraram que a estimulação de TLR pode prevenir o aparecimento de doenças autoimunes, tais como DM1 espontâneas em camundongos NOD, uma observação feita via TLR-2, -3, -4, -7 -9 . Neste modelo, o tratamento com agonistas de TLR antes do início da doença previne a progressão da doença.

Na resposta imune inata contra *T. gondii* a literatura cita que o TLR-2 e TLR-4 são importantes em humanos (Yarovinsky et al, 2005 ; Mun et al, 2003 ; Debierre-Grockiego et al, 2007). Estudos têm mostrado a função de TLR2 e TLR4 para respostas contra *T. gondii in vitro* e *in vivo*. TLR2 parece estar envolvido na regulação do fator de necrose tumoral para o parasita, ao passo que não está claro o envolvimento do TLR4 na regulação da produção de citocinas durante a toxoplasmose experimental (Scanga, C.A. et al. 2002; Debierre-Grockiego,. et al. 2003 and 2007).

A capacidade de moléculas de interferirem como agonistas ou antagonistas de TLRs pode ser uma estratégia para o desenvolvimento de drogas para doenças imunomediadas, como por exemplo, a imunoterapia com ligantes de TLR-9 tem sido descrita como efetiva no tratamento de desordens alérgicas em modelo animal (Horner, 2002). Além do TLR-9, a literatura diz que o TLR-2 estar também associado a mecanismos regulatórios em humanos (Bottema et al., 2010). A possibilidade de algumas moléculas

imunomodulatórias de parasitas agirem através de suas ligações a estes receptores está aberta à investigação.

3- HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1- HIPÓTESE

A resposta imunoregulatória estimulada pelo parasito *Toxoplasma gondii* depende de mecanismos e componentes da resposta imune inata

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as rotas imunológicas moduladas pelo antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* em culturas de células dendríticas humanas.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a expressão de marcadores de maturação em células dendríticas *in vitro*;

Avaliar os efeitos do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a produção de citocinas (IL-10 e IL-12) em culturas de células dendríticas maduras *in vitro*;

Avaliar os efeitos do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a produção de IL-12 em sistema de co-cultuta de células dendríticas e células J558;

Avaliar se o efeito do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a maturação de células dendríticas é mediado pelo receptor Toll-Like 4;

Avaliar os efeitos do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a produção de citocinas (IL-10) pelas células dendríticas maduras mediante o bloqueio de receptor Toll-Like 4;

Avaliar os efeitos do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* sobre a expressão de RNAm para IL-10, IL-12 e TGF- β em células dendríticas;

4- CAPITULO I

Artigo I:

Antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* induz marcadores de maturação e fenótipo regulatório em cultura de células dendríticas humanas

Ana Tereza Cerqueira Lima¹, Camila Alexandrina Viana de Figueiredo¹, Bart Everts², Ricardo Wagner de Almeida³, Milena de Medeiros Clementino Andrade¹, Neuza Maria Alcântara Neves¹ e Maria Yazdanbakhsh²

- 1- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia
- 2- Centro Médico da Universidade de Leiden, Universidade de Leiden
- 3- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

4.1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório com distribuição global o que confere ao mesmo uma característica cosmopolita (Ahmadpour et al., 2014).

Toxoplasma gondii é um protozoário que infecta a maioria dos mamíferos, incluindo os seres humanos. A infecção ocorre pela ingestão de oocistos ou cisto a partir de alimentos crus ou mal cozidos. Estima-se que 30% da população no mundo são soropositivos para *T. gondii*. Toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática, em pacientes imunocomprometidos (HIV / AIDS, câncer e doentes transplantados), que pode levar a efeitos patológicos graves (Ahmadpour et al 2014; hill et al 2005; hill and dubey 2002).

No que diz respeito à resposta imunológica contra o parasita *T. gondii* às células dendríticas são as principais células envolvidas na primeira linha de defesa contra este patógeno (Scott e Hunter, 2002). Estas células têm origem na medula óssea e atingem os tecidos periféricos através do sangue. Mediante o contato com os taquizoítos viáveis do parasito e em resposta a mediadores inflamatórios, as dendríticas sofrem um processo de maturação caracterizado por um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias. (Subauste e Wessendarp, 2000) As principais moléculas envolvidas no processo de interação entre células da imunidade inata e células da imunidade adquirida são CD80+, CD86+, CD83+, CD40+ e HLA-DR (Subauste e Wessendarp, 2000).

As células dendríticas são essenciais para a resposta imune inata contra *T. gondii*, quando interagem com os taquizoítos viáveis (Subauste e Wessendarp, 2000) e são as principais fontes de IL-12(Denkens et al.,2004). A IL-12 é produzida em resposta ao contato com estes taquizoítos e auxiliam no processo de apresentação de antígenos para

as células CD4+. As células T auxiliares (CD4+) produzem IFN- γ e esta citocina estimula a diferenciação de células CD8+ as quais são as principais fontes de IFN- γ . O IFN- γ é uma citocina chave na resolução do processo infeccioso por *T.gondii* (Denkers e Gazzinelli , 1998; Denkers et al.,2004; Aliberti, 2005; Subauste e Wessendarp, 2000). Além, de uma resposta inflamatória caracterizada por TH1 com uma forte produção de IFN- γ a literatura mostra que durante a infecção pelos taquizoítos o parasita também induz a produção de IL-10 e TGF- β ,citocinas de caráter anti-inflamatório, com o objetivo de minimizar esta forte resposta imunológica contra o próprio parasita. A produção de IL-10, induzida pelo *T. gondii*, seria também uma estratégia do parasito para a sua manutenção no hospedeiro (Gazzinelli et al., 1996; Denkers e Gazzinelli,1998; Aliberti, 2005 ; O'Garra e Vieira, 2007; Thait and Hunter, 2009;Dupont et al 2014; Długońska , 2014)

Experimentalmente Gazzinelli et al., 1996 estudou em camundongos deficientes de IL-10 que quando estes animais eram infectados por *T. gondii* apresentavam uma maior mortalidade. Estudos têm mostrado importantes aspectos que parecem estar relacionados a esta produção de IL-10 pelo *T. gondii*. Trabalhos a nível epidemiológico e experimental ,respectivamente, têm mostrado uma associação negativa com a soropositividade e infecção ao *T. gondii*, com doenças imunomediadas como alergias respiratórias e autoimunes (Matricardi et al 2000; Krause et al., 2009; Janse et al., 2014) A produção desta citocina indiretamente ajudaria na redução e/ou resolutividade de processos alérgico-respiratórios e autoimunes corroborando com o postulado pela “Hipótese da Higiene” (Strachan,1998;Okada et al., 2010). Essa hipótese sugere que infecções, contato com os irmãos, pessoas que se cresceram em Países em desenvolvimento ou por meio de outras exposições podem conferir proteção contra o desenvolvimento de doenças imunomediadas e que esta proteção estaria atrelada a mecanismos regulatórios desenvolvidos pelo próprio sistema imune do hospedeiro e estimulados pelo parasito. Neste sentido o objetivo do trabalho foi avaliar em cultura de células dendríticas humanas, de indivíduos saudáveis, o efeito do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* na expressão de marcadores de maturação celular como CD80+, CD86+, CD83+, CD40+ e HLA-DR e avaliar a capacidade de produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias neste contexto.

4.2 MATERIAS E MÉTODOS

4.2.1 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO DE *TOXOPLASMA GONDII*

O antígeno foi preparado segundo Buery et al 2014 com modificações, a partir de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos previamente infectados, realizada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. O material foi centrifugado durante 20 segundos a 800g para eliminação de células contaminantes do camundongo. O sobrenadante foi então coletado, homogeneizado e centrifugado por 10 min a 1400g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os taquizoítos foi ressuspensionado em PBS pH 7,2, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Os taquizoítos foram lavados três vezes com PBS pH 7,2, por centrifugações a 1400g por 10 min. Em seguida os parasitos foram contados em câmara hemocitométrica e a concentração destes foi acertada para 1×10^9 taquizoítos/mL. A suspensão de parasitos foi então processada por ultra-som (Ultrasonic Homogeneizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co.) em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante 1 minuto e com intervalos de 1 min entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhados em microscópio óptico. Após a sonicação o material foi centrifugado a $10000g/4^\circ C$ durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de $0,22\mu m$ e estocado a $-80^\circ C$ até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951)

4.2.2 OBTENÇÃO DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento dos monócitos foi descrito anteriormente (Van der Kleij et al., 2002). Amostras de sangue periférico de voluntários sadios foram coletadas em tubos com heparina, em volumes de 40ml. As células foram separadas por centrifugação (30 min a 400g) em gradiente de densidade com Ficoll-Histopaque (na proporção 1ml de Ficoll para 4ml de sangue). A camada de células mononucleares foi retirada, e centrifugada 3 vezes com HBSS, por 15 min a 200g. As células foram ressuspensionadas com HBSS a 1% de SFB, após a última centrifugação as células foram ressuspensionadas em tampão MACS() e então contadas. A suspensão de células foi centrifugada (10min a 300g), e incubada por 15min com um mix de tampão MACS ($85\mu l/10^7$) e MicroBeads anti-CD14($15\mu l/10^7$). Após este procedimento, as células foram lavadas, ressuspensionadas e posteriormente passadas em uma coluna acoplada a um separador magnético apropriado para o MicroBeads. As células foram novamente contadas, e foram adicionados GM-CSF (20ng/ml) e IL-4 (R&D Systems $0.86ng/ml$) e então colocadas em placas de 24 poços, $0,35 \times 10^6$ células/poço

(volume final 1 mL), e incubadas por 2 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O rendimento do isolamento de monócitos foi avaliado por citometria de fluxo usando anticorpo anti CD14-PerCP (1:25). Os monócitos foram isoladas do sangue venoso de voluntários saudáveis de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética da Leiden University Medical Center

4.2.3 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas foram obtidas a partir dos monócitos. O cultivo das células dendríticas foi descrito por Van der Kleij et al., 2002. Os monócitos foram cultivados em meio RPMI com 10% de SFB (volume final 1 mL) contendo GM-CSF (20ng/ml) e IL-4 (R&D Systems 0.86 ng/ml) por 6 dias (tempo de diferenciação), a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A cada três dias do isolamento, o meio contendo GM-CSF (40ng/ml) e IL-4 (R&D Systems 20ng/ml) foi trocado.

4.2.4 ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM ANTÍGENO DE *TOXOPLASMA GONDII*

Após 6 dias de diferenciação as células foram estimuladas com o antígeno de *Toxoplasma gondii*. O antígeno obtido a partir de taquizoítos da cepa RH (conforme descrito no item 4.2.1) foi adicionado às células dendríticas nas seguintes concentrações 20, 10, 5, 2.5 e 1.25 µg/ml. Além do antígeno, foi adicionado LPS (Ultrapure, E. coli 0111 B4 strain, Invivogen 100ng/ml) como controle positivo de expressão de marcadores de maturação. As células permaneceram em contato por 48 horas com estes diferentes estímulos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O tempo de incubação das células dendríticas com os diferentes estímulos foi descrito previamente por Everts et al., 2009.

4.2.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE MATURAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após os períodos de cultura, 6 dias para diferenciação e mais 2 para estimulação, os sobrenadantes foram retirados para posterior dosagem de citocinas conforme descrito abaixo (item 4.2.7). As células foram recolhidas em RPMI 1% SFB gelado, centrifugadas (5 min a 1500rpm), ressuspensas com RPMI 10% SFB, contadas e trazidas para a concentração 0.1x10⁶ células/ml onde posteriormente foram incubados com anticorpos que avaliassem a maturação celular. Os marcadores de maturação celular utilizados foram: anti-CD83-PE (diluição 1:175), anti-CD80-HV450 (diluição 1:1000), anti-CD86-FITC

(diluição 1:800), anti-HLADR- APC-EF780 (diluição 1:250) e anti-CD40- APC(diluição 1:50) no volume final de 30 µL, por 30 min a 4°C protegidas da luz a diluição dos anticorpos foram testadas previamente em nosso laboratório. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas com tampão de FACS, ressuspensas na mesma solução e a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os dados foram analisados no programa Flowjo v 7.6.5. Esta técnica de avaliação de marcadores de maturação foi descrita por Everts et al., 2009.

4.2.6 CO-CULTURA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM LINHAGEM DE CÉLULAS J558

As células da linhagem de linfócitos B de camundongos, J558, mimetizam a ligação CD40-CD40L com as células dendríticas (Dragicević et al., 2011). Estas células são adicionadas na cultura com as células dendríticas na concentração 400.000 células/ml. As co-culturas foram estimuladas (triplicatas) com as seguintes concentrações do antígeno de *T. gondii* 20, 10, 5, 2.5 e 1.25 µg/ml em incubadora a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após 24 horas de cultura, foi realizada a dosagem de IL-12 conforme descrito abaixo (item 4.2.7).

4.2.7 DOSAGEM DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS

Após vinte e quatro ou quarenta e oito horas de exposição ao antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Foi dosado IL-10 usando Kits da Sanquin® (Sanquin M1910) e IL-12p70 usando Kit da BD Bioscience® (BD 555065). As metodologias usadas foram às mesmas recomendadas pelos fabricantes.

4.2.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS POR PCR

As células dendríticas foram diferenciadas a partir dos monócitos como explicado no item 4.2.3. As células permaneceram em contato com o antígeno de *Toxoplasma gondii* na concentração de 20µg/ml por 16 horas um estudo piloto realizado em nosso laboratório mostrou que a expressão de muitos genes acontece neste tempo. As células foram coletadas, lavadas com PBS centrifugadas e estocadas a -80°C para posterior avaliação da expressão de IL-10, IL-12p40 e TGF-β (Ilustrado na tabela I). Como controle do ensaio e para determinação da quantificação relativa, foi utilizado um gene de referência

(GAPDH). O processo de extração de RNA foi realizado usando RNeasy® Plus Micro Handbook (QUIAGEN®) seguindo especificações do fabricante. O PCR foi feito através do método SYBR Green em um sistema de detecção ABI 7900HT(Applied Biosystems). Os ciclos e as temperaturas de anelamento utilizados para cada um dos primers estão ilustrados na tabela I. Os ciclos e as temperaturas utilizadas neste experimento foram testados em nosso laboratório.

PRIME	FORWARD	REVERSE	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	CICLOS
IL-10	ACC TgC CTA ACA TgC TTC gAg	CCA gCT gAT CCT TCA TTT gAA Ag	75°C	40
IL-12p40	CTg ggA gTA CCC TgA CAC CTg	gTg gCT gAg gTC TTg TCC gt	75°C	40
TGF-b	CCC AgC ATC TgC AAA gCT C	gTC AAT gTA CAg CTg CCg CA	75°C	40
GAPDH	gAA ggT gAA ggT Cgg AgT	AgA Tgg TgA Tgg gAT TTC	75°C	40

Tabela I: Sequencia dos primers IL-10, TGF-b, IL-12p40 e GAPDH, tempo de anelamento e ciclos usados por cada primer

4.3- RESULTADOS

4.3.1 EFEITO DO ANTIGENO DE TOXOPLASMA GONDII SOBRE OS MARCADORES DE ATIVAÇÃO CELULAR EXPRESSOS PELAS CÉLULAS DENDRÍICAS

Como pode ser visto na figura 1, todos os marcadores de maturação foram expressos de forma significativa ao estímulo gerado pelo antígeno solúvel de *T.gondii* quando comparados as células imaturas(iDC). Ocorreu estímulo por LPS, CD 40 $p<0,01$; CD80 $p<0,0001$; CD86 $p<0,0001$; CD83 $p<0,01$ e HLA-DR $p<0,05$, utilizado como controle positivo de expressão de marcadores de maturação. O mesmo resultado foi alcançado com o antígeno solúvel dos taquizoítos de *T. gondii*. Nas figuras 1 A (20 e 10 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,05$), B (20 e 10 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,05$), C (20 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,01$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,05$) e D (20 e 10 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,05$) o aumento da expressão foi observado nas concentrações de 20 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Na figura 1E foi observado nas concentrações de 20 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,05$, 10 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,001$ e 5 $\mu\text{g/ml}$ $p<0,01$. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência (MFI).

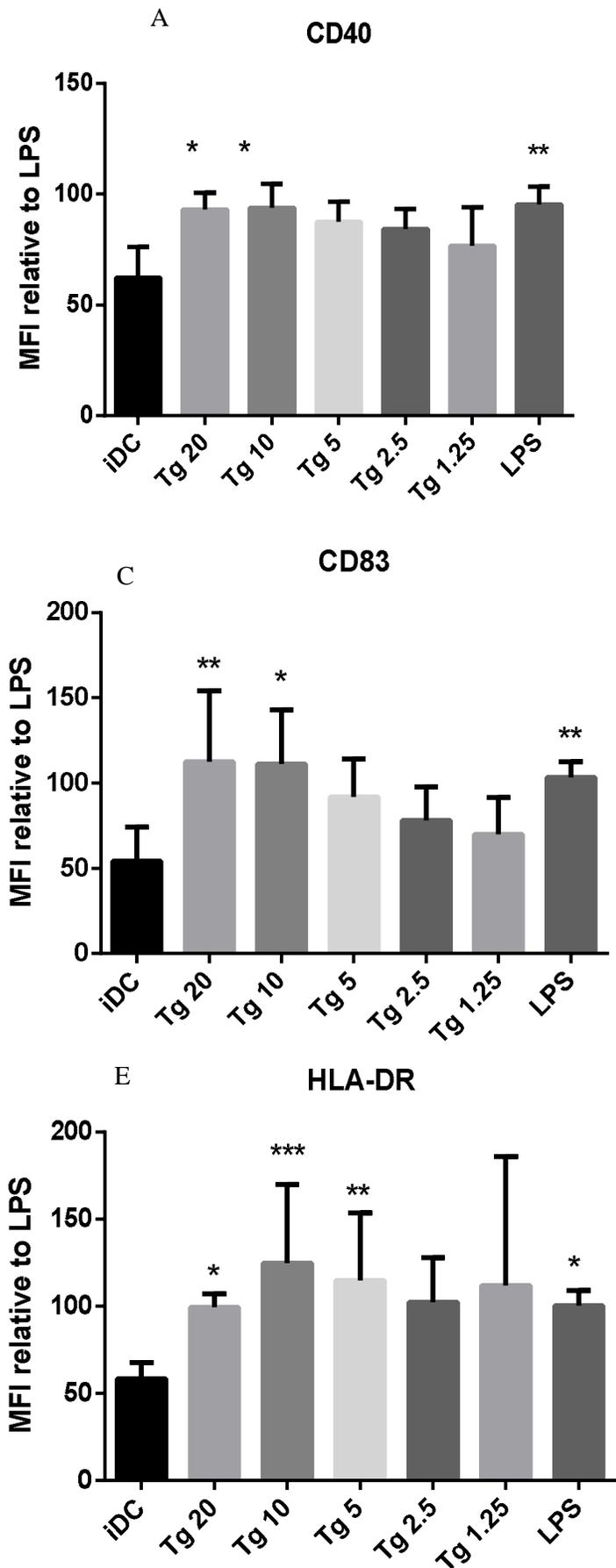


Figura 1: Avaliação do efeito do antígeno de *T. gondii* sob a expressão de marcadores de maturação. Estes resultados comparam a diferença entre a expressão de marcadores de maturação entre células dendríticas imaturas (iDCs) e as estimuladas com o antígeno de *T. gondii* ou LPS. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.32 PRODUÇÃO DE IL-10 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZIDA PELO ANTIGENO DE *TOXOPLASMA GONDII*

Na figura 2 é possível observar que houve diferença estatística ($p < 0,001$) na produção de IL-10 quando as células foram estimuladas com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20ug/ml. O efeito estimulado pelo antígeno foi comparado às células imaturas (iDCs) as quais não receberam nenhum estímulo.

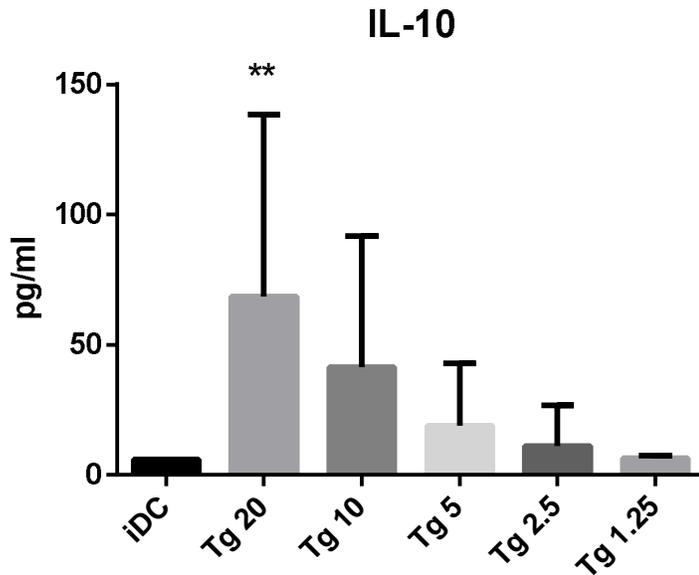


Figura 2: Avaliação da produção de IL-10 pelas células dendríticas. Este resultado compara a diferença da produção de IL-10 entre células imaturas (iDC) e células estimuladas pelo antígeno de *T. gondii*. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.3 PRODUÇÃO DE IL-12 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZIDA PELO ANTIGENO DE TOXOPLASMA GONDII

Na figura 3 é possível verificar que houve diferença estatística na produção de IL-12 quando as células foram estimuladas com o antígeno de *T. gondii* nas concentrações de 10 e 20µg/ml. Em ambas as concentrações há diferença estatística ($p < 0,05$). O efeito estimulado pelo antígeno foi comparado às células imaturas (iDCs) as quais não receberam nenhum estímulo.

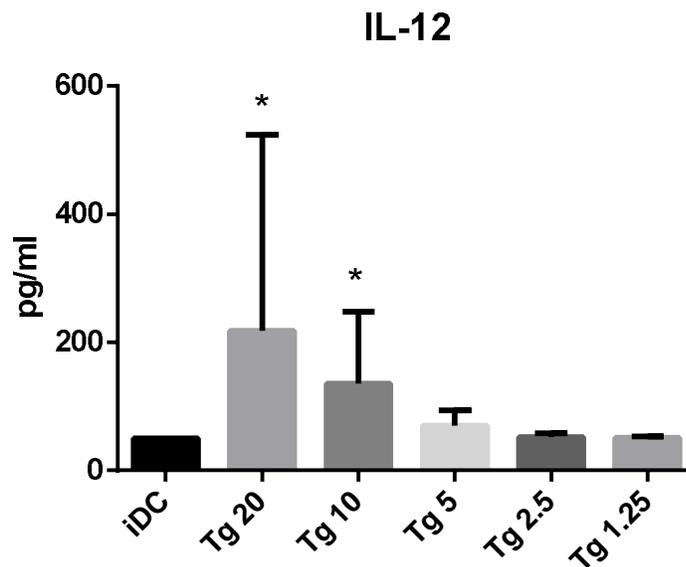


Figura 3: Avaliação da produção de IL-12 pelas células dendríticas. Este resultado compara a diferença da produção de IL-12 entre células imaturas e células estimuladas pelo antígeno de *T. gondii*. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.4 RELAÇÃO ENTRE À PRODUÇÃO DE IL-10 E IL-12 PELAS CELULAS DENDRITICAS

Na figura 4 é possível perceber que houve diferença estatística na produção de IL-10 quando comparada a produção de IL-12 pelas células dendríticas. As células estimuladas com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20ug/ml produziram muito mais IL-10 que IL-12 ($p < 0,01$).

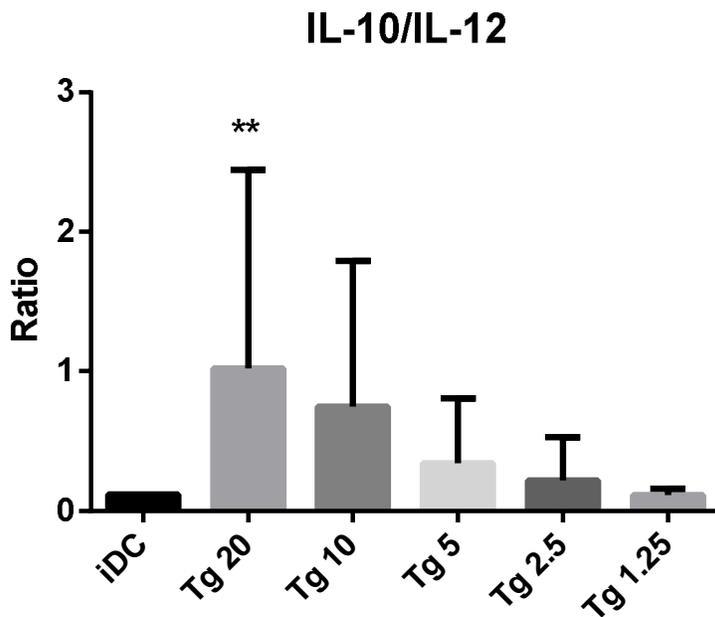


Figura 4: Relação entre a produção de IL-10 e IL-12 por células dendríticas. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.5 PRODUÇÃO DE IL-12 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZIDA PELA PRESENÇA DE CÉLULAS J558

Este resultado mostra a produção da citocina IL-12 pelas células dendríticas quando são adicionadas as mesmas, 48 horas após adição dos estímulos, células da linhagem J558. Estas células quando em contato com as células dendríticas mimetizam a ligação CD40-CD40L. Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-12 quando as células dendríticas tiveram contato com as células J558 quando comparamos a produção entre células que receberam o estímulo pelo antígeno de *T. gondii* e entre as células que receberam LPS como estímulo.

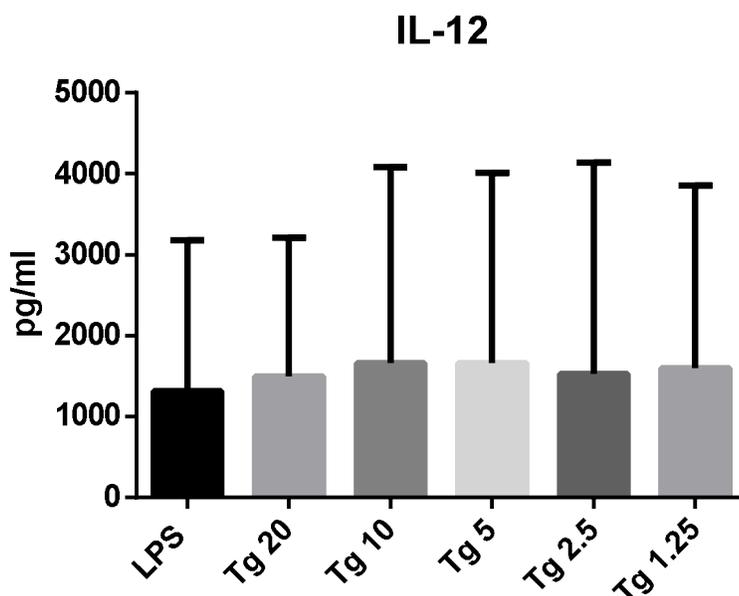


Figura 4: Produção de IL-12 por células dendríticas quando foram adicionadas células da linhagem J558. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.6 EXPRESSÃO DE *IL10*, *IL12P40* E *TGFB* NAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS PELO ANTÍGENO DE *TOXOPLASMA GONDII*

Na figura 5 é mostrado a expressão do RNAm para *IL10*, *IL12p40* e *TGFB* em células dendríticas após 16hs de contato com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20ug/ml. As células foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido à -80° C. Há uma maior expressão ($p < 0,05$) de *IL-10* quando as células foram estimuladas com o antígeno de *T. gondii*. O mesmo foi observado na expressão de *IL-12p40* ($p < 0,05$) quando as células dendríticas foram expostas ao antígeno de *T. gondii*. Na figura 5 C, pode-se verificar que não houve diferença estatística na expressão de *TGFB* quando as células foram estimuladas com antígeno de *T. gondii*, em comparação com as células não estimuladas.

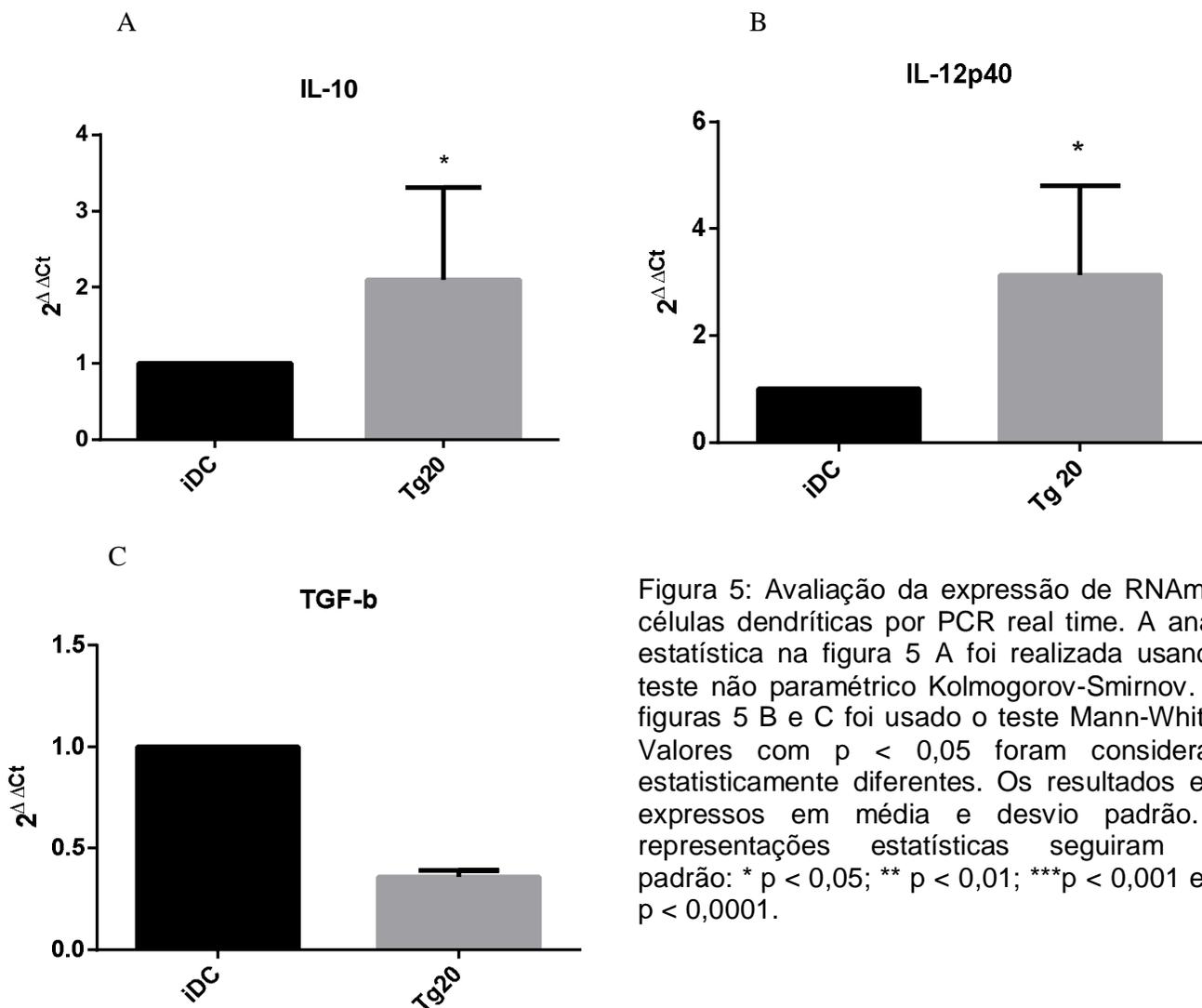


Figura 5: Avaliação da expressão de RNAm em células dendríticas por PCR real time. A análise estatística na figura 5 A foi realizada usando o teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov. Nas figuras 5 B e C foi usado o teste Mann-Whitney. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.4- DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível observar que a exposição de células dendríticas humanas ao antígeno solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* estimulou marcadores de maturação celular como CD80, CD86, CD83, CD40 e HLA-DR. Essas moléculas co-estimuladoras são expressas quando as células são ativadas e os níveis destas proteínas podem ser aumentados, ocorrendo então à maturação celular das mesmas com aquisição da capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T. As células estimuladas com o antígeno de *Toxoplasma gondii* especialmente na maior concentração (20ug/ml) elevou a expressão das moléculas co-estimulatórias. Nossos resultados corroboram os achados de Wessendarp e Subauste (2000) que mostraram que as células dendríticas expressão marcadores de maturação como as moléculas co-estimulatórias, CD40, CD80, CD86, e HLA-DR, mas não de CD83, quando estas células são infectadas com taquizoítos viáveis do *T. gondii*, no entanto, a expressão destes marcadores não acontece quando as células tem contato com antígeno de taquizoítos previamente mortos. Aqui neste trabalho mostramos que há expressão de todas as moléculas co-estimulatórias (CD40, CD83, CD80, CD86, e HLA-DR) quando as células dendríticas são estimuladas pelo antígeno solúvel dos taquizoítos viáveis.

As relações entre as células dendríticas e os linfócitos através das moléculas co-estimulatórias e das citocinas, são de extrema importância para a produção de uma resposta imune eficiente (Abbas; Lichtman, 2005; Souza et al., 2007). As moléculas de superfície como a HLA-DR são antígenos glicoprotéicos MHC classe II, constitutivas das APCs como as células dendríticas. Essas moléculas estimulam as respostas imunes adaptativas através da apresentação de peptídeos a linfócitos TCD4+ (Abbas; Lichtman, 2005). Já as moléculas co-estimulatórias (CD80+, CD86+) são importantes para promover a ativação e a diferenciação dos linfócitos T (Abbas; Lichtman, 2005). Essas moléculas co-estimulatórias, também conhecidas como B7-1 e B7-2, CD80+ e CD86+, respectivamente, são reconhecidas por um receptor chamado de CD28+, que é expresso em praticamente todas as células T (Abbas; Lichtman, 2005). Os sinais resultantes da ligação do CD28+ presente na superfície dos linfócitos T com as co-estimuladoras localizadas na superfície das APCs atuam em conjunto com os sinais gerados pela ligação do TCR (receptor de células T) e do co-receptor aos complexos peptídeo-MHC encontrados na superfície das APCs. A sinalização mediada pelo CD28 é essencial sendo uma das mais importantes formas de co-estimulação (Wang; Cheng, 2004). Esta interação é essencial para o desenvolvimento das respostas adaptativas.

Além da provável otimização da maquinaria celular para apresentação antigênica, a indução de IL-10 é apontada como sendo uma importante ferramenta de regulação imunológica (Brito et al., 2010;Bozic et al.,2015). A IL-10 é sem dúvida a citocina anti-inflamatória mais potente. Esta citocina é produzida por quase todas as células do sistema imune inato e adaptativo (Saxena et al .,2014). Experimentos utilizando antígeno solúvel de *T. gondii* em uma linhagem de células HEK 293 mostrou que as mesmas foram incapazes de produzirem IL-10 quando na presença do antígeno (Lee et al .,2008). Em nossos experimentos quando as células dendríticas foram estimuladas por este antígeno à produção de IL-10 foi significativamente aumentada (Figura 2).

A indução de IL-10 por imunofármacos vem sendo apontada em vários estudos. Como exemplo um estudo clínico realizado com 46 pacientes com doença de Crohn refratária ao tratamento com corticoide mostrou que a administração de IL-10 via intravenosa foi segura e clinicamente eficaz quando comparada ao placebo (Van Deventer et al., 1997). Em um estudo com 10 pacientes com psoríase, a IL-10 se mostrou segura e possivelmente eficaz no controle dos sintomas (Asadullah et al .,1999). Mais recentemente a produção de alguns medicamentos tem objetivado solucionar doenças de caráter inflamatório estimulando a produção de IL-10(Bozic et al.,2015). No que diz respeito aos aspectos imunoregulatórios esses achados corroboram com o que a literatura tem mostrado a respeito da capacidade imunoregulatória deste parasita (Janse, 2014). Dessa forma, podemos hipotetizar uma possível aplicação clínica de antígenos como este o de *T. gondii* através das células dendríticas.

Adicionalmente, a produção de interleucina-12 (IL-12) é essencial para a resposta das células dendríticas na resposta imune inata. Esta citocina faz parte da resposta inflamatória contra o parasita *T. gondii* e, por tanto, é essencial para uma resposta imune eficaz e também para o desenvolvimento da resposta adaptativa (Gazzinelli et al 1998; Denkers et al.,2004). Em nosso trabalho mostramos que quando as células dendríticas foram tratadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* ,na concentração de 20µg/ml, ocorreu produção significativa da produção desta citocina. A relação feita entre a produção de IL-10 e IL-12 neste trabalho mostrou que a produção de IL-10 pelas células dendríticas é consideravelmente maior que a produção de IL-12. Esta maior produção de IL-10 sob IL-12 sugere que quando as células dendríticas tem contato com o antígeno solúvel dos taquizoítos do *Toxoplasma gondii* há uma maior probabilidade de estímulo a mecanismos regulatórios adaptativos. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que a exposição de

células dendríticas a IL-10 estimula produção de células T regulatórias e também de células T anérgicas (Wakkach et al.,2003; Sato et al .,2003).

Entretanto não podemos observar esta produção de IL-12 em sistema de co-cultura de células dendríticas e J558 em comparação com células estimuladas com LPS apenas. A ligação das células dendríticas com as J558 mimetiza a ligação que as células dendríticas faz com as células T naive, ligação CD40-CD40L (Dragicević et al ., 2011). Esta ligação entre a proteína CD40 e seu ligante desencadeia respostas específicas e que são importantes para o estímulo pró-inflamatório a exemplo do fator de transcrição NF κ B o qual é importante para a produção de células inflamatórias (Van Koten e Banchereu, 2000). Entretanto, a interação CD40-CD40L não é a única envolvida na secreção de citocinas pelas células apresentadoras de antígeno (Shu et al., 1995; Kennedy et al., 1996 ; Cella et al., 1996). Experiências realizadas em camundongos indicaram que a produção *in vitro* de IL-12 p40 por células do baço pode ocorrer na ausência de células T, e que a administração de antígeno de *T. gondii* em camundongos resulta em produção desta citocina independente da interação CD40-CD40L(Reis e Sousa et al., 1997).

A expressão de RNA mensageiro de IL-10, IL-12 e TGF- β foi também avaliada neste trabalho. Corroborando com os achados da produção de IL-10 e IL-12 pelas células dendríticas por ELISA, a expressão de RNAm para estas citocinas foi também aumentada quando as células foram tratadas com o antígeno de *T. gondii*. No entanto, não foi observada o aumento da expressão de TGF- β quando as células receberam o tratamento pelo *T. gondii* a nossa hipótese é que o antígeno solúvel de *T. gondii* não é capaz de estimular mecanismos associados a produção desta citocina pelas células dendríticas

4.5 – CONCLUSÃO

O tratamento de células dendríticas com antígeno solúvel de *T. gondii* é capaz de estimular a expressão de moléculas co-estimulatórias importantes para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa através das células T. Além disso, os resultados mostrados neste trabalho corroboram com o postulado por estudos epidemiológicos e experimentais que mostram a capacidade do parasita *T. gondii* na modulação do sistema imunológico. As células dendríticas são capazes, de acordo com o mostrado neste trabalho, em estimular mecanismos de imunorregulação através da produção de IL-10, quando estas células são tratadas com o antígeno solúvel dos taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, pois a produção de IL-10 é superior a de IL-12, citocina pró-inflamatória. Desta forma podemos demonstrar aqui que o antígeno solúvel dos

taquizoítos do *Toxoplasma gondii* é capaz de estimular mais mecanismo regulatório sendo este representado através da produção de IL-10. Sugerimos aqui, baseando-nos em nossos achados que o antígeno solúvel poderia ser usado para avaliar o efeito do mesmo em modelos experimentais de mais doenças imumomediadas.

REFERENCIAS

ABBAS, A. K. E A. H. LICHTMAN. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 576 p.

ASADULLAH K, DOCKE WD, EBELING M, FRIEDRICH M, BELBE G, AUDRING H, et al. Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. Arch Dermatol. v135 (2) p187-92. 1999

ALIBERTI J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. Nature Reviews immunology v 5: 162-170.2005

BOZIC I, SAVIC D, LAKETA D, BJELOBABA I, MILENKOVIC I, PEKOVIC S, NEDELJKOVIC N, LAVRNJA I. Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. PLoS One. 2015

DRAGICEVIĆ A, DZOPALIĆ T, VASILJIĆ S, VUCEVIĆ D, BOZIĆ B, MAJSTOROVIĆ I, BALINT B, COLIĆ M. The influence of CD40 ligation and interferon-gamma on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. Vojnosanit Pregl. v68(4):301-8.2011

DENKERS E.I., BUTCHER B.A, DEL RIO L., BENNOUNA S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. International Journal for Parasitology). 2004

DENKERS EY, BUTCHER BA, DEL RIO L, KIM L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. Immunol Rev. v201 p191-205.2004

GAZZINELLI, R.T., AMICHAY, D., SHARTON-KERSTEN, T., GRUNWALD, E., FARBER, J.M., AND SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol v 219, 127-139.1996

GAZZINELLI, R.T., AND DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat Rev Immunol v 6 p 895-906.2006

HERRICK CA, BOTTOMLY K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. Nat Rev Immunol. v 3 p 405-412. 2003

HILL, D., AND DUBEY, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. v 8, 634-640.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*. v. 6, p. 41-61, 2005.

JANSE JJ , WONG GW , POTTS J , OGORODOVA LM , FEDOROVA OS , MAHESH, PA , SAKELLARIOU A , PAPADOPOULOS NG , KNULST AC , VERSTEEG SA , KROES AC , VOSSSEN AC , CAMPOS PONCE M , KUMMELING I , P BURNEY , VAN REE R , YAZDANBAKHS M. A associação entre os patógenos de origem alimentar e orofecal e sensibilização alérgica - estudo EuroPrevall. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014.

LEE E-J, HEO Y-M, CHOI J-H, SONG H-O, RYU J-S, AHN M-H. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean J Parasitol*. V 46. P 145- 51.2008

MATRICARDI PM, ROSMINI F, RIONDINO S, FORTINI M, FERRIGNO L, RAPICETTA M, BONINI S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ*. 320(7232):412-7. 2000

KRAUSE I, ANAYA JM, FRASER A, BARZILAI O, RAM M, ABAD V, ARANGO A, GARCÍA J, SHOENFELD Y. *Ann N Y* . Anti-infectious antibodies and autoimmune-associated autoantibodies in patients with type I diabetes mellitus and their close family members. *Acad Sci* 2009

OKADA .H, C. KUHN, H. FEILLET AND J.-F. BACH. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*. v 160 p 1–9. 2010

REIS E SOUSA C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. V 16(1):27-34, 2004

SAXENA A, KHOSRAVIANI S, NOEL S, MOHAN D, DONNER T, HAMAD AR. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy *Cytokine*.v 14 p 1043-4666. 2014

SCOTT P, HUNTER CA. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol*. v14(4). p 466-70. 2002

SUBAUSTE CS, WESSENDARP M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN-gamma. *J Immunol*. v . 1498-505.2000

VAN DER KLEIJ D, LATZ E, BROUWERS JF, KRUIZE YC, SCHMITZ M, KURT-JONES EA, ESPEVIK T, DE JONG EC, KAPSENBERG ML, GOLENBOCK DT, TIELENS AG, YAZDANBAKHS M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*. v 13.122-9. 2002

WAKKACH A, FOURNIER N, BRUN V, BREITTMAYER JP, COTTREZ F, GROUX H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. v18(5) p 605-17.2003

5- CAPITULO II

Artigo 2

Receptor Toll Like 4: Implicação deste receptor na resposta imunológica contra *Toxoplasma gondii* em modelo de células dendríticas *in vitro*

Ana Tereza Cerqueira Lima¹, Camila Alexandrina Viana de Figueiredo¹, Bart Everts², Ricardo Wagner de Almeida³, Milena de Medeiros Clementino Andrade¹, Neuza Maria Alcântara Neves¹ e Maria Yazdanbakhsh²

- 1- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia
- 2- Centro Médico da Universidade de Leiden, Universidade de Leiden
- 3- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

5.1- INTRODUÇÃO

Na tentativa de alcançar um sucesso na interação entre o parasita e o hospedeiro durante a infecção é necessário que tenha uma relação mais próxima entre estes dois organismos. Falha neste processo de interação, tem consequências negativas para ambos. Uma balanceada interação entre o parasita e o hospedeiro pode resultar em vida longa para o parasita e benefícios para o hospedeiro. A comunicação molecular entre a resposta imune inata do hospedeiro contra parasita o *Toxoplasma gondii* tem sido emergente (Denkers et al., 2004). *Toxoplasma gondii* é um I parasito intracelular obrigatório e pertence ao filo Apicomplexa. Possui distribuição mundial diferente de alguns parasitas deste filo como os do gênero *Plasmodium spp.* A presença deste parasito no organismo humano é geralmente assintomática, principalmente em indivíduos imunocompetentes. Por outro lado indivíduos que apresentam determinadas patologias como câncer e HIV podem manifestar os sintomas da infecção causada por este parasita (Ahmadpour et al., 2014).

A resposta inata é comum a este e vários outros parasitas intracelulares esta resposta é caracterizada pela presença de células apresentadoras de antígeno e produção de citocinas pró-inflamatórias. *Toxoplasma gondii* é capaz de estimular diversas células, tais como macrófagos e células dendríticas as quais secretam IL-12 e TNF- α . Os níveis de IL-12 são capazes de induzir as células NK a secretarem IFN- γ que, em sinergismo com TNF- α , potencializa a atividade microbicida das células apresentadoras de antígeno (APCs). Além disso, a ação combinada destas duas citocinas resulta numa significativa produção de óxido nítrico (NO) levando a morte do parasita. Os níveis de IL-12 produzidos são importantes para a resposta adaptativa, pois desencadeiam a

diferenciação de linfócitos TCD4+ e estes produzem IFN- γ o qual estimula células TCD8+ levando a um microambiente favorável ao desenvolvimento de uma resposta Th1, resposta importante para a eliminação de parasitas intracelulares como o *Toxoplasma gondii* (Denkers et al., 2004; Aliberti, 2005; O'Garra and Vieira, 2007).

Para o início da resposta imunológica contra o parasito *T. gondii*, ou seja, resposta inata, são desenvolvidos mecanismos moleculares a exemplo de fatores de transcrição como NF- κ B, MAPKinasas (Denkers et al., 2004) e participação de receptores da imunidade inata como os Toll-Like 2 e 4, especialmente em humanos (Yarovinsky et al, 2005 ; Mun et al, 2003 ; Debierre-Grockiego et al, 2007). Zare-Bidaki et al., 2014 mostraram que o Toll like 4 tem um importante papel na patogênese da toxoplasmose. Por outro lado estudo realizado por Lengs e Denkes, 2009 sugeriu que o TLR-4 tem um papel importante na produção de IL-10 através de macrófagos quando estas células são infectadas por taquizoítos de *T. gondii*. Enquanto Leng e Denkers, 2009 mostram que a produção de IL-10 em macrófagos de camundongos C57BL/6 parece ser independente do componente TLR-4.

Estudos realizados por nosso grupo mostrou que o antígeno solúvel de *T. gondii* estimula a produção de IL-10 e também marcadores de maturação celular (Cerqueira-Lima et al., 2015- manuscrito I desta Tese). No presente trabalho tivemos a oportunidade de mostrar quais componentes da resposta imune inata estão associadas à produção de IL-10 e das moléculas co-estimulatórias na resposta de células dendríticas frente ao antígeno solúvel de *T. gondii*.

5.2- MATERIAIS E METODOS

5.2.1 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO DE *TOXOPLASMA GONDII*

O antígeno foi preparado a partir de taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos previamente infectados, realizada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. O material foi centrifugado durante 20 segundos a 800g para eliminação de células contaminantes do camundongo. O sobrenadante foi então coletado, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os taquizoítos foram ressuspenso em PBS pH 7,2, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Os taquizoítos foram lavados três vezes com PBS pH 7,2, por centrifugações a 1400g por 10 minutos. Em seguida os parasitos foram contados em câmara hemocitométrica e a concentração destes foi acertada para 1×10^9 taquizoítos/ml. A suspensão de parasitos foi

então processada por ultra-som (Ultrasonic Homogeneizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co.) em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhados em microscópio óptico. Após a sonicação o material foi centrifugado a 10000g/4°C durante 30 minutos. O sobrenadante filtrado em filtro de 0,22µm e estocado a –80°C até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os monócitos foram isoladas do sangue venoso de voluntários saudáveis de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética da Leiden University Medical Center

5.2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTIGENO SOLÚVEL DE *T. GONDII* SOBRE LINHAGEM DE CELULAS HEK

Para este experimento utilizamos Células HEK-293 as quais são uma específica linhagem de células derivadas de embriões humanos (abortados). São facilmente cultivadas e possuem alta capacidade de expressão genética (Lee et al.,2008). Estas células foram doadas pelo Dr. Latz da Universidade de Massachusetts, EUA. As células utilizadas nesses experimentos expressão o TLR-4 e são por tanto chamadas de HEK-293-CD14/TLR4. Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10%, 1µg/ml de ciprofloxacina e 5 µg/ml de piromicina. Para o procedimento experimental as células foram colocadas em placa de 96 poços a 3.5x 10⁴ células/ml 24h antes da adição dos estímulos. Para estimulação destas células, previamente, foi adicionado MD-2 a 12,5%, molécula importante para os estímulos intracelulares via TLR-4. Os estímulos utilizados foram LPS nas seguintes concentrações 100, 10 e 1 ng/mL. O antígeno solúvel de *T. gondii* foi adicionado nas seguintes concentrações 20, 10 e 5 µg/mL. As células permaneceram em contato com os estímulos por 22h e após este tempo o sobrenadante foi coletado. A produção de IL-8 foi dosada utilizando um kit comercial (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) seguindo as recomendações do fabricante.

5.2.3 OBTENÇÃO DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento dos monócitos foi descrito anteriormente (Van der Kleij et al., 2002). Amostras de sangue periférico de voluntários sadios foram coletadas em tubos com heparina, em volumes de 40ml. As células foram separadas por centrifugação (30 min a 400g) em gradiente de densidade com Ficoll-Histopaque (na proporção 1mL de Ficoll para 4mL de sangue). A camada de células mononucleares foi retirada, e centrifugada 3 vezes

com HBSS, por 15 min a 200g. As células foram ressuspensas com HBSS a 1% de SFB, após a última centrifugação as células foram ressuspensas em tampão MACS() e então contadas. A suspensão de células foi centrifugada (10min a 300g), e incubada por 15min com um mix de tampão MACS (85ul/10⁷) e MicroBeads anti-CD14(15ul/10⁷). Após este procedimento, as células foram lavadas, ressuspensas e posteriormente passadas em uma coluna acoplada a um separador magnético apropriado para o MicroBeads. As células foram novamente contadas, e foram adicionados rGM-CSF (20ng/ml) e IL-4 (R&D Systems 0.86ng/ml) e então colocadas em placas de 24 poços, 0,35x10⁶ células/poço (volume final 1 ml), e incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O rendimento do isolamento de monócitos foi avaliado por citometria de fluxo usando anticorpo anti CD14-PerCP (1:25). Os monócitos foram isoladas do sangue venoso de voluntários saudáveis de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética da Leiden University Medical Center (número do protocolo:XXX).

5.2.4 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas foram obtidas a partir dos monócitos. O cultivo das células dendríticas foi descrito por Van der Kleij et al., 2002.Os monócitos foram cultivados em meio RPMI com 10% de SFB (volume final 1 ml) contendo GM-CSF (20ng/ml) e IL-4 (R&D Systems 0.86 ng/ml) por 6 dias (tempo de diferenciação), a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. A cada três dias do isolamento, o meio contendo GM-CSF (40ng/ml) e IL-4 (R&D Systems 20ng/ml) foi trocado.

5.2.5 ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM ANTÍGENO DE *TOXOPLASMA GONDII* E BLOQUEIO DO RECEPTOR TOLL LIKE-4

Após os períodos de cultura, 6 dias para diferenciação e mais 2 para estimulação, os sobrenadantes foram retirados para posterior dosagem de citocinas conforme descrito abaixo (item 4.2.7). As células foram recolhidas em RPMI 1% SFB gelado, centrifugadas (5 min a 1500rpm), ressuspensas com RPMI 10% SFB, contadas e trazidas para a concentração 0.1x10⁶ células/ml onde posteriormente foram incubados com anticorpos que avaliassem a maturação celular. Os marcadores de maturação celular utilizados foram: anti-CD83-PE (diluição 1:175), anti-CD80-HV450 (diluição 1:1000), anti-CD86-FITC (diluição 1:800), anti-HLADR- APC-EF780 (diluição 1:250) e anti-CD40- APC(diluição 1:50) no volume final de 30 µL, por 30 min a 4°C protegidas da luz a diluição dos anticorpos foram testadas previamente em nosso laboratório. Após o período de

incubação, as células foram centrifugadas com tampão de FACS, ressuspensas na mesma solução e a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os dados foram analisados no programa Flowjo v 7.6.5. Esta técnica de avaliação de marcadores de maturação foi descrita por Everts et al., 2009.

5.2.6 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE MATURAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após os períodos de cultura, 6 dias para diferenciação e mais 2 para estimulação, os sobrenadantes foram retirados para posterior dosagem de citocinas. As células foram recolhidas em RPMI 1% SFB gelado, centrifugadas (5 min a 1500rpm), ressuspensas com RPMI 10% SFB, contadas e trazidas para a concentração 0.1×10^6 células/ml onde posteriormente foram incubados com anticorpos que avaliassem a maturação celular. Os marcadores de maturação celular foram utilizados nas seguintes diluições: anti-CD83-PE (diluição 1:175), anti-CD80-HV450 (diluição 1:1000), anti-CD86-FITC (diluição 1:800), anti-HLADR- APC-EF780 (diluição 1:250) e anti-CD40- APC(diluição 1:50) no volume final de 30 μ L, por 30 min a 4°C protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas com tampão de FACS, ressuspensas na mesma solução e a fluorescência celular foi medida por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os dados foram analisados no programa Flowjo v 7.6.5

5.2.7 DOSAGEM DE CITOCINAS A PARTIR DA CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Após vinte e duas ou quarenta e oito horas de exposição ao antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Foi dosado IL-10 usando Kits da Sanquin® (Sanquin M1910) , IL-12p70 usando Kit da BD Bioscience® (BD 555065) e IL-8 usando o Kit da Sanquin® (Sanquin M1819) . As metodologias usadas foram às mesmas recomendadas pelos fabricantes.

5.3- RESULTADOS

EFEITO DO ANTIGENO SOLUVEL DE *T. GONDII* SOBRE A LINHAGEM DE CELULAS HEK

Como visto na figura 1, o antígeno solúvel de *T. gondii* estimulou a produção de IL-8 via TLR-4. O estímulo induzido por *T. gondii* corrobora com o estímulo induzido por LPS, controle positivo para a estimulação de TLR-4. Este experimento foi repetido duas vezes e tiveram a mesma reprodutibilidade. Cada condição teve apenas um poço.

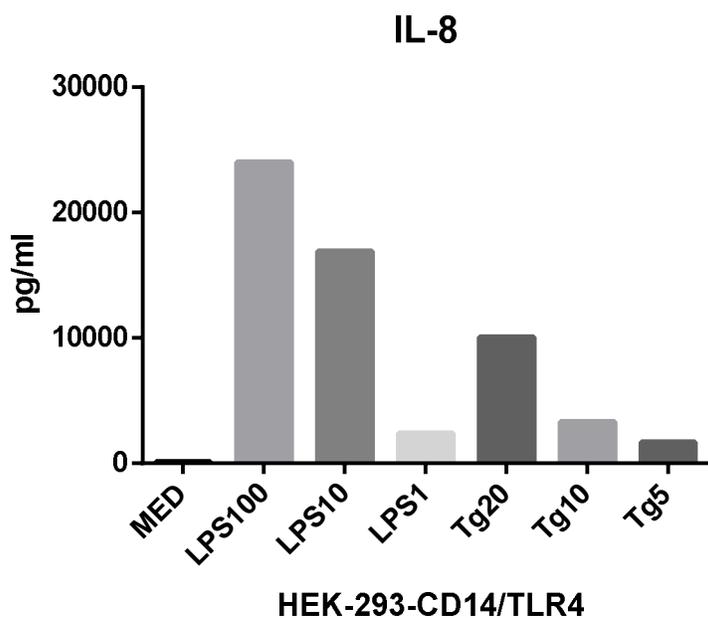


Figura 1: Produção de IL-8 por células HEK-293-CD14/TLR4. Os diferentes antígenos foram adicionados as células e 22 horas depois o sobrenadante foi coletado

5.3.1 EFEITO DO BLOQUEIO DO TLR-4 SOBRE OS MARCADORES DE ATIVAÇÃO CELULAR EXPRESSOS PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Na figura 2, é possível observar que os marcadores de maturação foram expressos de forma significativa quando as células dendríticas foram estimuladas com o anticorpo anti IgG1 e o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20µg/ml (CD40 $p < 0,01$ CD80 $p < 0,01$; CD83 $p < 0,01$; CD86 $p < 0,05$ e HLA-DR $p < 0,05$) quando comparadas as não estimuladas.

Quando foi adicionado o bloqueador de TLR-4 e o antígeno de *T. gondii* ocorreu uma tendência à redução na expressão das moléculas co-estimulatórias. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência (MFI) e os dados são expressos relativos aos resultados a partir de IgG1/*T. gondii*

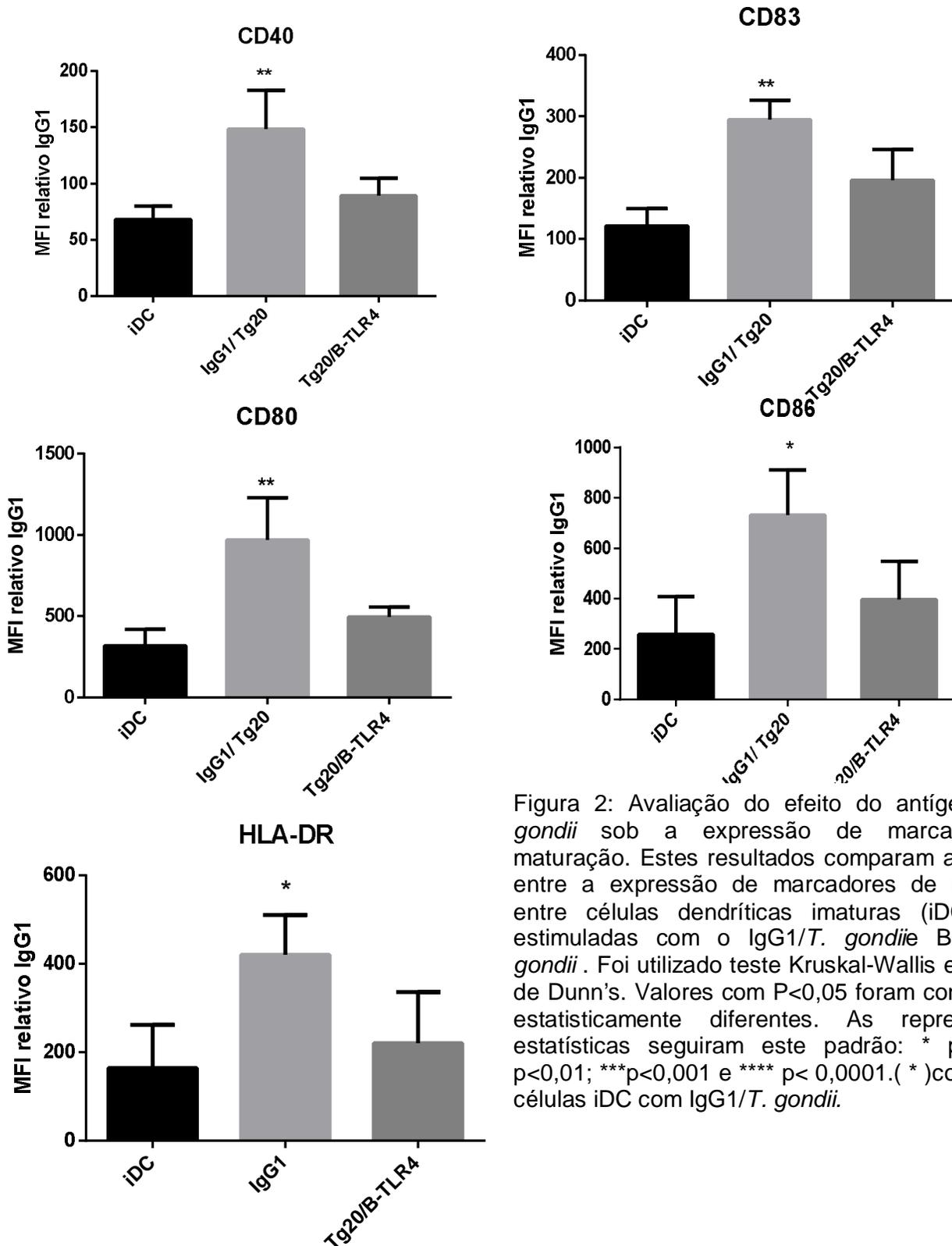


Figura 2: Avaliação do efeito do antígeno de *T. gondii* sob a expressão de marcadores de maturação. Estes resultados comparam a diferença entre a expressão de marcadores de maturação entre células dendríticas imaturas (iDCs) e as estimuladas com o IgG1/*T. gondii* B-TLR4/ *T. gondii*. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (*)comparando células iDC com IgG1/*T. gondii*.

5.3.2 EFEITO DO BLOQUEIO DO TLR-4 SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-10

Na figura 3, é possível verificar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de IL-10 quando as células foram estimuladas com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20 μ g/ml. O resultado sugere que a produção de IL-10 pelas células dendríticas quando as mesmas são estimuladas pelo *T. gondii* depende do receptor Toll Like 4. As células que receberam o anti iGg1/*T. gondii* tiveram aumento significativo na produção de IL-10 quando comparados as células dendríticas imaturas (iDC). Quando as células foram tratadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* e expostas ao bloqueador de TLR4, houve uma queda na produção de IL-10 com níveis equivalentes às células dendríticas imaturas.

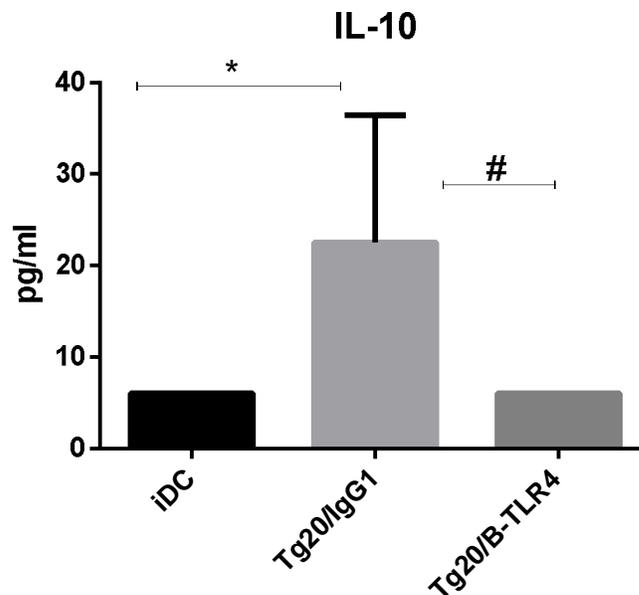


Figura 3: Avaliação da produção de IL-10 pelas células dendríticas sob o bloqueio do TLR-4. Este resultado compara a diferença da produção de IL-10 entre células imaturas, anti iGg1/*T. gondii* e *T. gondii*/B-TLR4. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$. (*) comparando células iDC com IgG1/*T. gondii*. (#) comparando IgG1/*T. gondii* com *T. gondii*/ B-TLR4

4.3.3 PRODUÇÃO DE IL-12 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZIDA PELO ANTIGENO DE TOXOPLASMA GONDII

Na figura 4, nota-se que houve aumento da produção de IL-12 quando as células foram estimuladas com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20µg/ml. Da mesma forma como a produção de IL-10, os níveis de IL-12 foram afetados com o bloqueio de TLR4.

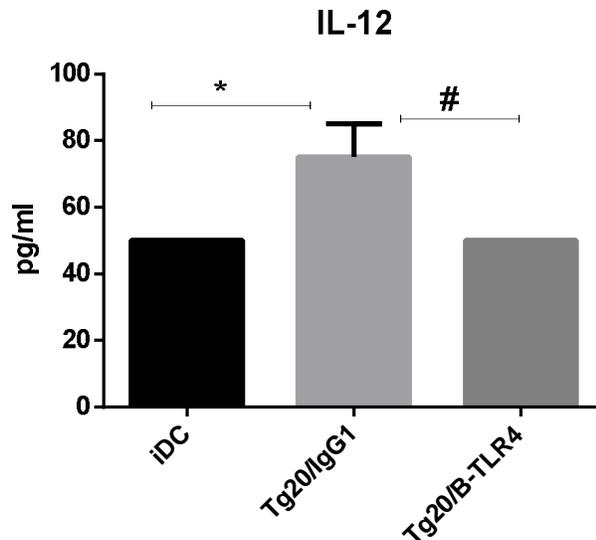


Figura 4: Avaliação da produção de IL-12 pelas células dendríticas sob o bloqueio do TLR-4. Este resultado compara a diferença da produção de IL-12 entre células imaturas, anti iGg1/*T. gondii* e *T. gondii*/B-TLR4. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$. (*) comparando células iDC com IgG1/*T. gondii*. (#) comparando IgG1/*T. gondii* com *T. gondii*/ B-TLR4

4.3.4 RELAÇÃO ENTRE À PRODUÇÃO DE IL-10 E IL-12 PELAS CELULAS DENDRITICAS

A relação entre a produção de IL-10 e IL-12 em culturas tratadas com o antígenos solúvel de *T. gondii* na presença ou ausência do bloqueio da via do TLR4 pode ser visualizada na figura 5. Como pode-se notar, houve uma diferença estatística na produção de IL-10 quando comparada a produção de IL-12 pelas células dendríticas. As células estimuladas com o antígeno de *T. gondii* na concentração de 20ug/ml produziram mais IL-10 que IL-12 ($p < 0,01$). O bloqueio de TLR4 inibiu a produção de ambas citocinas.

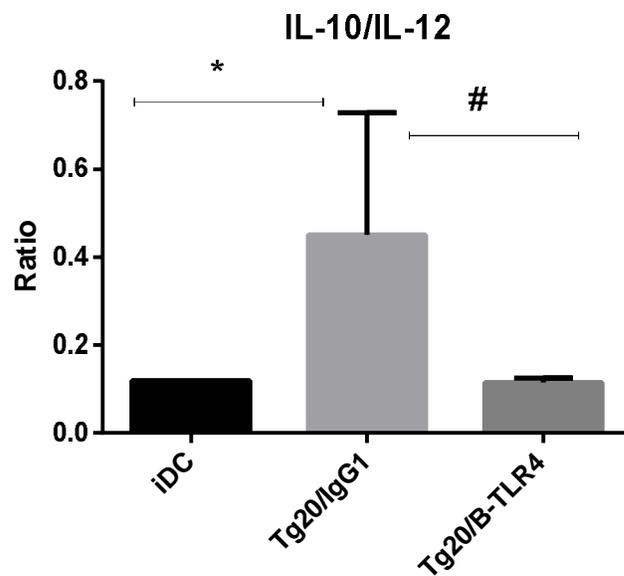


Figura 5: Razão sobre a produção de IL-10 e IL-12 pelas células dendríticas sob o bloqueio de TLR-4. Este resultado compara a diferença da produção de IL-10 entre células imaturas, anti iGg1/*T. gondii* e *T. gondii*/B-TLR4. Foi utilizado teste Kruskal-Wallis e Pós teste de Dunn's. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. As representações estatísticas seguiram este padrão: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$. (*) comparando células iDC com IgG1/*T. gondii*. (#) comparando IgG1/*T. gondii* com *T. gondii*/ B-TLR4

5.4- DISCUSSÃO

A resposta imunológica contra o parasita *T. gondii* é caracterizado por uma forte resposta do tipo Th1, tanto as células CD4 + quanto a CD8 + produzem IFN- γ , citocina inflamatória chave que proporciona proteção contra o parasita. Além desta importante resposta adaptativa (Th1), a resposta inata é fundamental para a eliminação do parasita. A resposta inata caracterizada pela produção de IL-12 é mecanisticamente associada a receptores celulares como o Toll-like e fatores transcricionais como NF- κ B e MAPKinases (Leroux et al., 2015) é fundamental para a eliminação do patógeno. Por outro lado, estudos tem mostrado que durante esta resposta inflamatória contra *T. gondii* é também produzida uma resposta regulatória na tentativa de reduzir os danos causados pela potente resposta inflamatória, mas também parece ser uma estratégia do parasita em reduzir a resposta imunológica contra o mesmo e assim permanecer vivo no organismo (Długońska , 2014). Dentre esses mecanismos regulatórios a literatura cita a participação da IL-10. Muitos pesquisadores tem provado que esta citocina parece ser inerente à resposta imunológica contra *T. gondii*, principalmente durante a resposta inata (Gazzinelli et al., 1996; Aliberti, 2005; Neves,2011 ; Długońska , 2014)

Em um estudo realizado por nosso grupo foi mostrado que o antígeno solúvel de *T. gondii* é capaz de estimular a produção de IL-10 através das células dendríticas (Cerqueira-Lima et al ., 2015 manuscrito I desta Tese) e por tanto o nosso objetivo neste trabalho foi saber se o bloqueio de TLR-4 inibi os efeitos observados previamente. Os receptores Toll Like são uma importante família de proteínas transmembranares capazes de reconhecerem microorganismos. Os TLRs consistem numa família de 13 membros em humanos e cada um com sinalização celular própria (Urematsu e Akira, 2006). A participação dos receptores Toll-Like, em humanos, na resposta contra *T. gondii* não esta completamente definida. Estudos têm mostrado que em camundongos a resposta imune inata é mediada por TLRs 2, 4, 9, 11 (principalmente) e o Toll Like 12 (Yarovinsky et al.,2005; Wagner et al.,2009). Nos seres humanos não existe expressão de 11 e 12 (Mun et al, 2003 ; Yarovinsky et al, 2005 ; Debierre-Grockiego et al, 2007). Em nosso primeiro resultado (figura1) a estimulação das HEK-293-CD14/TLR4 pelo antígeno solúvel de *T. gondii* estimulou a produção de IL-8 corroborando com o resultado demonstrado quando as células receberam estímulo por LPS, controle positivo de estímulo via TLR-4. O TLR4 o se liga ao LPS e CD14 é importante para envio de sinais intracelulares desenvolvidos por este Toll Like como interações de diferenciação a translocação de NF- κ B e a indução de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, pouco se sabe sobre como os TLRs medeiam a imunidade inata contra protozoários.

Em nosso segundo resultado tivemos a oportunidade de mostrar que quando o receptor TLR-4 é bloqueado o antígeno de *T. gondii* (*T. gondii*/ *B-TLR4*) não consegue estimular moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD83, CD40 e HLA-DR (Figura 2) quando comparados com as células tratadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* e IgG1a(IgG1/*T. gondii*). Os níveis de expressão destas moléculas ficaram semelhantes aos níveis das células que não receberam nenhum estímulo (iDC). As moléculas co-estimulatórias são essenciais para o desenvolvimento da resposta imune inata e mais tardiamente para as respostas adaptativas. Estas moléculas estão envolvidas no processo de maturação e interação das células apresentadoras (APCs) de antígeno com as células T.

Como mencionado anteriormente a IL-12 é uma citocina chave para a resposta contra o parasita *T.gondii*. Esta citocina é importante para o estímulo da produção de células Natural Killer e CD4+ (Denkers et al., 2004; Aliberti, 2005; O'Garra and Vieira, 2007). Em nosso estudo o bloqueio de TLR-4 reduziu a produção de IL-12 pelas células dendríticas. Este resultado nos mostra que o estímulo via TLR-4, nas células dendríticas, é importante para a produção de IL-12 via células dendríticas humanas quando as mesmas têm contato com o antígeno solúvel de *T. gondii*. Furuta et al 2006 Demonstraram que o TLR4 é importante para a indução da resposta imune inata contra a infecção por *T. gondii* no intestino delgado. Outros estudos mostram que componentes como glicosilfosfatidilinosídeos, presentes no *T. gondii*, estimulam a produção de MyD88 importante fator para a produção de IL-12 em células dendríticas e que estes componentes interagem com o TLR-4 (Scanga et al., 2002; Debierre-Grockiego et al 2007; Debierre-Grockiego et al., 2010). Em outra mão, Butcher e colaboradores 2011 revelaram que a proteína quinase Rhopty (ROP16) do *T. gondii* suprime a síntese de citocinas em macrófagos via de sinalização por TLR-4. Resultados similares em macrófagos foi demonstrado por Leng e Denkers, 2009 quando macrófagos foram infectados por *T. gondii*. De acordo com aqueles, Lee et al 2008 relataram também que o lisado de *T. gondii* suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias através de TLR-4.

O efeito sob a produção de IL-10 por *T. gondii*, citada em vários trabalhos, foi também mostrada aqui quando o bloqueamos o TLR-4. O bloqueio de TLR-4 reduziu a produção de IL-10. A IL-10 é uma citocina produzida durante a resposta inata contra *T. gondii*, porém, o objetivo desta citocina está associado a mecanismos regulatórios e não a função deletéria para o patógeno como a IL-12. Lengs et al 2009 sugeriu que o TLR-4 tem um papel importante na produção de IL-10 através de macrófagos quando estas células foram infectadas por taquizoítos de *T. gondii*. E que moléculas como HSP70 (Proteína de

choque 70) presentes em *T. gondii*, citada na literatura como importante molécula imunomoduladora em outros parasitos, (Cass et al., 2007) são responsáveis por estimular estes mecanismos em macrófagos. Aqui nós tivemos a oportunidade de mostrar que isto acontece, também, quando o antígeno solúvel de *T.gondii* é adicionado às células dendríticas e esta produção depende da interação do antígeno com o TLR-4.

Quando a quantidade da produção de IL-10 foi comparada a de IL-12, duas citocinas com propósitos diferenciados na resposta contra *T. gondii*, a produção de IL-10 foi significativamente maior quando o Toll Like 4 não foi bloqueado. Este resultado nos permite pensar que quando o antígeno de *T. gondii* é adicionado às células dendríticas humanas e nestas ocorre o bloqueio de TLR-4 a produção de citocinas pró-inflamatória como a IL-12 e anti-inflamatória como a IL-10 são prejudicadas.

Neste mesmo trabalho tentamos avaliar o efeito do antígeno solúvel de *T. gondii* sobre fatores transcricionais pró-inflamatórios e anti-inflamatórios pelas células dendríticas. O antígeno de *T. gondii* foi adicionado as estas células e 15, 30 e 60 minutos depois estas células foram coletadas e a expressão de NF-Kb, ERK 1 e 2, P38 e STAT3 foram avaliados por citometria de fluxo (resultados não mostrados). Devido a razões técnicas não pudemos mostrar estes dados aqui, mas existem evidências na literatura que afirmam que o parasita *T. gondii* é capaz de reduzir fatores transcricionais pró-inflamatórios (NF-Kb, ERK 1 e 2 e P38) (Denkers et al., 2003; Denkers et al., 2004) ao passo que estimula fatores anti-inflamatórios (tais como, STAT3) (Butcher et al., 2005; Lee et al 2006; Zimmermann et al., 2006). O STAT-3 está relacionado com a produção de IL-10 que está ligada a capacidade do parasita de interferir na cascata de sinalização células como uma estratégia para evitar sua eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro (Denkers et al., 2003; Denkers et al., 2004)

5.5- CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível mostrar que o receptor Toll Like 4 é fundamental para a resposta imunológica pelo parasita *T. gondii* através de células dendríticas humanas.

A expressão de marcadores de maturação foi reduzida quando esse receptor foi bloqueado e mesmo aconteceu com a produção de IL-12 e IL10. Baseado nestes achados e aliados a outros estudos realizados e que ainda poderão ser realizados, incluindo componentes já citados na literatura, a manipulação deste receptor por produtos do parasito *T. gondii* pode ser uma estratégia para futuramente tratar doenças imunomediadas.

REFERENCIAS

ALIBERTI J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews immunology* v 5: 162-170.2005

BUERY JC, FUX B, VITOR RWA, SARTORI F, CERRUTI C . Analysis of seroconversion rate and factors associated with toxoplasmosis in a rural area of an extra-amazonian region in Brazil.. *The Open Tropical Medicine Journal*. v 7 p 1-10.2014

BUTCHER BA, FOX BA, ROMMEREIM LM, KIM SG, MAURER KJ, YAROVINSKY F, et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog* v 7. 22 36. 2011

DEBIERRE-GROCKIEGO F, CAMPOS MA, AZZOUZ N, SCHMIDT J, BIEKER U, RESENDE MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. v179.1129 -37. 2007

DEBIERRE-GROCKIEGO F, NIEHUS S, CODDEVILLE B, ELASS E, POIRIER F, WEINGART R, et al. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. *J Biol Chem* v 285: 44e50. 2010

DENKERS EY, BUTCHER BA, DEL RIO L, KIM L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev*. v201 p191-205.2004

DŁUGOŃSKA H *Toxoplasma gondii* and mast cells.. *Ann Parasitol*. V 60(4) p 235-8.2014

EUN-JUNG LEE, YOO-MI HEO, JONG-HAK CHOI, HYUN-OUK SONG, JAE-SOOK RYU, MYOUNG-HEE AHN .Suppressed Production of Pro-inflammatory Cytokines by LPS-Activated Macrophages after Treatment with *Toxoplasma gondii* Lysate. *The Korean Journal of Parasitology*. 46(3): 145-151. 2008

FURUTA T, KIKUCHI T, AKIRA S, WATANABE N, YOSHIKAWA Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. *Int Immunol* v18:1655e622006.

JIN LENG, ERIC Y. DENKERS. *Toxoplasma gondii* Inhibits Covalent Modification of Histone H3 at the IL-10 Promoter in Infected Macrophages. *PLoS ONE* v 4(10).2009

LENG J, BUTCHER BA, EGAN CE, ABI ABDALLAH DS, DENKERS EY. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. *J Immunol*. v 1;182(1) p 489-97.2009

LEE E-J, HEO Y-M, CHOI J-H, SONG H-O, RYU J-S, AHN M-H. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean J Parasitol*. V 46. P 145- 51.2008

LEROUX LP, DASANAYAKE D, ROMMEREIM LM, FOX BA, BZIK DJ, JARDIM A, DZIERZINSKI FS. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *Int J Parasitol.*v45(5) p 319-32. 2015

O'GARRA A, VIEIRA P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* v 7(6) p 425-8. 2007

ROMMEREIM M., BARBARA A. FOX, DAVID J. BZIK, ARMANDO JARDIM A,B, FLORENCE S. DZIERZINSKI . Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages Louis-Philippe Leroux Dayal Dasanayake a,b, Leah. *International Journal for Parasitology*

SCANGA CA, ALIBERTI J, JANKOVIC D, TILLOY F, BENNOUNA S, DENKERS EY, et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol.* v 168 p59 972002

UREMATSU S, AKIRA S. Toll-like receptor and innate immunity. *J Mol Med* 2006

WAGNER A, FÖRSTER-WALDL E, GARNER-SPITZER E, SCHABUSSOVA I, KUNDI M, POLLAK A, SCHEINER O, JOACHIM A, WIEDERMANN U. Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *International Journal for Parasitology.* v 39:465-72. 2009

YAROVINSKY F, ZHANG D, ANSERSEN JF, BANNENBERG GL, SERHAN CN, HAYDEN MS, HIEHY S, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA, GHOSH S, SHER A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho de Tese tivemos a oportunidade de mostrar o efeito do antígeno solúvel de *T. gondii* sob células dendríticas. No primeiro artigo as células dendríticas quando tratadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* produziram marcadores de maturação importantes para o desenvolvimento da resposta imunológica. Estas células quando tratadas por este antígeno produziram citocinas pró-inflamatória como a IL-12 e anti-inflamatória como a IL-10. Apesar da produção de citocina pró-inflamatória o antígeno solúvel dos taquizoítos de *T. gondii* estimulou estatisticamente mais a produção de IL-10, ou seja, a produção de IL-10 foi superior a de IL-12. Esse achado nos faz pensar que possam existir componentes do *T. gondii* que estimulem mais IL-10.

No segundo artigo demonstramos, principalmente, que a produção de IL-10 pelas células dendríticas, sob estímulo do antígeno solúvel de *T. gondii*, depende do TLR-4.

Os achados desenvolvidos nesta Tese nos dão a oportunidade de continuarmos investigando mecanismos que estejam atrelados a produção de IL-10 por células

dendríticas na presença do antígeno solúvel de *T. gondii* e quais componentes deste antígeno são importantes neste processo. Além disso, estes trabalhos nos ajudam a concluir que a produção da citocina IL-10 induzida pelo antígeno solúvel de *T. gondii* inicia a partir de componentes da imunidade inata como células dendríticas e é essencial a participação do receptor Toll-Like 4. Essas informações podem nortear, futuramente, estudos que visem usar componentes do antígeno solúvel de *T. gondii* para o tratamento de doenças imunomediadas como alergias respiratórias e autoimunes.

7- REFERÊNCIAS

ABERG, N., HESSELMAR, B., ABERG, B. AND ERIKSSON, B. . Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. Clin Exp Allergy, 25, 815-819. 1995

ALCANTARA-NEVES, N. M., VEIGA, R. V., DATTOLI, V. C., FIACCONE, R. L., ESQUIVEL, R., CRUZ, A. A., COOPER, P. J., RODRIGUES, L. C. AND BARRETO, M. L. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. J Allergy Clin Immunol, 129, 359-367. 2011

ALIBERTI J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. Nature Reviews immunology v 5: 162-170.2005

ALONSO JM, BOJANICH MV, CHAMORRO M, GORODNER JO. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 42: 235-237, 2000.

ARANCIBIA SA, BELTRAN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. Biol Res. v40(2) p 97-112. 2007

ARAUJO MI, LOPES AA, MEDEIROS M, CRUZ AA, SOUSA-ATTA L, SOLÉ D, CARVALHO EM. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. Int Arch Allergy Immunol. v 123 (2):145-8.

ASADULLAH K, DOCKE WD, EBELING M, FRIEDRICH M, BELBE G, AUDRING H, et al. Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. Arch Dermatol. v135 (2) p187-92. 1999

BABU, S.; BLAUVELT, C.P.; KUMARASWAMI, V. *et al.* Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. J Immunol. 176: 3885-9, 2006.

BIGGELAAR VAN DEN AH, VAN REE R, RODRIGUES LC, LELL B, DEELDER AM, KREMSNER P. Decreased Atopy in Children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite induced interleukin 10. Lancet. v356(9243) p 1723-7.2000

BOZIC I, SAVIC D, LAKETA D, BJELOBABA I, MILENKOVIC I, PEKOVIC S, NEDELJKOVIC N, LAVRNJA I. Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. PLoS One. 2015

BOUSQUET, J et al . Allergic rhinitis and its impact on asthma. Journal of allergy and clinical immunology. v 108. 147-334. 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde 2010.

BUERY JC, FUX B, VITOR RWA, SARTORI F, CERRUTI C . Analysis of seroconversion rate and factors associated with toxoplasmosis in a rural area of an extra-amazonian region in Brazil.. The Open Tropical Medicine Journal. v 7 p 1-10.2014

CAMPOS-JR, D.; ELEFANT, G.R.; DE MELO E SILVA, E.O. *et al.* Frequency of seropositivity to *T. canis* in children of different socioeconomic strata. Rev Soc Bras Med Trop. 36: 509-13, 2003

CHATZIGEORGIU A, LYBERI M, CHATZILYMPERIS G, NEZOS A, KAMPER E . "CD40 CD40L sinalização e suas implicações na saúde e na doença" *Biofactors (Oxford, Inglaterra)* v.35 (6) p 474-83. 2009

CHRISTOPHER A. HUNTER¹ AND L. DAVID. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence Effectors. Nat Rev Microbiol. 2012

CORREALE J, FAREZ M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. Ann Neurol. v 61 p 97– 08.2007

DARYANI A, HOSSEINI AZ, DALIMI A..Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. Vet Parasitol. V 113(2):123-34. 2003

DATTOLI VC, VEIGA RV, CUNHA SS, PONTES-DE-CARVALHO L, BARRETO ML, ALCÂNTARA-NEVES NM . Oocyst ingestion as an important transmission route of *Toxoplasma gondii* in Brazilian urban children. The Journal of Parasitology 97:1080-1084. 2011

DEBIERRE-GROCKIEGO F, CAMPOS MA, AZZOUZ N, SCHMIDT J, BIEKER U, RESENDE MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. J Immunol. v179.1129 -37. 2007

DEBIERRE-GROCKIEGO F, NIEHUS S, CODDEVILLE B, ELASS E, POIRIER F, WEINGART R, et al. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. J Biol Chem v 285: 44e50. 2010

DEVENTER, VAN SJ, ELSON CO, FEDORAK RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. Gastroenterology. v113(2)p 383-9. 1997

DENKERS E.I., BUTCHER B.A, DEL RIO L., BENNOUNA S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. International Journal for Parasitology). 2004

DENKERS EY, BUTCHER BA, DEL RIO L, KIM L. Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. Immunol Rev. v201 p191-205.2004

DRAGICEVIĆ A, DZOPALIĆ T, VASILJIĆ S, VUCEVIĆ D, BOZIĆ B, MAJSTOROVIĆ I, BALINT B, COLIĆ M. The influence of CD40 ligation and interferon-gamma on functional properties of human monocyte-derived dendritic cells activated with polyinosinic-polycytidylic acid. Vojnosanit Pregl. v68(4):301-8.2011

DŁUGOŃSKA H *Toxoplasma gondii* and mast cells.. Ann Parasitol. V 60(4) p 235-8.2014

DUBEY, J.P . History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol v.39, 877-882.2009

FIGUEIRÊDO, C.A.V.; SANTOS, A.B.; RÉGIS, S.C.S. *et al.* Efeito do antígeno secretório e excretório de larvas de *T. canis* e do antígeno somático de vermes adultos sobre cultura de PBMC e sangue total humano. Anais da FESB, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.

FISCHER S, AGMON-LEVIN N, SHAPIRA Y, PORAT KATZ BS, GRAELL E, CERVERA R, STOJANOVICH L, GÓMEZ PUERTA JA, SANMARTÍ R, SHOENFELD Y. *Toxoplasma gondii*: bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. Immunol Res. 2013

GAZZINELLI, R.T., AMICHAY, D., SHARTON-KERSTEN, T., GRUNWALD, E., FARBER, J.M., AND SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol v 219, 127-139.1996

GAZZINELLI, R.T., AND DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat Rev Immunol v 6 p 895-906.2006

GOMES-ESCOBAR,N; LEWIS,E., E MAIZELS, R.M., A novel member of the transformig growth fator-beta (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B pahangi*. Exp. Parasitol. v 88. p 200-209. 1998

HENNESSY EJ, PARKER AE, O'NEILL LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? Nature Rev Drug Discov. v9 p 293-307.2010

HERRICK CA, BOTTOMLY K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. Nat Rev Immunol. v 3 p 405-412. 2003

HILL, D., AND DUBEY, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. v 8 p. 634-640.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Animal Health Research Reviews. v. 6, p. 41-61, 2005.

ISAAC Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet. v 351 p 1225-32.1998

JANSE JJ , WONG GW , POTTS J , OGORODOVA LM , FEDOROVA OS , MAHESH, PA , SAKELLARIOU A , PAPADOPOULOS NG , KNULST AC , VERSTEEG SA , KROES AC , VOSSSEN AC , CAMPOS PONCE M , KUMMELING I , P BURNEY , VAN REE R , YAZDANBAKHSH M. A associação entre os patógenos de origem alimentar e orofecal e sensibilização alérgica - estudo EuroPrevall. Pediatr Allergy Immunol. 2014.

HOFFMANN; MARTINA L., JORGENS, ÉLBIO N. Toxoplasmose: Revisão De Literatura. 2012

JANSE JJ , WONG GW , POTTS J , OGORODOVA LM , FEDOROVA OS , MAHESH, PA , SAKELLARIOU A , PAPADOPOULOS NG , KNULST AC , VERSTEEG SA , KROES AC VOSSSEN AC , CAMPOS PONCE M , KUMMELING I , P BURNEY , VAN REE R , YAZDANBAKHSH M. A associação entre os patógenos de origem alimentar e orofecal e sensibilização alérgica - estudo EuroPrevall. Pediatr Allergy Immunol. 2014.

JOSÉ GERALDO SOARES MAIA; LUIZ FRANCISCO MARCOPITO; ADRIANO NEVES AMARAL; BRENO DE FREITAS TAVARES; FABIANA AUGUSTA NOGUEIRA LIMA E SANTOS · Prevalence of asthma and asthma symptoms among 13 and 14-year-old schoolchildren, Brazil Rev. Saúde Pública v 38. 2004

KAMRADT T, GÖGCEL R, ERB KJ. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. Trends Immunol. v5 .260-7.2005

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat immunol. v11(5) p 373-84.2010

KIM, K., AND WEISS, L.M. Toxoplasma: the next 100 years. Microbes Infect. v 10. p 978-984.2008

KRAUSE I, ANAYA JM, FRASER A, BARZILAI O, RAM M, ABAD V, ARANGO A, GARCÍA J, SHOENFELD Y. Ann N Y . Anti-infectious antibodies and autoimmune-associated autoantibodies in patients with type I diabetes mellitus and their close family members. Acad Sci 2009

KUZIEMSKI, K., JASSEM, E. AND MIERZEWSKA, E.. Lung manifestation of visceral larva migration syndrome due to *Toxocara canis*. Pneumology Alergology Pol. 67: 554-557, 1999.

IWASAKI A, MEDZHITOV R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. v327(5963) p 291-5.2010

LANGERMANS JA, NIBBERING PH, VAN VUREN-VAN DER HULST ME, VAN FURTH R Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasmatatic activity in murine macrophages by inhibition of tumor necrosis factor-alpha production. Parasite Immunology. v 23: 169–175.2001

LEBECH, M., LARSEN, S.O., AND PETERSEN, E. Prevalence, incidence and geographical distribution of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women in Denmark. Scand J Infect Dis. V 25 p 751-756. 1993

LEE E-J, HEO Y-M, CHOI J-H, SONG H-O, RYU J-S, AHN M-H. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. Korean J Parasitol. V 46. P 145- 51.2008

LELL B, BORRMANN S, YAZDANBAKHS M, KREMSNER PG. Atopy and malaria. Wien Klin Wochenschr. 2001.

LEROUX LP, DASANAYAKE D, ROMMEREIM LM, FOX BA, BZIK DJ, JARDIM A, DZIERZINSKI FS. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. Int J Parasitol.v45(5) p 319-32. 2015

MAROBIN, L.; FLORES, M. L; RIZZATTI, B. B. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science, v.41, p.5-9, 2004.

MATRICARDI PM, ROSMINI F, RIONDINO S, FORTINI M, FERRIGNO L, RAPICETTA M, BONINI S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. BMJ. 320(7232):412-7. 2000

MEDEIROS M, FIGUEIREDO JP, ALMEIDA MC, MATOS MA, ARAÚJO MI, CRUZ AA, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol. v111(5)p 947-51.2003

MENDONÇA LR VEIGA RV, DATTOLI VC, FIGUEIREDO CA, FIACCONE R, SANTOS J, CRUZ AA, RODRIGUES LC, COOPER PJ, PONTES-DE-CARVALHO LC, BARRETO ML, ALCANTARA-NEVES NM. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban latin American. PLoS Negl Trop Dis. 11:1880-1886. 2012

MESSIER, V., LEVESQUE, B., PROULX, J.F., ROCHETTE, L., LIBMAN, M.D., WARD, B.J., SERHIR, B., COUILLARD, M., OGDEN, N.H., DEWAILLY, E. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). Zoonoses Public Health. V 56 p 188-197.

MEURS L, MBOW M, BOON N, VEREECKEN K, AMOAH AS, LABUDA LA, DIÈYE TN, MBOUP S, YAZDANBAKHS M, POLMAN K. Cytokine responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* in relation to infection in a co-endemic focus in northern Senegal. PLoS Negl Trop Dis. 2014

MORAMPUDI V, DE CRAEYE S, LE MOINE A, DETIENNE S, BRAUN MY, D'SOUZA S. Partial depletion of CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. Microbes and Infection v 13: 394-404.2011

MOREIRA-SILVA SF, LEÃO ME, MENDONÇA HF, PEREIRA FE. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of in patients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 40: 259-61, 1998.

MUTIUS.E VON. As alergias, infecções e da hipótese da higiene - A evidência epidemiológica. *Immunobiology*. 212 (6) :433-9. 2007

NISHIYA K , NOROSE K, AOSAI F, CHEN M, MUN HS, KANG HK, MIYAZAKI M, YANO A. Heat stress-induced modulation of host defense against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Parasitol*. 2005

O'GARRA A, VIEIRA P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. v 7(6) p 425-8. 2007

OKADA .H, C. KUHN, H. FEILLET AND J.-F. BACH. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*. v 160 p 1–9. 2010

O'NEILL LAJ. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*. v18(1) p 3-9. 2006

PAPPAS, G., ROUSSOS, N., AND FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. v 39 p 1385-1394.2009

PONTE EV, RASELLA D, SOUZA-MACHADO C, STELMACH R, BARRETO ML, CRUZ AA. Reduced asthma morbidity in endemic areas for helminth infections: a longitudinal ecological study in Brazil. *J Asthma*. V 51(10) p 1022-7. 2004

PONTE, E.V.; RIZZO, J.A.; CRUZ, A.A. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. *J Bras Pneumol*. V 33: 335–342.2007

REIS E SOUSA, C., S. HIENY, T. SCHARTON-KERSTEN, D. JANKOVIC, H. CHAREST, R. N. GERMAIN, AND A. SHER. 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*. p186:1819. 1997

REIS E SOUSA C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. V 16(1):27-34, 2004

READ S, POWRIE F . "CD4(+) regulatory T cells." *Current Opinion in Immunology* 13(6): 644-649.2001

RIBEIRO, A.C., MUTIS, M.S., AND FERNANDES, O. 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*. v 103. p 591-594. 2008

ROBERT-GANGNEUX, F., AND DARDE, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. v 25 p 264-296. 2012

RODRIGUES LC, NEWCOMBE PJ, CUNHA SS, ALCANTARA-NEVES NM, GENSER B, CRUZ AA, SIMOES SM, FIACCONE R, AMORIM L, COOPER PJ, BARRETO ML; Social Change, Asthma and Allergy in Latin America Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. *Clin Exp Allergy*. Nov;38(11):1769-77, 2008.

SAXENA A, KHOSRAVIANI S, NOEL S, MOHAN D, DONNER T, HAMAD AR. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy Cytokine.v 14 p 1043-4666. 2014

SAXENA A, KHOSRAVIANI S, NOEL S, MOHAN D, DONNER T, HAMAD AR. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy Cytokine.v 14 p 1043-4666. 2014

SHAPIRA Y, AGMON-LEVIN N, SELMI C, PETRÍKOVÁ J, BARZILAI O, RAM M, BIZZARO N, VALENTINI G, MATUCCI-CERINIC M, ANAYA JM, KATZ BS, SHOENFELD Y. Prevalence of anti-Toxoplasma antibodies in patients with autoimmune diseases. J Autoimmun. 2012

SUMMERS RW, ELLIOTT DE, URBAN JF, JR, THOMPSON R, WEINSTOCK JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. Gut . v 54 p 87–90. 2005 (A)

SUMMERS RW, ELLIOTT DE, URBAN JF, JR, THOMPSON RA, WEINSTOCK JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. Gastroenterology. v 128 p 825–32. 2005 (B)

SAWADOGO P, MAFIO J, BELLETE B, SUNG RTM, CHAKDI M, FLORI P, RABERIN H, MAMOUNI JB, CHAIT A, DALAL A . Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. Veterinary Parasitology. v 130: 89-92. 2005

SHEVACH EM . CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nature Reviews Immunology. v 2 p 389-400.2002

SUBAUSTE CS, WESSENDARP M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN-gamma. J Immunol. v . 1498-505.2000

TANASESCU R, Constantinescu CS. Helminth Therapy for MS. Curr Top Behav Neurosci. 2014

TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology 30: 1217-1258.2000

TENORIO EP, OLGUI'N JE, FERNANDEZ J, VIEYRA P, SAAVEDRA R. Reduction of Foxp3+ Cells by Depletion with the PC61 mAb Induces Mortality in Resistant BALB/c Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010

VAN DER KLEIJ D, LATZ E, BROUWERS JF, KRUIZE YC, SCHMITZ M, KURT-JONES EA, ESPEVIK T, DE JONG EC, KAPSENBERG ML, GOLENBOCK DT, TIELENS AG, YAZDANBAKSHI M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. J Biol Chem. v 13.122-9. 2002

VAN DER KLEIJ D, LATZ E, BROUWERS JF, KRUIZE YC, SCHMITZ M, KURT-JONES EA, ESPEVIK T, DE JONG EC, KAPSENBERG ML, GOLENBOCK DT, TIELENS AG, YAZDANBAKHS M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* v 13.122-9. 2002

VESCO G, BUFFOLANO WLA, CHIUSA L, MANCUSO G, CARACAPPA S, CHIANCA A, VILLARI S, CURRÒ V, LIGA F, PETERSEN E. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Veterinary Parasitology.* v 146 p 3-8. 2007

WAGNER A, FÖRSTER-WALDL E, GARNER-SPITZER E, SCHABUSSOVA I, KUNDI M, POLLAK A, SCHEINER O, JOACHIM A, WIEDERMANN U. Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *International Journal for Parasitology.* v 39:465-72. 2009

WEBER J, ILLI S, NOWAK D, SCHIERL R, HOLST O, VON MUTIUS E, EGE MJ. Asthma and the Hygiene Hypothesis - Does Cleanliness Matter? *Am J Respir Crit Care Med.* 2015

WILSON MS, MAIZELS RM. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* V 26(1). p 35-50.2004

WONG FS, WEN L. Toll-like receptors and diabetes. *Ann NY Acad Sci.* v 1150 p 123–32. 2008

WAKKACH A, FOURNIER N, BRUN V, BREITTMAYER JP, COTTREZ F, GROUX H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* v18(5) p 605-17.2003

YAZDANBAKHS M., KREMSNER PG. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296: 490-494.2002

YAZDANBAKHS M, MATRICARDI PM .Parasites and the Hygiene Hypothesis. Regulating the Immune System? *Rev Clin Allergy Immunol.* 2004