

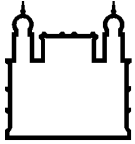
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL NO MODELO MURINO COM  
FENÓTIPO EXTREMO PARA TOLERÂNCIA ORAL:  
CARACTERIZAÇÃO CELULAR E HUMORAL

RAUL RAMOS FURTADO DIAS

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: Raul Ramos Furtado Dias**

**TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL NO MODELO MURINO COM  
FENÓTIPO EXTREMO PARA TOLERÂNCIA ORAL: CARACTERIZAÇÃO  
CELULAR E HUMORAL**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Biologia Parasitária.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kátia da Silva Calabrese**

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D541 Dias, Raul Ramos Furtado

Toxoplasmose experimental no modelo murino com fenótipo extremo para tolerância oral: caracterização celular e humoral / Raul Ramos Furtado. – Rio de Janeiro, 2014.

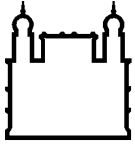
xv, 109 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 76-85

1. Toxoplasmose. 2. Modelos murinos. 3. Doença inflamatória intestinal. 4. Tolerância oral. 5. Histologia. I. Título

CDD 616.936



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: RAUL RAMOS FURTADO DIAS***

### **TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL NO MODELO MURINO COM FENÓTIPO EXTREMO PARA TOLERÂNCIA ORAL: CARACTERIZAÇÃO CELULAR E HUMORAL**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia da Silva Calabrese**

**Aprovada em: 17/12/2014**

#### **EXAMINADORES:**

Dr<sup>a</sup>. Helene Santos Barbosa (revisora, IOC)  
(Laboratório de Biologia Estrutural, IOC/Fiocruz)

Dr. Renato Augusto DaMatta (membro, UENF)  
(Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, UENF)

Dr. Daniel Gonçalves Tavares (membro, UERJ)  
(Departamento de Genética, UERJ)

Dr<sup>a</sup>. Adriana Lima Vallochi (suplente, IOC/Fiocruz)  
(Laboratório de Imunofarmacologia, IOC/Fiocruz)

Dr. Erick Vaz Guimarães (suplente, IOC/Fiocruz)  
(Laboratório de Biologia Estrutural, IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 17 de Dezembro de 2014

*Dedico esta tese às minhas “3 famílias”: de Barra Mansa, de Campos e de São Gonçalo.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Kátia da Silva Calabrese. Não apenas pela paciência e atenção na parte acadêmica, durante a minha orientação como doutorando, mas também por toda preocupação e ajuda pessoal nos momentos complicados pelos quais passei. Tenha certeza que sua ajuda foi fundamental para minha recuperação.

À Dr<sup>a</sup>. Maria de Fatima Sarro Silva, por toda a ajuda com o projeto de tese e com o artigo, por nossa amizade e troca de ideias sempre produtiva.

Ao Dr. Renato DaMatta, pela ajuda inestimável com o artigo, pela atenção, pelas conversas e dicas, pela amizade e por aceitar participar da banca de tese.

Ao Dr. Antônio Carlos da Silva, por ter fornecido gentilmente os camundongos utilizados neste projeto e pela ajuda no desenvolvimento do artigo.

Ao Dr. Daniel Tavares, por sempre ter ajudado cedendo os camundongos e por aceitar participar da banca de tese.

À Dr<sup>a</sup>. Helene Santos Barbosa, por ter revisado a tese e pela participação na banca de avaliação.

À Dr<sup>a</sup>. Celeste Freitas, pelo auxílio com a tese e por toda ajuda no laboratório.

Aos amigos do LIP: Fernando, Daiana, Flávia, Mariana, Sandy, Carol, Carol Magalhães, Luiz Otávio, Luiz d'Escoffier e Tânia, por toda a ajuda no laboratório, pela atenção e paciência, por todos os “galhos quebrados”, pelas ideias, conselhos, conversas e brincadeiras.

Aos parceiros do LBCT: Dr. Fábio Olivares, Rosemary, Fábio, Bruna, por toda ajuda com a cultura de células, manutenção dos camundongos e microbiologia.

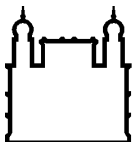
À minha família, que apesar da distância nos separando, me apoiou e incentivou sempre, e também às minhas duas “outras famílias”, que me deram apoio e me acolheram quando eu sempre precisei, nos momentos tranquilos e nos difíceis.

Aos meus amigos de Campos, do Rio e de Barra Mansa, pelos momentos de descontração, pelas brincadeiras, conversas sérias, conselhos e ajuda.

À Dr<sup>a</sup>. Rosana Monteiro, que nesse período complicado de final de doutorado, me ajudou a manter a calma, foco e o equilíbrio pra dar tudo certo.

Agradeço também à FAPERJ, CAPES e CNPq, por terem financiado o projeto.

E claro, não poderia deixar de agradecer a essa pessoa especial, a esse verdadeiro anjo que apareceu na minha vida, de uma maneira totalmente surpreendente e inesperada, e que acreditou em mim quando nem mesmo eu acreditava mais. Que me deu suporte, apoio e incentivo nos momentos complicados, e esteve ao meu lado compartilhando a alegria dos momentos felizes, o obrigado mais especial de todos, para meu amor, Monique!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

“TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL NO MODELO MURINO COM FENÓTIPO EXTREMO PARA TOLERÂNCIA ORAL: CARACTERIZAÇÃO CELULAR E HUMORAL”

### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

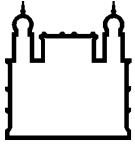
Raul Ramos Furtado Dias

## RESUMO

O tecido linfóide das mucosas apresenta estruturas especializadas contendo células imunorreguladoras e mecanismos capazes de determinar indução de tolerância ou resposta inflamatória após a administração oral de um antígeno. Diversos agentes causadores de doenças utilizam a via oral como rota de infecção, dentre eles o *Toxoplasma gondii*. A infecção por *T. gondii* pode gerar diversas manifestações patológicas, como por exemplo, a doença inflamatória intestinal, que envolve diferentes tipos celulares, diversas citocinas, bem como a participação da microbiota intestinal.

Para melhor compreender o envolvimento dos diversos tipos celulares e elementos humorais na toxoplasmose, elegemos como modelos experimentais as linhagens de camundongos geneticamente selecionados para tolerância oral: TR (resistentes à tolerância) e TS (susceptíveis à tolerância). Os camundongos TS se caracterizam por baixa resposta inflamatória e maior quantidade de células T regulatórias produtoras de IL-10. Em contraste, os camundongos TR produzem fortes reações inflamatórias. A caracterização da toxoplasmose experimental nos camundongos TR e TS infectados por gavagem com *T. gondii* foi feita por análise histológica e imunohistoquímica de cortes do intestino, fígado e baço, dosagem de citocinas e quimiocinas, além da caracterização da microbiota intestinal.

Nossos resultados confirmam o estabelecimento de uma resposta inflamatória intestinal aguda nos camundongos TR, que ocorre durante os 14 dias iniciais da infecção. As lesões apresentam macrófagos e, em menor número, células dendríticas. Além disso, o perfil de citocinas corrobora essas observações, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias, tanto sistêmica quanto localizada. Os camundongos TS, por outro lado, apresentaram um perfil característico voltado para a regulação, inibindo a infecção intestinal e produção de citocinas inflamatórias, ao mesmo tempo em que favorece um aumento da quantidade de parasitos nos órgãos. O perfil da microbiota intestinal não apresentou diferenças qualitativas entre as linhagens TS e TR, porém os camundongos TS possuem maior presença de bactérias do gênero *Prevotella*, enquanto nos camundongos TR predomina a família *Enterobacteriaceae*. Esses enterotipos observados não exibiram mudanças significativas ao longo do período de infecção de 21 dias dentro das mesmas linhagens.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**“EXPERIMENTAL TOXOPLASMOSIS IN MURINE MODELS SELECTED FOR EXTREME PHENOTYPES OF ORAL TOLERANCE: CELULAR AND HUMORAL CHARACTERIZATION”**

### PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Raul Ramos Furtado Dias

### ABSTRACT

The mucosal lymphoid tissue has specialized structures containing immunoregulatory cells and mechanisms to determine the induction of tolerance or inflammatory response following oral administration of an antigen. Several agents causative of diseases uses the oral route as a form of infection, including *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* infection can lead to various pathological manifestations, such as inflammatory bowel disease, involving various cell types, several cytokines, as well as the involvement of the intestinal microbiota.

To better understand the involvement of different cell types and humoral elements in the toxoplasmosis, we choose as experimental models two lineages of mice genetically selected for oral tolerance: TR (tolerance resistant) and TS (tolerance susceptible). TS mice are characterized by low inflammatory response and increased amount of regulatory T cells producing IL-10. In contrast, the TR mice produce strong inflammatory reactions. Characterization of experimental toxoplasmosis in TR and TS mice infected by gavage with *T. gondii* was made by histological and immunohistochemical analysis of sections of the intestine, liver and spleen, dosage of cytokines and chemokines, in addition to characterization of intestinal microbiota.

Our results confirm the setting of an acute inflammatory response in the intestines of TR mice, which occurs during the initial 14 days from infection. Lesions presented macrophages and to a lesser number, dendritic cells. Moreover, the cytokine profile supports these observations, with a high production of pro-inflammatory cytokines, either systemic or localized. TS mice, on the other hand, showed a characteristic profile directed to regulation, inhibiting intestinal infection and production of inflammatory cytokines at the same time it promotes an increase in the number of parasites in the organs. The intestinal microbiota profile did not differ qualitatively between the TS and TR lineages, but TS mice have greater presence of bacteria of genus *Prevotella*, while in TR mice predominates the *Enterobacteriaceae* family. These enterotypes showed no significant changes during the 21 day period within the same lineages.



# ÍNDICE

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Tolerância oral .....	3
1.1.2 Camundongos TR e TS .....	5
1.1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.1.4 Doença inflamatória intestinal.....	12
1.1.5 Células dendríticas .....	13
1.1.6 Macrófagos.....	14
1.1.7 Células T regulatórias .....	14
1.1.8 Microbiota intestinal.....	15
1.1.9 Citocinas durante a toxoplasmose.....	16
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Declaração de ética.....	19
3.2 Camundongos .....	19
3.3 Manutenção da cepa ME 49 de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	19
3.4 Infecção.....	19
3.5 Quantificação de parasitos em cultura de tecidos .....	20
3.6 Detecção do <i>T. gondii</i> por PCR em tempo real quantitativo.....	20
3.7 Processamento para histopatologia.....	21
3.8 Análise de citocinas .....	21
3.9 Análise molecular da microbiota ileal .....	21
3.10 Amplificação por PCR.....	22
3.11 Coleta de órgãos para imunohistoquímica .....	23
3.12 Imunofluorescência.....	24
3.13 Análise estatística .....	24

<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	Avaliação da taxa de sobrevivência .....	25
4.2	Avaliação da carga parasitária.....	25
4.3	Análise histopatológica do íleo.....	28
4.4	Análise histopatológica do fígado .....	31
4.5	Análise histopatológica do baço.....	34
4.6	Avaliação dos níveis sistêmicos e teciduais de citocinas.....	36
4.6.1	Níveis de IL-6.....	36
4.6.2	Níveis de IL-10.....	38
4.6.3	Níveis de MCP-1 .....	40
4.6.4	Níveis de IFN- $\gamma$ .....	42
4.6.5	Níveis de TNF- $\alpha$ .....	44
4.6.6	Níveis de IL12p70.....	46
4.6.7	Níveis de IL-17, IL-4 e IL-2 .....	48
4.7	Imunohistoquímica para macrófagos e células dendríticas.....	51
4.8	Análise da microbiota intestinal por PCR .....	54
4.9	Sumário dos resultados.....	63
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção das linhagens TR e TS, através de seleção genética bidirecional.....	5
Figura 2 - Seleção, por tratamento intragástrico com ovalbumina (OVA) solúvel, antes da imunização com OVA + hidróxido de alumínio. ....	6
Figura 3 - Perfil das populações de camundongos TR e TS após a seleção e endocruzamento. ....	7
Figura 4 - Diferenças entre os perfis de citocinas e regulatórios das linhagens TR e TS.....	8
Figura 5 - Curva de sobrevivência dos camundongos TR, TS e C57BL/6 infectados por gavagem com 50 cistos de <i>T. gondii</i> cepa ME-49 .....	25
Figura 6 - Análise imunohistoquímica do intestino de camundongos TR e TS, infectados por gavagem com 100 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49, 14 dias após a infecção. <i>T. gondii</i> marcado com anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (verde) e núcleos das células marcados com DAPI (azul).....	26
Figura 7 - Análise imunohistoquímica do fígado de camundongos TR e TS, infectados por gavagem com 100 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49, 14 dias após a infecção. <i>T. gondii</i> marcado com anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (verde) e núcleos das células marcados com DAPI (azul).....	27
Figura 8 - Quantificação de parasitos por qPCR, no íleo de camundongos TR e TS após infecção por gavagem com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. Valores expressos em parasitos/g de tecido. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01).....	28
Figura 9 - Aspecto histológico do íleo de camundongos TR e TS não infectados. Coloração por H&E. ....	28
Figura 10 - Aspectos histopatológicos do íleo de camundongos TR e TS após infecção com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. Coloração por H&E. ....	30
Figura 11 - Aspecto histológico do fígado de camundongos TR e TS não infectados. Coloração por H&E. ....	31
Figura 12 - Histologia do fígado de camundongos TR e TS, aos 7, 14 e 21 dias de infecção com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. Coloração por H&E. ....	33

<b>Figura 13 - Aspecto histológico do baço de camundongos TR e TS não infectados. Coloração por H&amp;E. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 14 - Aspectos histopatológicos do baço de camundongos TR e TS, aos 7, 14 e 21 dias de infecção com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. Coloração por H&amp;E. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 15 - Concentração sérica de IL-6 nos camundongos TR e TS infectados com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. A diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 16 - Concentração de IL-6 no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 17 - Concentração sérica de IL-10 no soro de camundongos TR e TS infectados com 50 cistos de ME-49 por gavagem. Diferença estatística entre os dados indicada por ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 18 - Concentração de IL-10 no baço e fígado de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 19 - Concentração de MCP-1 de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 20 - Concentração de MCP-1 no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 21 - Concentração de IFN-<math>\gamma</math> no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 22 - Concentração de IFN-<math>\gamma</math> no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 23 - Quantificação de TNF-<math>\alpha</math> no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 24 - Concentração de TNF-<math>\alpha</math> do intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P&lt;0,05) e ** (P&lt;0,01) ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 25 - Concentração de IL-12p70 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49.</b>	

Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01).....	46
Figura 26 - Concentração de IL-12p70 no intestino e no baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de <i>T. gondii</i> ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01) .....	47
Figura 27 - Concentração de IL-17 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01).....	48
Figura 28 - Concentração de IL-4 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01).....	49
Figura 29 - Concentração de IL-2 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os dados indicada por * (P<0,05) e ** (P<0,01).....	50
Figura 30 - Análise imunohistoquímica para obdervação de macrófagos (anti-F4/80 - vermelho) no intestino de camundongos TR e TS, 7 dias após infectados por gavagem com 100 cistos de ME-49.....	51
Figura 31 - Análise imunohistoquímica para a visualização de macrófagos (anti-F4/80 - vermelho), no intestino de camundongos TR e TS, 14 dias após infectados por gavagem, com 100 cistos de ME-49.....	52
Figura 32 - Marcação por imunofluorescência para células dendríticas (anti-CD11c), no intestino de camundongos TR e TS, 7 dias após infectados por gavagem com 100 cistos de ME-49 .....	53
Figura 33 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para $\beta$ -catenina, com controle positivo de 120pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49 .....	54
Figura 34 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero <i>Bacillus</i> , com controle positivo de aproximadamente 300pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.....	55
Figura 35 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para grupo <i>Bacteroides</i> , com controle positivo de aproximadamente 500pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	56
Figura 36 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para grupo <i>Clostridium</i> , com controle positivo de aproximadamente 450pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	57

Figura 37 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para família <i>Enterobacteriaceae</i> , com controle positivo de aproximadamente 500pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	58
Figura 38 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero <i>Enterococcus</i> , com controle positivo de aproximadamente 100pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	59
Figura 39 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para <i>Lactobacillus acidophilus</i> , com controle positivo de aproximadamente 575pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	60
Figura 40 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , com controle positivo de aproximadamente 150pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	60
Figura 41 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero <i>Prevotella</i> , com controle positivo de aproximadamente 550pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	61
Figura 42 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero <i>Streptococcus</i> , com controle positivo de aproximadamente 550pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49. ....	62

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Gêneros/espécies de bactérias avaliadas para validação de microbiota, seus respectivos pares de primers, tamanho do fragmento gerado e número de referência ATCC.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 2 - Gêneros/espécies de bactérias avaliadas para validação da microbiota intestinal, número de ciclos e temperaturas específicas da PCR convencional. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3 – Sumário dos resultados obtidos durante a infecção por gavagem com cistos de <i>T. gondii</i> da cepa ME-49.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AlOH<sub>3</sub> – hidróxido de alumínio

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio Eagle modificado)

DTH – *delayed type hypersensitivity* (reação hipersensibilidade do tipo tardia)

ESA – *excretory-secretory antigens* (antígenos secretado-excretado)

GALT – *gut-associated lymphoid tissue* (tecido linfóide associado ao intestino)

H&E – Hematoxilina-Eosina

IBD – *inflammatory bowel disease* (doença inflamatória intestinal)

ICAM – *intercellular adhesion molecule* (molécula de adesão intercelular)

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL – interleucina

iNOS – *inducible nitric oxide sintase* (óxido nítrico sintase indutível)

LPS – lipopolissacarídeo

MCP-1 – *monocyte chemotactic protein 1* (proteína quimiotática de monócitos 1)

ml – mililitro

OVA – ovalbumina

PBS – tampão fosfato dissódico

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

SFB – soro fetal bovino

TCR – *T Cell receptor* (receptor de célula T)

TGF- $\beta$  – *tumor growth factor beta* (fator de crescimento tumoral beta)

TLR4 – *Toll like receptor 4* (receptor semelhante a Toll 4)

TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis factor alfa* (fator de necrose tumoral alfa)

TO – tolerância oral

TR – *tolerance resistant* (resistente à tolerância)

TS – *tolerance susceptible* (suscetível à tolerância)

$\mu$ l – microlitro

$\mu$ m – micrometro



# 1 INTRODUÇÃO

A infecção por *Toxoplasma gondii* é adquirida por meio do solo e água contaminados com oocistos, ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos do parasito, ou verticalmente através da placenta (Liesenfeld, 2002). Em infecções orais naturais, estudos mostram que o hospedeiro se infecta quando os cistos ou oocistos ingeridos se rompem sob ação enzimática, liberando bradizoítos ou esporozoítos, que invadem os enterócitos e iniciam sua replicação, causando a lise celular e liberação de taquizoítos (Halonen & Weiss, 2013). Os parasitos também podem atravessar diretamente o epitélio intestinal, sem interrupção da camada endotelial, e infectar diretamente a lamina própria (Barragan & Sibley, 2002).

Enterócitos infectados passam a secretar quimiocinas para recrutar células dendríticas na lamina própria. Uma vez na lamina própria, o parasito pode invadir macrófagos, células dendríticas ou alcançar diretamente os sistemas linfático e circulatório, se disseminando pelo organismo (Halonen & Weiss, 2013).

A susceptibilidade dos camundongos à infecção por *T. gondii* após a infecção oral está sob controle multigênico, assim como a sobrevivência dos camundongos durante a fase aguda da infecção (Williams *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 2002). Durante a fase aguda, os camundongos suscetíveis comumente desenvolvem uma inflamação intestinal, cuja imunopatologia se assemelha a episódios agudos das doenças inflamatórias intestinais humanas (IBDs) (Liesenfeld, 2002; McGovern & Powrie, 2007). Sugere-se que *T. gondii* esteja envolvido na etiopatogenia das IBDs em humanos, especialmente a doença de Crohn, uma vez que há detecção de excesso de anticorpos anti-*T. gondii* em pacientes que sofrem deste quadro clínico (Lidar *et al.*, 2009).

Os modelos animais utilizados para o estudo da toxoplasmose possuem algumas limitações. Nos estudos de inflamação intestinal em camundongos infectados com altas doses de cistos de *T. gondii*, a principal dificuldade encontrada é a manutenção do animal vivo durante a fase crônica. Em contrapartida, o uso de doses menores provoca pouca ou nenhuma inflamação intestinal nesses modelos. Existem linhagens de camundongos, como BALB/c, por exemplo, que sobrevivem à infecção oral com 100 cistos de *T. gondii*, mas não desenvolvem a inflamação intestinal (Liesenfeld, 2002). Modelos como os camundongos TLR4-deficientes (C57BL/10ScN, portadores da mutação que torna o TLR4 não funcional) apresentam

60% de sobrevivência após a infecção oral, porém imunopatologia reduzida (Heimesaat *et al.*, 2007).

Tem sido proposta a participação da microbiota intestinal no estabelecimento da doença inflamatória causada por *T. gondii* (Liesenfeld, 2002; Heimesaat *et al.*, 2007), porém não existe consenso em relação ao papel da microbiota intestinal. Alguns autores demonstram que a presença de determinados grupos de bactérias auxiliam no estabelecimento da infecção pelo parasito, ou potencializam os danos causados pelas células linfóides, por meio da exacerbação da resposta imunológica devido à liberação de LPS por essas bactérias (Heimesaat *et al.*, 2006; Bereswill *et al.*, 2014). Outros autores, porém, demonstram que a microbiota intestinal normal na verdade confere papel protetor contra o estabelecimento e a progressão da doença inflamatória intestinal, e que um desequilíbrio dessa comunidade bacteriana levaria à piora do quadro da IBD ocasionada por *T. gondii* (Benson *et al.*, 2009).

A mucosa gastrointestinal é vista como uma via eficaz para atingir o sistema imunológico, e também a rota mais comum de infecção com *T. gondii* observada nos hospedeiros. Essa mucosa está envolvida com o desenvolvimento de respostas tanto imunogênica e tolerogênica, porque está em contato com uma miríade de antígenos associados à microbiota intestinal e proteínas alimentares. Estas respostas tolerogênicas são conhecidas como tolerância oral (TO), um mecanismo fisiológico que impede a hipersensibilidade alimentar e reações alérgicas adversas à microbiota intestinal normal (Weiner & Faria, 2005), e é definido como a inibição de respostas imunológicas específicas contra antígenos previamente ingeridos (Castro-Junior *et al.*, 2012).

A caracterização celular e humoral de duas linhagens de camundongos geneticamente selecionados para fenótipos extremos de tolerância oral foi feita por Silva *et al.* (1998). Essas linhagens foram escolhidas em virtude de sua capacidade de apresentar susceptibilidade ou resistência à tolerância oral, frente à administração de um antígeno por via oral. Os camundongos com fenótipos de resistência (TR) e de sensibilidade (TS) foram gerados para suscetibilidade ou resistência à tolerância oral à ovalbumina (OVA) por cruzamento bidirecional de uma população fundadora [F0], processo que será descrito mais detalhadamente no item 1.1.2.

Camundongos TR apresentam respostas inflamatórias e alérgicas intensas, e apresentam elevado número de mastócitos (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006) e

baixos níveis de células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, produzindo níveis baixos de IL-10, inversamente aos camundongos TS (Silva *et al.*, 2010). Diferem também sobre a infecção por parasitos intracelulares, como os fungos *Sporothrix schenckii* e do protozoário *Leishmania amazonensis*. Camundongos TR infectados com *S. schenckii* (Silva *et al.*, 2001) e *L. amazonensis* (Tavares *et al.*, 2006) apresentam mortalidade mais elevadas e lesões inflamatórias mais intensas que os camundongos TS, em consequência do desenvolvimento exacerbado da resposta imunológica.

Apesar de mais de 100 anos desde a sua descrição, ainda existem muitas questões a serem respondidas a respeito da toxoplasmose. Isto se deve, principalmente, ao fato de existirem poucos modelos animais capazes de reproduzir, com eficácia, o que ocorre na infecção natural por *T. gondii* em humanos (Liesenfeld, 2002; Tedesco *et al.*, 2007). O uso dos modelos murinos TR e TS tem gerado resultados interessantes em outras pesquisas (Silva *et al.*, 2001; Machado-Silva *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2006).

## **1.1 Revisão Bibliográfica**

### **1.1.1 Tolerância oral**

O tecido linfóide das mucosas, com sua extensa área de superfície em contínuo contato com o ambiente externo, tem participação crucial na defesa do hospedeiro. Este tecido apresenta estruturas linfóides especializadas contendo células imunorreguladoras e mecanismos capazes de determinar a indução de tolerância ou intensa resposta imunológica, após a administração oral de um antígeno.

Uma das formas mais eficazes de indução da tolerância imunológica é pela via oral. A resposta fisiológica aos antígenos alimentares e da microbiota é a indução de um estado específico de reatividade sistêmica, denominado tolerância oral, e que é definido pela inibição de respostas imunológicas específicas contra um antígeno previamente ingerido (Castro-Junior *et al.*, 2012).

São atribuídos três mecanismos básicos a tolerância oral: deleção clonal, anergia clonal e supressão ativa (Faria & Weiner, 2006). Um dos principais mecanismos associados à tolerância oral é a supressão ativa (Bueno & Pacheco-

Silva, 1999), e há alguns anos foram encontradas evidências também da participação dos mecanismos de deleção e anergia clonal (Weiner, 2004).

A supressão ativa é mediada por células regulatórias e a secreção *in situ* de citocinas, tais como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , que representam uma das principais formas de regulação da resposta imunológica. Como consequência, tais citocinas podem suprimir inespecificamente qualquer resposta imunológica local.

Evidências da participação das células T CD8<sup>+</sup> na tolerância oral foram obtidas em estudos mostrando que populações de células CD8<sup>+</sup> podem produzir IL-4 e IL-10, gerando uma população de células T CD8 regulatórias (Ke & Kapp, 1996; Arnaboldi *et al.*, 2009). O emprego de camundongos geneticamente modificados, ou tratados com anticorpos anti-CD8, demonstra que é possível a indução de tolerância oral nesses casos, indicando que não há uma requisição absoluta das células T CD8<sup>+</sup> para a indução ou manutenção da tolerância (Weiner & Faria, 2005). O quanto estas células podem contribuir em aspectos individuais da tolerância, ou seu papel nos diferentes tecidos, como a mucosa, ainda necessita ser estabelecido.

Por suas características, a tolerância oral possui um potencial de uso terapêutico para resolução de doenças inflamatórias, alérgicas e autoimunes (Strobel & Mowat, 1998; Faria & Weiner, 2006). Vários fatores influenciam na indução da tolerância oral. A forma e concentração do antígeno são importantes porque interferem diretamente no mecanismo de indução de tolerância. Proteínas solúveis são capazes de induzir tolerância oral mais facilmente do que antígenos particulados. Baixas doses de antígeno favorecem o mecanismo de supressão ativa, enquanto altas doses parecem favorecer anergia/deleção clonal (Bueno & Pacheco-Silva, 1999). A genética e a idade também são fatores determinantes na indução de tolerância oral. Vaz *et al.* (1987) mostraram que as linhagens de camundongos isogênicos exibem diferentes graus de tolerância oral, enquanto De Faria e colaboradores (1998) mostraram que camundongos muito jovens exibem maior dificuldade em desenvolvê-la, assim como os mais velhos também são mais refratários à tolerância oral.

Pela importância fisiológica do contato antigênico pela via oral, duas linhagens de camundongos foram obtidas por seleção genética bidirecional para fenótipos extremos de tolerância oral – resistente à tolerância (Linhagem TR-Ab/HetS) e sensível à tolerância (Linhagem TS-Ab/HetS) – por tratamento

intragástrico com ovalbumina (OVA) solúvel, previamente à imunização sistêmica com o mesmo antígeno (Silva *et al.*, 1998).

### 1.1.2 Camundongos TR e TS

Os camundongos TR e TS foram obtidos a partir de uma população F0 originada do inter cruzamento de oito linhagens isogênicas, a saber: A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6J (Figura 1).

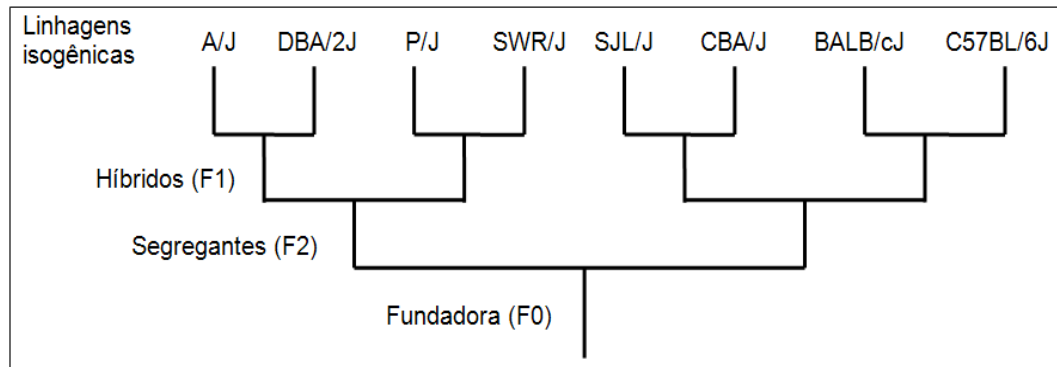


Figura 1 - Obtenção das linhagens TR e TS, através de seleção genética bidirecional. Modificado de Silva *et al.* (1998).

Após o inter cruzamento das oito linhagens isogênicas, foi gerada uma população fundadora F0, cujos indivíduos foram selecionados para tolerância oral, por administração oral de ovalbumina (OVA) e avaliação da produção de anti-OVA após inoculo desse antígeno. Após 7 dias da administração de OVA via oral, os camundongos da população F0 foram imunizados com OVA+AIOH<sub>3</sub> (hidróxido de alumínio) via intra-peritonal, e após 28 dias foram avaliados para produção de anticorpos IgG, para verificar a indução de tolerância (Figura 2) (Silva *et al.*, 2001).

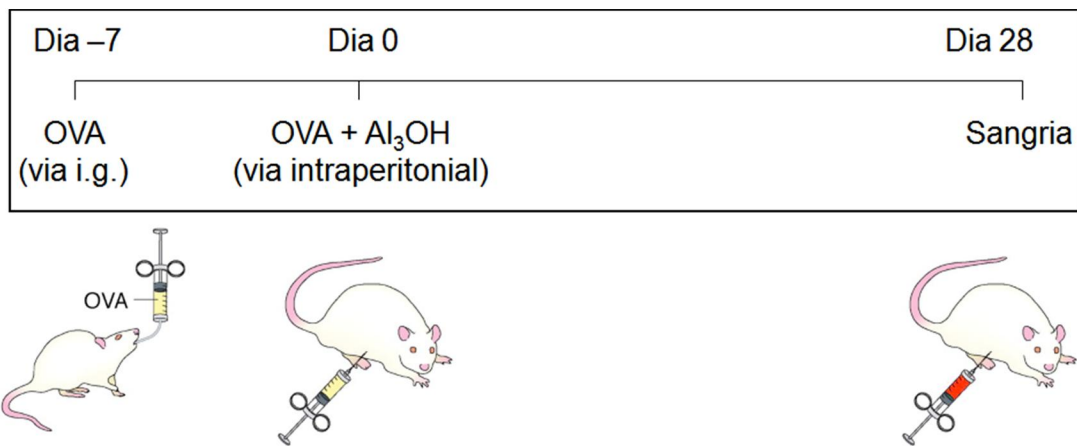


Figura 2 - Seleção, por tratamento intragástrico com ovalbumina (OVA) solúvel, antes da imunização com OVA + hidróxido de alumínio.

Os camundongos que se mostraram resistentes ou susceptíveis à tolerância foram sucessivamente intrecruzados, a fim de fixar o fenótipo desejado, tomando o cuidado de evitar o cruzamento de irmãos para que somente os genes envolvidos com o caráter desejado entrassem em homozigose. Após cerca de 25 gerações de endocruzamento, verificou-se o estabelecimento de duas populações distintas. A figura 3 apresenta uma curva gaussiana ilustrando a mudança no perfil das populações conforme a sucessão das gerações ocorreu. Esse perfil é avaliado baseado na titulação de IgG anti-OVA (Silva *et al.*, 1998).

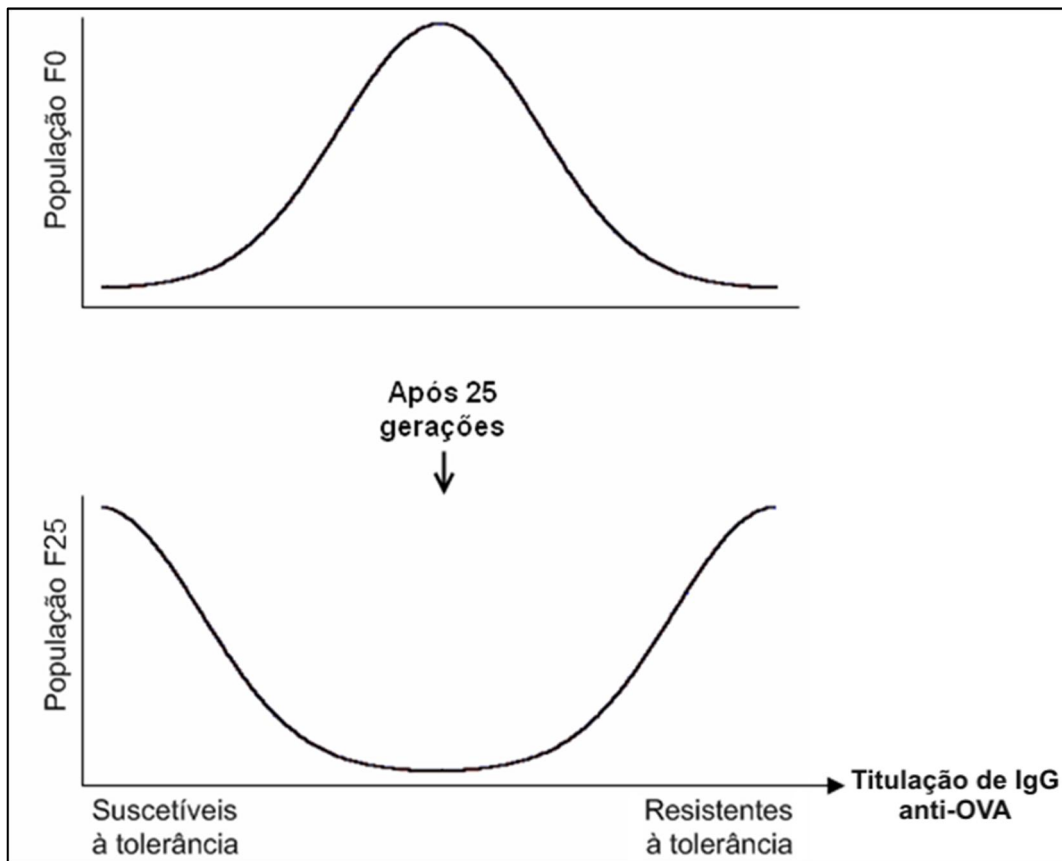


Figura 3 - Perfil das populações de camundongos TR e TS após a seleção e endocruzamento. Baseada em Silva *et al.* (1998).

De acordo com a figura, percebe-se que há uma inversão da curva gaussiana, partindo inicialmente de uma população com titulação predominantemente intermediária, até atingir uma polarização das populações.

Como resultado desta experiência de seleção, os camundongos susceptíveis à tolerância (TS), tratados ou não oralmente com OVA produzem altos níveis de IL-4 e IL-10, um perfil de citocinas favorável ao desenvolvimento de tolerância, em especial pela alta produção de IL-10 e de um número maior de células T regulatórias CD4+CD25+ (Silva *et al.*, 2010). Contrariamente, os camundongos resistentes à tolerância (TR) não apresentam estas características favoráveis à indução de tolerância oral, tendo um perfil incapaz de inibir respostas imunológicas inatas e adaptativas (Figura 4).

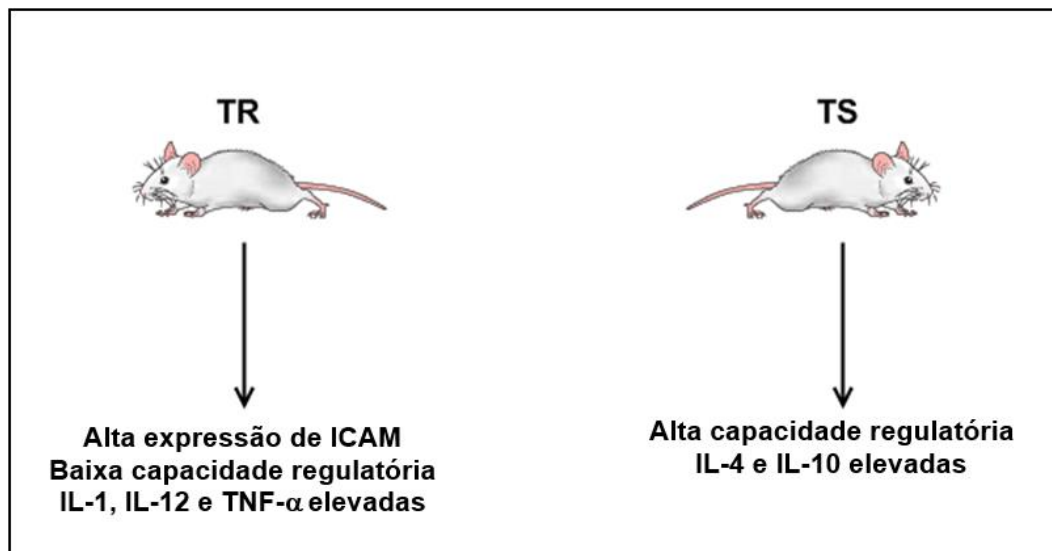


Figura 4 - Diferenças entre os perfis de citocinas e regulatórios das linhagens TR e TS.

Os camundongos TR, quando submetidos a protocolos de inflamação aguda ou alérgica, mostram respostas inflamatórias mais potentes, caracterizadas por maior migração de neutrófilos, expressão de ICAM elevada, altos níveis de PGE2 e citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12, quando comparados com TS (Silva *et al.*, 2004). A indução de inflamação alérgica intestinal resulta em um acentuado processo inflamatório na linhagem TR. Os resultados foram avaliados por contagem de eosinófilos nos infiltrados inflamatórios intestinais e contagem de mastócitos no mesentério (Silva *et al.* 2006).

Em estudos anteriores, os camundongos TR e TS mostraram serem modelos efetivos quando infectados com parasitos intracelulares. Camundongos TR infectados por *Sporothrix schenckii* e *Leishmania amazonensis* apresentaram, respectivamente, maior mortalidade e lesões inflamatórias do que camundongos TS, devido a uma resposta imunológica mais exacerbada (Silva *et al.*, 2001; Tavares *et al.*, 2006). Outra razão para a utilização desses camundongos como modelos foram os resultados observados por Brandtzaeg (1996) no envolvimento da mucosa com a miríade de antígenos de proteínas microbianas e de alimentos, que levaram a respostas imunogênicas e tolerogênicas. Mucosas em geral, e em particular a mucosa gastrointestinal, são formas naturais e eficazes utilizadas por parasitos como *T. gondii* para atingir o sistema imunológico e se disseminar por todo o hospedeiro.

Considerando os perfis inflamatórios e imunotolerogênico divergentes dos camundongos TR e TS, e dada sua importância fundamental para o estabelecimento



de reação imunológica ou anergia frente a desafios com antígenos orais, selecionamos o parasito *Toxoplasma gondii* para melhor explorar o potencial destas linhagens como modelo para infecções orais.

### 1.1.3 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular que infecta freqüentemente um largo espectro de animais homeotérmicos, incluindo humanos (Schulthess *et al.*, 2008). Este parasito foi descrito pela primeira vez em 1908, simultaneamente por Nicolle e Mancaeux na Tunísia, e por Splendore no Brasil. A soroprevalência do *Toxoplasma gondii* na população mundial varia de menos de 10%, nos Estados Unidos, Coréia do Sul e Suíça, até cerca de 80% em Madagascar e São Tomé e Príncipe (Pappas *et al.*, 2009). No Brasil, entre 21% e 84% da população geral apresenta anticorpos contra este parasito, de acordo com a condição socioeconômica. Em grávidas, esse percentual pode chegar a 92%, que faz do Brasil um dos países com maior soroprevalência para este parasito no mundo (Dubey *et al.*, 2012). Sua classificação taxonômica é a seguinte:

Reino: Protista  
Filo: Apicomplexa  
Classe: Conoidasida  
Ordem: Eucoccidiorida  
Família: Sarcocystidae  
Gênero: *Toxoplasma*  
Espécie: *Toxoplasma gondii*

Usualmente, as cepas de *T. gondii* são classificadas de acordo com padrões genéticos, e organizadas em três linhagens clonais como genótipos tipo I, II e III, de acordo com a patogenicidade do parasito em camundongos, considerando-se a virulência e o potencial de letalidade. Os parasitos de genótipo tipo I são os de maior virulência e letalidade em camundongos, capazes de causar ascite em um período de 5 a 10 dias; os de genótipos II são as cepas cistogênicas, que induzem a infecção crônica e a formação de cistos cerebrais; e os parasitos de genótipo III, de virulência moderada ou intermediária, capazes de reduzir o tempo de vida dos camundongos após sucessivas passagens *in vivo* e induzir um quadro neurológico alguns meses após a infecção experimental. Nos Estados Unidos e na Europa, cerca de 95% das linhagens podem ser classificadas em um destes três grupos (Khan *et al.*, 2007). Entretanto, a ocorrência de cepas recombinantes, que se encaixam em mais de uma

categoria, ou mesmo em nenhuma das categorias de classificação, é muito maior em outras áreas do globo, como a América do Sul (Pena *et al.*, 2008).

Este parasito é capaz de infectar qualquer tipo de célula nucleada e se disseminar através do corpo, e por este motivo a infecção por *T. gondii* apresenta extensa variedade de manifestações patológicas, variando de uveíte congênita à inflamação intestinal (Liesenfeld, 2002; Tedesco *et al.*, 2007).

A infecção por *T. gondii* é adquirida pela ingestão de carne mal cozida ou crua contendo cistos do parasito, congenitamente através da placenta (Tenter *et al.*, 2000), ou pelo solo ou água contaminados por oocistos (Dubey, 2004). Em infecções orais naturais, estudos histopatológicos demonstram a invasão do parasito em uma variedade de tipos celulares no intestino, e subsequente disseminação por todo o corpo (Dubey, 1997; Zenner *et al.*, 1998).

Quando o hospedeiro ingere cistos ou oocistos contendo *T. gondii*, os parasitos são liberados no lúmen intestinal. Posteriormente, os parasitos liberados invadem os enterócitos e iniciam sua replicação, causando a lise celular e liberação de taquizoítos (Halonen & Weiss, 2013). Os parasitos também podem atravessar diretamente o epitélio intestinal, sem ruptura da camada endotelial, e infectar diretamente a lamina própria (Barragan & Sibley, 2002).

Enterócitos infectados passam a secretar quimiocinas para recrutar células dendríticas na lamina própria. Uma vez na lamina própria, o parasito pode invadir macrófagos, células dendríticas ou alcançar diretamente os sistemas linfático e circulatório, se disseminando pelo organismo (Halonen & Weiss, 2013). A infecção dos enterócitos pelo parasito resulta em aumentada expressão de CD40, CD1d e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, sugerindo que os enterócitos possam atuar como APCs, estando assim envolvidos na ativação dos linfócitos. (Schulthess *et al.*, 2008). Depois de atravessar o epitélio intestinal, *T. gondii* se espalha em vários tecidos e atravessa barreiras biológicas para alcançar locais imunologicamente privilegiados, como o cérebro e os olhos, onde ele pode causar patologias graves (Barragan & Sibley, 2002).

Uma variedade de manifestações patológicas é observada em modelos murinos infectados por *T. gondii*, indo desde meningoencefalite até córiorretinite e doença inflamatória intestinal (IBD) (Liesenfeld, 2002; King *et al.*, 2003; Tedesco *et al.*, 2007). A infecção oral por *T. gondii* em modelos murinos está sob controle poligênico (Williams *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 2002). Para algumas patologias, os

modelos animais são escassos e apresentam limitações biológicas. Pode ser citado como exemplo o modelo murino para estudo das doenças inflamatórias intestinais, proposto por Liesenfeld em 2002. A limitação deste modelo se dá por só poder ser usado para estudo da fase aguda da infecção, uma vez que os camundongos C57BL/6 apresentam mortalidade de 100% até o 13º dia de infecção. A apresentação clínica das inflamações intestinais causadas por organismos patogênicos demonstra similaridades com doenças inflamatórias intestinais (IBDs). A imunopatologia da doença de Crohn, por exemplo, é bastante semelhante às patologias causadas por agentes indutores de resposta tipo Th1, como *T. gondii*. Em camundongos C57BL/6 infectados com cargas elevadas de *T. gondii*, uma doença inflamatória intestinal é observada, com características morfológicas semelhantes à IBD humana (Liesenfeld, 2002).

Este processo inflamatório resulta em mortalidade precoce dos hospedeiros suscetíveis. Uma dificuldade em estudos de inflamação intestinal em camundongos infectados com altos inóculos de *T. gondii* é manter o animal vivo durante os últimos estágios da infecção. Os camundongos C57BL/6 desenvolvem a inflamação e começam a morrer no sétimo dia após a infecção. Camundongos BALB/c, por outro lado, sobrevivem à infecção oral com elevados inóculos, mas não desenvolvem a inflamação intestinal (Liesenfeld *et al.*, 1996). Um modelo mais sofisticado, como camundongos TLR4-deficientes (C57BL/10ScN, transportando uma deleção do TLR4) apresenta 60% de sobrevivência após a infecção oral, mas reduzida imunopatologia (Heimesaat *et al.*, 2007). Esta imunopatologia ileal murina possui bastante semelhança com episódios agudos de IBD humana (Liesenfeld, 2002; McGovern & Powrie, 2007), sugerindo que *T. gondii* possa estar envolvido na etiopatogenia, especialmente na doença de Crohn humana (Lidar *et al.*, 2009). A investigação da patologia crônica intestinal em camundongos infectados oralmente com *T. gondii* é, portanto, relevante.

Sabe-se que nos processos de disseminação e estabelecimento desta infecção, células dendríticas e macrófagos possuem relevância por uma série de motivos. Dentre esses motivos, pode ser citada a grande motilidade que essas células possuem, podendo atuar como “cavalos de Tróia”, facilitando a disseminação do parasito para locais do corpo que dificilmente teria acesso de outra forma. Além disso, é de conhecimento que durante a doença inflamatória intestinal induzida pela infecção por *T. gondii*, a ocorrência de uma mudança de perfil na microbiota

intestinal é fundamental para o estabelecimento da patologia e é capaz de determinar a severidade da mesma (Heimesaat *et al.*, 2007).

#### **1.1.4 Doença inflamatória intestinal**

Na medicina, o termo “doença inflamatória intestinal” representa um grupo de condições inflamatórias dos intestinos grosso e delgado. As IBDs doença de Crohn e colite ulcerativa são reconhecidas como importantes causas de doenças gastrointestinais em crianças e adultos (Hendrickson *et al.*, 2002).

Estudos utilizando modelos murinos para IBD têm levado ao consenso geral de que essas condições clínicas são resultado da quebra da homeostase intestinal. Ao que tudo indica, o balanço normal entre citocinas inflamatórias e regulatórias mantido no intestino é perturbado durante a IBD, o que pode levar à respostas patológicas inapropriadas à microbiota intestinal, ao invés da tolerância usual (Garside, 1999).

As células CD4+ têm um papel crítico na inflamação intestinal observada em modelos animais para IBD. A significância das células CD4+ pode ser demonstrada pela observação de: 1- células T CD4+ são encontradas em infiltrações na lâmina própria durante as IBDs; e 2- a transferência de populações de células CD4+ em camundongos SCID e RAG, deficientes em células B e T maduras, resulta em inflamação intestinal (Hendrickson *et al.*, 2002). A importância das células T também fica evidenciada em modelos de inflamação intestinal causada por *T. gondii*, como descrito por Liesenfeld e colaboradores (1996). Uma vez que camundongos C57Bl/6 atímicos não desenvolvem a necrose do íleo (Liesenfeld *et al.*, 1996), as células T, e não os parasitos, parecem ser a causa da necrose observada nos vilos dos camundongos C57Bl/6 não-atímicos.

Falhas no controle da imunidade de mucosas podem disparar respostas inflamatórias contra bactérias comensais. Trabalhos com modelos murinos para colite demonstram que as principais células envolvidas na regulação deste processo inflamatório são as T regs. As células T regs que são ativadas nesse processo controlam eficientemente as células T reativas e as respostas inatas, permitindo assim o mínimo de danos ao tecido (Powrie *et al.*, 2003).

A apresentação clínica e histológica das doenças inflamatórias intestinais possui certo número de similaridades com as infecções intestinais causadas por organismos patogênicos. A imunopatologia da doença de Crohn e das infecções

causadas por agentes indutores de resposta tipo Th1, como *T. gondii*, são bastante parecidas (Liesenfeld *et al.*, 1996). Ambas ocorrem principalmente na região íleo-terminal e envolvem a participação de células CD4<sup>+</sup> no estabelecimento da necrose dos vilos, por exemplo. O modelo de IBD induzido pela infecção de *T. gondii* compartilha com o modelo da doença de Crohn não somente moléculas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS, mas também citocinas com efeito preventivo como IL-10 e TGF- $\beta$  e o papel das células CD4<sup>+</sup> na patologia (Liesenfeld, 2002).

#### **1.1.5 Células dendríticas**

Experimentos *in vitro* mostram que monócitos diferenciam-se em células dendríticas na presença de GM-CSF ou GM-CSF e IL-4. Outro fato interessante é que as células dendríticas, à medida que migram para os linfonodos regionais, sofrem um processo de maturação no qual perdem sua capacidade fagocítica, mas adquirem outras propriedades, como apresentar antígenos devido ao aumento de moléculas co-estimulatórias e do MHC.

As células dendríticas têm sido implicadas tanto em processos de estimulação da resposta imunológica quanto na indução de tolerância. Células dendríticas intestinais têm sido relatadas como células apresentadoras de antígenos (APC) administrados por via oral (Chirido *et al.*, 2005). Segundo Mowat (2005), células dendríticas intestinais não seriam inerentemente tolerogênicas, estas células dendríticas podem tanto induzir tolerância quanto imunidade ativa. Em condições fisiológicas, elas são quiescentes, capazes de apresentar antígenos e induzir tolerância, mas sendo suficientemente responsivas a estímulos inflamatórios que permite sensibilizar células T e desenvolver imunidade protetora, quando necessário. De acordo com as experiências de Worbs (2006) a indução da tolerância oral é estabelecida no linfonodo mesentérico e as células dendríticas desempenham importante função na condução destes antígenos da lâmina própria para o linfonodo.

Células dendríticas possuem um grande potencial para estimular células T *helper* e células T citotóxicas, além de produzirem fatores pró-inflamatórios e expressarem moléculas coestimulatórias importantes no desencadeamento da resposta imunológica. Além disto, diferentes populações de células dendríticas atuam de formas distintas, induzindo proliferação ou função supressora, em células regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Quabed *et al.*, 2008).

### 1.1.6 Macrófagos

O macrófago é uma célula do sistema imunológico altamente distribuída pelo organismo, e possui características marcantes como aderência rápida a substratos e heterogeneidade funcional e estrutural. Macrófagos obtidos de organismos infectados com patógenos ou estimulados com agentes que causam inflamação adquirem capacidade de destruir células tumorais e microorganismos, aumentam a capacidade secretora, apresentam maiores e mais numerosos e são capazes de modular a quantidade e os tipos de receptores na superfície da membrana (Adams & Hamilton, 1984).

Diversas citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Interleucina 3 (IL-3) e GM-CSF quando liberadas atuam de modo pró-inflamatório. Já citocinas como IL-10 e o fator beta de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) de forma antiinflamatória (Metcalf, 1989). Dessa forma essas citocinas modulam as diversas funções dos macrófagos.

Os monócitos Gr1+ também estão envolvidos na toxoplasmose e seu papel foi explorado por Dunay *et al.* (2008). Neste estudo, demonstram que camundongos knock out para o receptor de quimiocina CCR2 ou para o ligante MCP-1, que não apresentam monócitos Gr1+ na mucosa intestinal, quando infectados com *T. gondii* por via oral desenvolvem grandes extensões de necrose no íleo e apresentam carga parasitária elevada. Os mesmos animais, quando recebem os monócitos inflamatórios por transferência adotiva, ficam protegidos contra a patologia intestinal, desenvolvendo apenas uma leve necrose dos vilos.

### 1.1.7 Células T regulatórias

As células T imunorregulatórias (T regs) possuem um papel central na manutenção da regulação imunológica. Existem dois tipos principais: Foxp3+CD4+CD25+, que se desenvolvem no timo e regulam células T auto-reativas; e as células T regs induzidas, que se desenvolvem a partir de células CD4+ convencionais (Belkaid *et al.*, 2006).

Devido à sua natureza regulatória, as células T regs são capazes de controlar negativamente a intensidade das respostas imunológicas contra parasitos intracelulares, através da regulação da resposta tipo Th1 (Sakaguchi, 2003). A depleção parcial de células T regulatórias resulta no aumento da carga parasitária em camundongos BALB/c, particularmente na lamina própria, além de aumentar também a produção de citocinas pró-inflamatórias nestes camundongos, o que levou

a uma histopatologia do íleo mais severa nos camundongos BALB/c depletados comparada aos camundongos controle (Morampudi *et al.*, 2011).

Em um modelo de camundonga grávida infectada com *T. gondii*, os níveis de expressão de mRNA para Foxp3 nos esplenócitos e na placenta se mostram bastante reduzidos, assim como o número de células regulatórias CD4+CD25+ do baço e de células Foxp3+ na placenta decrescem de maneira sincronizada nos camundongos infectados. Adicionalmente, a injeção de antígenos ESA de *T. gondii* em camundongas grávidas resultou em aborto; porém, a transferência adotiva de células T regs de camundongas não infectadas foi capaz de prevenir parcialmente a perda dos fetos (Ge *et al.*, 2008).

### 1.1.8 Microbiota intestinal

Uma grande quantidade de bactérias habita o intestino dos mamíferos, e suas relações mutualísticas e simbióticas com o hospedeiro (interações hospedeiro-bactéria e bactéria-bactéria) determinam um microambiente complexo e altamente dinâmico (Zhao *et al.*, 2013).

Estima-se que a microbiota humana possua cerca de  $10^{14}$  células bacterianas (Ley *et al.*, 2006), um número que é cerca de 10 vezes maior que o número de células humanas presentes no nosso corpo (Sekirov *et al.*, 2010).

A microbiota intestinal possui diversos papéis fundamentais na digestão de alimentos, metabolismo de compostos endógenos e exógenos, imunopotenciação e prevenção da colonização do trato gastrointestinal por patógenos, estando portanto envolvida na manutenção da saúde humana (Matsuki *et al.*, 2002).

Devido à limitações de pesquisa, os detalhes de muitos desses processos ainda são desconhecidos. Portanto, modelos murinos têm se tornado cruciais nas pesquisas sobre a microbiota intestinal, a fim de gerar conhecimento mecanístico sobre o estabelecimento e manutenção desta microbiota (Hildebrand *et al.*, 2013).

A desregulação da homeostase da mucosa intestinal leva à uma variedade de doenças, dos casos mais óbvios de doenças inflamatórias intestinais, passando por ativação crônica da infecção por HIV e geração de atopia. Desta forma, como a microbiota intestinal é um dos provedores dessa homeostase, consequentemente ela tem sido implicada na progressão dessas desordens (Sekirov *et al.*, 2010).

O papel da microbiota comensal intestinal na colite tem sido estudado em vários modelos experimentais, porém o conhecimento detalhado da composição da

microbiota intestinal na inflamação aguda intestinal ainda é muito limitado (Heimesaat *et al.*, 2007). De acordo com Liesenfeld (2002), camundongos infectados com 100 cistos de *T. gondii* e tratados com ciprofloxacina e metronidazol, logo no início da infecção, não desenvolveram mudanças patológicas em seus íleos 7 dias após a infecção. Nos camundongos tratados também se observou uma redução no número de microorganismos intestinais, e uma mudança para um perfil mais Gram-positivo nos camundongos tratados, indicando que as bactérias entéricas residentes possuem um papel na patologia intestinal seguida da infecção por *T. gondii*.

#### **1.1.9 Citocinas durante a toxoplasmose**

Citocinas são pequenas glicoproteínas produzidas por diversos tipos celulares, predominantemente leucócitos, capazes de regular a imunidade inata, inflamação e hematopoiese (Khan, 2008). A ação das citocinas é local, e envolve a modificação do comportamento das células próximas por efeito autócrino ou parácrino. Basicamente, existem dois grupos de citocinas: regulatórias e inflamatórias (ou protetoras).

Algumas linhagens de camundongos são susceptíveis à infecção por *T. gondii*, enquanto outras são resistentes ao desenvolvimento das patologias desta doença. Esta resistência/suscetibilidade pode estar relacionada ao perfil de citocinas produzido preferencialmente por cada uma destas linhagens. A linhagem C57Bl/6, por exemplo, apresenta um perfil de citocinas pró-inflamatório, exibindo grandes quantidades de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*. O tratamento destes camundongos com anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$  e aminoguanidina (um inibidor da iNOS) preveniu a necrose e prolongou o tempo de vida dos camundongos infectados (Liesenfeld *et al.* 1996). Os resultados deste e de outros trabalhos (Liesenfeld, 1999; Khan, 1997) indicam que o óxido nítrico induzido por uma combinação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  seria o principal mediador não-celular da patologia intestinal dos animais infectados.

O IFN- $\gamma$  foi a primeira citocina a ser associada à resistência ao *T. gondii*, permanecendo ainda hoje como a peça-chave da imunidade protetora contra este parasito (Filisetti & Candolfi, 2004). O IFN- $\gamma$  é produzido durante a toxoplasmose tanto por camundongos suscetíveis quanto por camundongos resistentes. Esta citocina aumenta a atividade fagocítica de macrófagos e a citotoxicidade das células T CD8+; ela também ativa a conversão de taquizoítas em bradizoítas (Filisetti & Candolfi, 2004).



Camundongos como o BALB/c, que apresentam perfil de regulação frente à infecção por *T. gondii*, produzem citocinas inflamatórias em menor quantidade, e apresentam níveis normais de IL-10 e TGF- $\beta$ , não desenvolvendo as patologias características, principalmente na região do íleo-terminal. Isso se deve ao fato da IL-10 regular negativamente a produção de citocinas inflamatórias, além de interferir na síntese de IFN- $\gamma$ , pelo menos em parte, inibindo a síntese de IL-12 pelos macrófagos (Kasper *et al.*, 2004). O papel do TGF- $\beta$  como imunossupressor já é bastante conhecido, sendo considerado um antagonista de diversas citocinas inflamatórias, entre as quais TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  e IL-2. Este efeito antiinflamatório torna possível regular a atividade imunológica durante a infecção por *T. gondii*, evitando principalmente danos ao intestino e ao cérebro (Hunter *et al.*, 1995). Entretanto, o TGF- $\beta$  aumenta a taxa de replicação do parasito quando este se localiza em células da retina em cultura, sugerindo uma participação na imunopatologia da uveíte (Nagineni *et al.*, 2002).

Desta forma, o estudo da imunidade humoral e celular na doença inflamatória intestinal causada pela infecção experimental por *T. gondii* no modelo murino em camundongos geneticamente selecionados para tolerância oral (TS e TR), se faz relevante para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade a esta infecção, justificando a proposta deste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a resposta celular e humoral na infecção por *T. gondii* em camundongos geneticamente selecionados para tolerância oral (TS e TR).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar histologicamente a patologia no fígado, baço e intestino, durante o curso da infecção por *T. gondii*.
- Caracterizar por imunohistoquímica os tipos celulares no fígado e intestino, envolvidos na patologia.
- Quantificar a carga parasitária, no fígado e intestino, durante o curso da infecção por *T. gondii*.
- Caracterizar o perfil de citocinas sistemicamente e *in situ* no fígado, baço e intestino nos camundongos infectados por *T. gondii*.
- Caracterizar por PCR a microbiota intestinal dos camundongos saudáveis e infectados.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Declaração de ética**

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com a Lei nº 11.794/08, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UERJ, sob o nº: CEA/243/2008. Os camundongos foram submetidos à eutanásia com CO<sub>2</sub> em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health.

#### **3.2 Camundongos**

Foram utilizados camundongos da geração F25 das linhagens TS e TR, de ambos os sexos, mantidos no Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UERJ pelo Dr. Antonio Carlos da Silva e pelo Dr. Daniel Gonçalves Tavares. Para cada infecção experimental, foram utilizados 46 camundongos de ambos os sexos das linhagens resistentes e suscetíveis à tolerância (23 TR e 23 TS, respectivamente) da mesma idade, por experimento. Como controles para a mortalidade, foram utilizados 6 camundongos C57BL/6 (5-6 semanas de idade).

#### **3.3 Manutenção da cepa ME 49 de *Toxoplasma gondii***

A cepa ME-49 foi mantida através da infecção intraperitoneal de camundongos C57BL/6, com 10 cistos provenientes do cérebro de camundongos da mesma linhagem em estágio crônico da infecção.

Após 45 dias, os camundongos foram eutanasiados em câmara com atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. Subsequentemente os cérebros foram removidos, homogeneizados em 1ml de PBS e os cistos foram morfológicamente definidos e contados em microscópio óptico (objetiva de 40x) em três alíquotas de 20 ul.

#### **3.4 Infecção**

Os camundongos foram infectados por gavagem, com 50 cistos de *T. gondii* (100 cistos no caso da análise imunohistoquímica) da cepa ME-49 diluídos em 0,2 ml de PBS. Os camundongos controle receberam 0,2 ml de PBS sem cistos. Os grupos experimentais foram separados da seguinte forma: 23 animais de cada linhagem (TR e TS); seis deles utilizados para avaliação de sobrevivência, 12

utilizados para análise histopatológica e os cinco restantes utilizados como controles. Os camundongos C57BL/6 foram utilizados para avaliação de sobrevivência. A infecção experimental foi feita em triplicata. Os camundongos foram observados durante uma janela experimental de 21 dias, numa base diária. Devido à rápida progressão da doença alguns camundongos morreram entre as sessões de monitoramento, mas os encontrados em estado moribundo durante a visita diária foram submetidos à eutanásia em câmara com atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. No fim da janela experimental, todos os camundongos restantes foram eutanasiados da mesma maneira.

### **3.5 Quantificação de parasitos em cultura de tecidos**

Avaliação da carga parasitária foi realizada no fígado por método biológico utilizando fibroblastos de rim de macaco (células Vero) em triplicatas, modificado a partir de Zenner *et al.* (1998). Aos 21 dias de infecção, foram coletados os fígados de 3 camundongos TR e TS, lavados em PBS, pesados e macerados com um bastão de vidro em PBS (2 ml de PBS por cada 0,5 gramas). A suspensão foi centrifugada (50 g, 10 min), e 200 µl do sobrenadante foi adicionado a frascos (25 cm<sup>2</sup>) contendo uma monocamada de células VERO em 5 ml de DMEM suplementado com 5% de FBS e 1% de ciprofloxacina. Após 72 h, os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados (1000 g, 10 minutos), o sedimento ressuspendido em 1 ml e parasitos contados em câmara de Neubauer. O número de parasitos por grama de órgão foi calculado como se segue: carga parasitária = número de parasitos por ml de cultura de tecidos / peso do órgão (g). Para cada um dos órgãos, a carga parasitária foi expressa em valor de média ± desvio padrão. A carga parasitária foi representada graficamente em escala linear versus o número de cistos utilizados para a infecção.

### **3.6 Detecção de *T. gondii* por PCR em tempo real quantitativo.**

O DNA molde foi adicionado a uma mistura de reação contendo 10 µl de MasterMix Real Time PCR – SYBR Green, 2 µl de mistura dos primers TOXO-F (5 mM, 5'-TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3') e TOXO-R (5 mM, 5'-AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG-3'), 3 µl de H<sub>2</sub>O e 5 µl de amostra, em um volume final de 20 µl. As PCRs foram realizadas com o Sistema de Detecção de Sequência StepOnePlus (Applied Biosystems). Após a ativação inicial da DNA polimerase AmpliTaq Gold a 95°C durante 20 segundos, foram realizados 40 ciclos

de PCR de 95°C durante 5 s e 60°C durante 30 segundos. O valor limiar de ciclo (CT), indicativo da quantidade de gene alvo em que a fluorescência excede um limiar predeterminado, foi determinado. Este limite foi definido como 20 vezes o desvio padrão do sinal de fluorescência da linha de base, ou seja, o sinal fluorescente normalizado dos primeiros ciclos de PCR. Depois de atingir o limiar, a amostra foi considerada positiva.

### **3.7 Processamento para histopatologia**

Aos 7, 14 e 21 dias de infecção, 3 camundongos de cada linhagem foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à eutanásia com CO<sub>2</sub>, e após foram coletados o íleo, baço e fígado. Os órgãos foram fixados em 10% de formalina neutra tamponada em PBS durante 24 h e processadas para exame histopatológico. Os órgãos foram incluídos em parafina, cortados e corados com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram observadas em um microscópio de luz Zeiss Axioplan e imagens digitais foram capturadas com uma câmera digital MRC5 AxioCam com o sistema Axiovision - Zeiss.

### **3.8 Análise de citocinas**

Para a avaliação do perfil de citocinas, foi coletado o soro de camundongos TR e TS. Além disso, frações do baço e intestino destes camundongos também foram coletadas, maceradas em PBS e inibidor de protease. Os macerados foram centrifugados, os sobrenadantes coletados em Eppendorfs, em volumes de 100 µl, e armazenados a -20 ° C. A análise foi feita por ELISA em citômetro de fluxo, usando os kits Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2/Th17 e Mouse Inflammation, da BD Bioscience. Os níveis de produção de citocinas foram avaliados em triplicata. As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo do fabricante. A análise dos dados foi realizada com o software FCAP Array v2.0 (Softflow) e Cyflogic (Perttu Terho & CyFlo). Os níveis de citocinas foram expressos em pg / ml.

### **3.9 Análise molecular da microbiota ileal**

O conteúdo luminal foi removido a partir de 1 cm da extremidade final do íleo, ressuspensionado em PBS, e centrifugado (16.000 g/10 min). O sedimento foi ressuspensionado em 0,5 ml de tampão de lise (Tris 500 mM [pH 9,0], EDTA 20 mM, NaCl 10 mM, SDS a 1%) e incubou-se com proteinase K (5 mg / ml; Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 56 °C. O DNA total foi isolado por extração por fenol, e serviu

como molde para a amplificação por PCR (dados referentes à amplificação de cada par de primer discriminados na Tabela 1) de genes de rRNA 16S bacterianos. As bactérias/grupos bacterianos avaliados foram: *Bacillus spp.*, *Bacteroides* (grupo), *Clostridium* (grupo), *Enterobacteriaceae* (grupo), *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Prevotella spp.* e *Streptococcus spp.* As bactérias usadas como referência estão listadas na Tabela 1, juntamente com os primers correspondentes.

Tabela 1 - Gêneros/espécies de bactérias avaliadas para validação de microbiota, seus respectivos pares de primers, tamanho do fragmento gerado e número de referência ATCC.

Bactérias/Grupos	Primer (F / R)	Fragmento	Referência
<i>Bacillus spp</i>	TCGAAATTGAAAGGCGGC GGTGCCAGCTTATTCAAC	411bp	ATCC 14579
<i>Bacteroides</i> (grupo)	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT CCAGTATCAACTGCAATTTTA	501bp	ATCC 8482
<i>Clostridium</i> (grupo)	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	438-441bp	ATCC 19403
<i>Enterobacteriaceae</i>	CAGGTCGTCACGGTAACAAG GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	512bp	ATCC 13048
<i>Enterococcus spp</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112bp	ATCC 29212
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CACTTCGGTGATGACGTTGG CGATGCAGTTCCTCGGTTAAGC	575bp	ATCC 4356
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GTCGAACGAGTTCTGATTATTG GAACCATGCGGTTCTTGAT	158bp	ATCC 9595
<i>Prevotella spp</i>	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTGCAGACC	527-529bp	ATCC 49046
<i>Streptococcus spp</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GTACCGTCACAGTATGAACTTTCC	500bp	ATCC 25175

### 3.10 Amplificação por PCR

As PCRs foram realizadas em volumes de 25 µl, consistindo de 8,9 µl de água ultrapura esterilizada, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,5 µl de tampão de reação (100 mM Tris-HCl, KCl 500 mM), 0,5 µl de mix de dNTP, 0,5 µl de cada primer, e 10 µl de DNA extraído em fenol-clorofórmio (10 ng/µl). A estas misturas foram adicionados

0,1 µl de TaqDNA polimerase (Boehringer Mannheim). Os ciclos de amplificação foram realizadas em termociclador de DNA Veriti (Applied Biosystems), estando as temperaturas e os tempos respectivos de cada par de primer listados na Tabela 2. 10 µl das amplificações de PCR foram corridos em gel de agarose em tampão Tris-acetato, por 40 min a 120 V ou 90 V, dependendo do tamanho do produto de amplificação, coradas com GelRed e fotografado sob luz UV. Para checar a quantidade de DNA em cada amostra, o gene para  $\beta$ -catenina também foi amplificado.

Tabela 2 - Gêneros/espécies de bactérias avaliadas para validação da microbiota intestinal, número de ciclos e temperaturas específicas da PCR convencional.

Bactérias/Grupos	Nº ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
<i>Bacillus</i> spp	35	Inicial: 5 min 94°C / 1min	55°C / 1min	72°C / 1min Final: 4min
<i>Bacteroides</i> (grupo)	40	Inicial: 5 min 94°C / 20s	50°C / 20s	72°C / 30s Final: 5 min
<i>Clostridium</i> (grupo)	40	Inicial: 5 min 94°C / 20s	50°C / 20s	72°C / 30s Final: 5 min
<i>Enterobacteriaceae</i> (grupo)	35	Inicial: 5 min 94°C / 30s	60°C / 30s	72°C / 1min Final: 10 min
<i>Enterococcus</i> spp	30	Inicial: 2 min 94°C / 15s	55°C / 15s	72°C / 45s Final: 5 min
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	Inicial: 5 min 95°C / 30s	63°C / 30s	72°C / 30s Final: 5 min
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	30	Inicial: 5 min 95°C / 30s	63°C / 30s	72°C / 30s Final: 5 min
<i>Prevotella</i> spp	40	Inicial: 5 min 94°C / 20s	55°C / 20s	72°C / 30s Final: 5 min
<i>Streptococcus</i> spp	30	Inicial: 2 min 94°C / 15s	55°C / 15s	72°C / 45s Final: 5 min

### 3.11 Coleta de órgãos para imunohistoquímica

Frações dos lóbulos do fígado e da região terminal do íleo dos camundongos TR e TS, 7 e 14 dias após serem infectados com 100 cistos de ME-49, foram coletadas e lavadas em PBS. Em seguida, essas frações foram embebidas em fluido de congelamento OCT Tissue Tek, no interior de cassetes plásticos, congeladas sobre suporte metálico em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70 °C.

### 3.12 Imunofluorescência

Secções congeladas do íleo e fígado de camundongos TR e TS coletados após 7 e 14 dias de infecção foram cortadas em criostato, com 6mm de espessura. Os cortes foram aderidos em lâminas saturadas com gelatina e sulfato de cromo, e fixadas com acetona. Os cortes foram re-hidratados com incubação em solução de bloqueio (3% de albumina de soro bovino, 0,1% de gelatina, 0,05% de Tween 20, 0,05% de azida sódica em água destilada) durante 10 min. As secções foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-*T. gondii*, anti-F4/80 (detecção de macrófagos) ou anti-CD11c (detecção de células dendríticas) durante 60 minutos em câmara úmida, lavadas e depois incubadas com um anticorpo secundário durante 60 minutos. As secções foram lavadas e montadas com Prolong Gold contendo DAPI (Molecular Probes), e curadas durante 24 h no escuro. As lâminas foram observadas num microscópio de epifluorescência Axioplan Zeiss equipado com uma lâmpada de HBO W 100 e as imagens digitais foram capturadas com o software Axiovision. As imagens foram processadas com reajustes lineares semelhantes em Photoshop (Adobe). Utilizou-se o ImageJ software livre e ITCN plugin para a quantificação dos parasitos presentes nas imagens capturadas. Usaram-se os seguintes parâmetros de contagem: Width - 7; MD - 3,5; Threshold 2,5.

### 3.13 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos de camundongos foram determinadas pelo teste ANOVA e teste *t* de Student, e os grupos foram considerados estatisticamente diferentes se  $P \leq 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da taxa de sobrevivência

Quando infectados com 50 cistos de ME-49, 100% dos camundongos C57BL/6 (linhagem usada como comparativo de suscetibilidade) sobreviveram por 21 dias, período necessário para desenvolvimento do experimento.

Neste mesmo período de tempo, os camundongos TS apresentaram uma taxa de sobrevivência de 90%, com a mortalidade iniciando apenas após 14 dias da infecção. Já nos camundongos TR, o início da mortalidade foi mais precoce, logo após 8 dias da infecção, e alcançando 55% de sobrevivência da população inicial a partir do 18º dia (Figura 5).

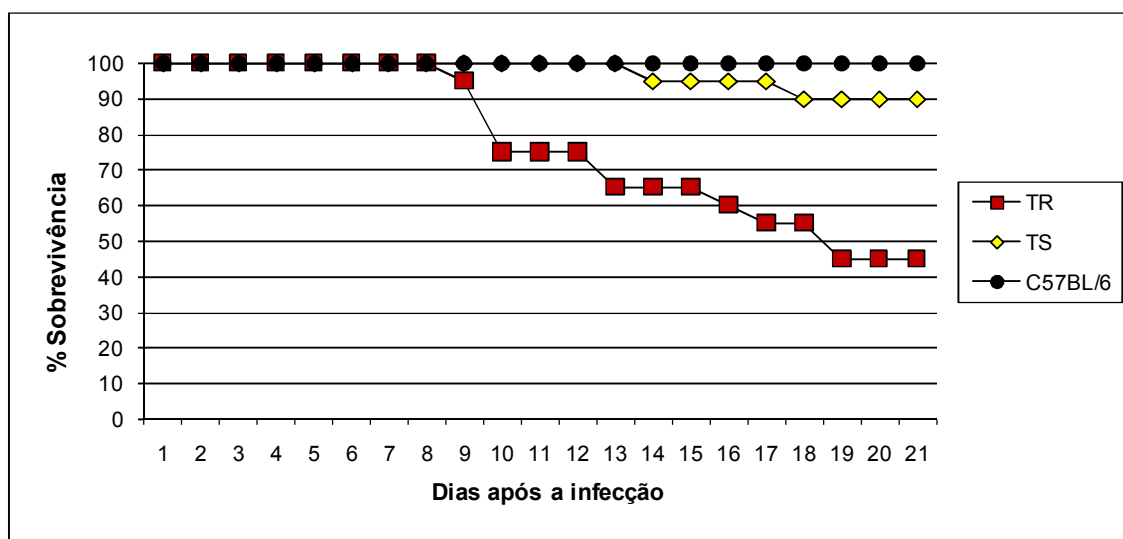


Figura 5 - Curva de sobrevivência dos camundongos TR, TS e C57BL/6 infectados por gavagem com 50 cistos de *T. gondii* cepa ME-49. n = 18 camundongos; dados representativos de 3 experimentos.

### 4.2 Avaliação da carga parasitária

Os camundongos da linhagem TR apresentaram significativamente menos parasitos por grama de tecido que os camundongos TS aos 21 dias de infecção, respectivamente  $0,5 \times 10^5$  parasitos contra  $1,8 \times 10^5$  parasitos por grama do fígado. Estes dados são representativos, e apresentam significância ( $P < 0,05$ ).

Na avaliação por imunofluorescência, os camundongos TR apresentaram menor quantidade de parasitos no íleo em relação aos camundongos TS (Figura 6). Em quantidade absoluta observada nos cortes do íleo, quantificada pelo programa ImageJ juntamente com o plugin ITCN, os camundongos TR apresentaram apenas  $8,75 \pm 7,46$  parasitos na seção observada, contra  $38,75 \pm 14,17$  observados no corte referente aos camundongos TS.

Transformando essa observação em quantificação relativa à área, levando em consideração a área total da imagem ( $0,02588 \text{ mm}^2$ ), obtemos  $1580,23 \pm 577,85$  e  $356,83 \pm 304,22$  parasitos por  $\text{mm}^2$  no íleo dos camundongos TS e TR, respectivamente.

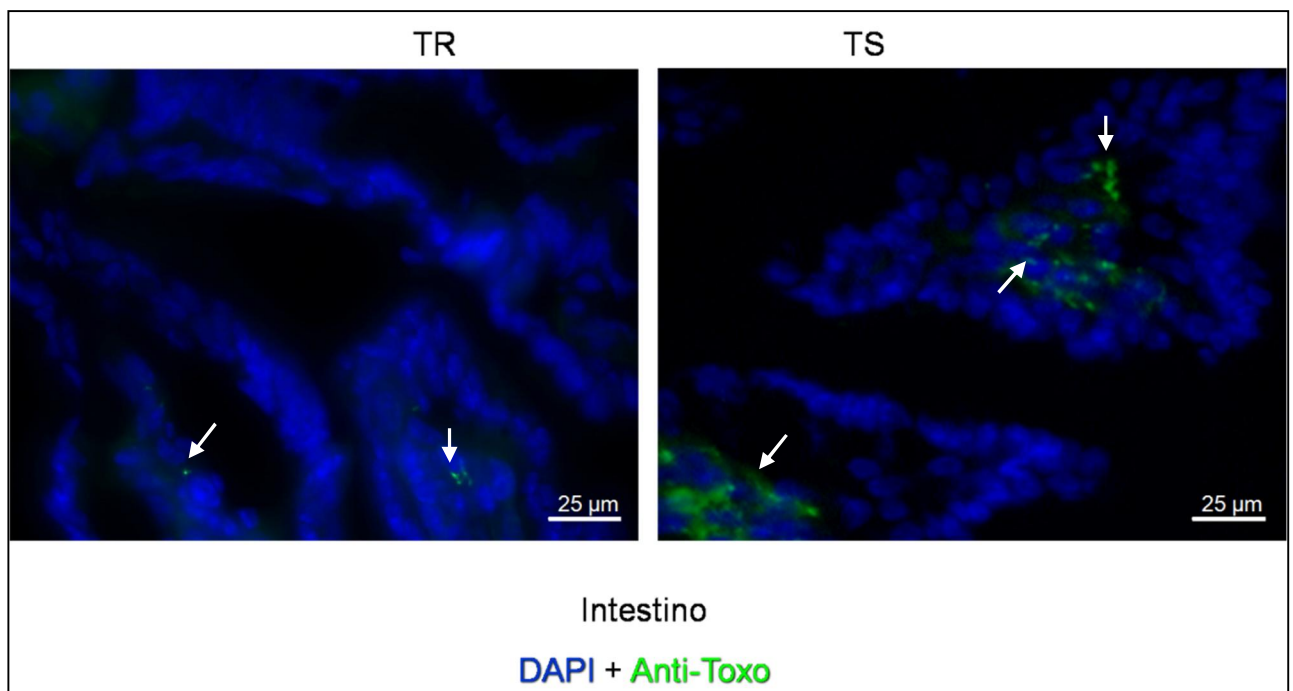


Figura 6 - Análise imunohistoquímica do intestino de camundongos TR e TS, infectados por gavagem com 100 cistos de *T. gondii* ME-49, 14 dias após a infecção. *T. gondii* marcado com anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (verde) e núcleos das células marcados com DAPI (azul). Parasitos indicados por seta. Área da figura =  $25.881 \mu\text{m}^2 = 0,02588 \text{ mm}^2$ .

Nos camundongos TS os parasitos também estavam presentes no fígado, ao contrário dos camundongos TR, onde não foi observada a presença de parasitos neste órgão (Figura 7). A quantificação absoluta demonstrou a presença de  $2,75 \pm 2,22$  parasitos nos cortes do fígado dos camundongos TS, e a quantificação relativa estimou  $112,15 \pm 90,53$  parasitos por  $\text{mm}^2$  nesse órgão. Os camundongos controle foram negativos para marcação com anticorpo anti-*T. gondii*.

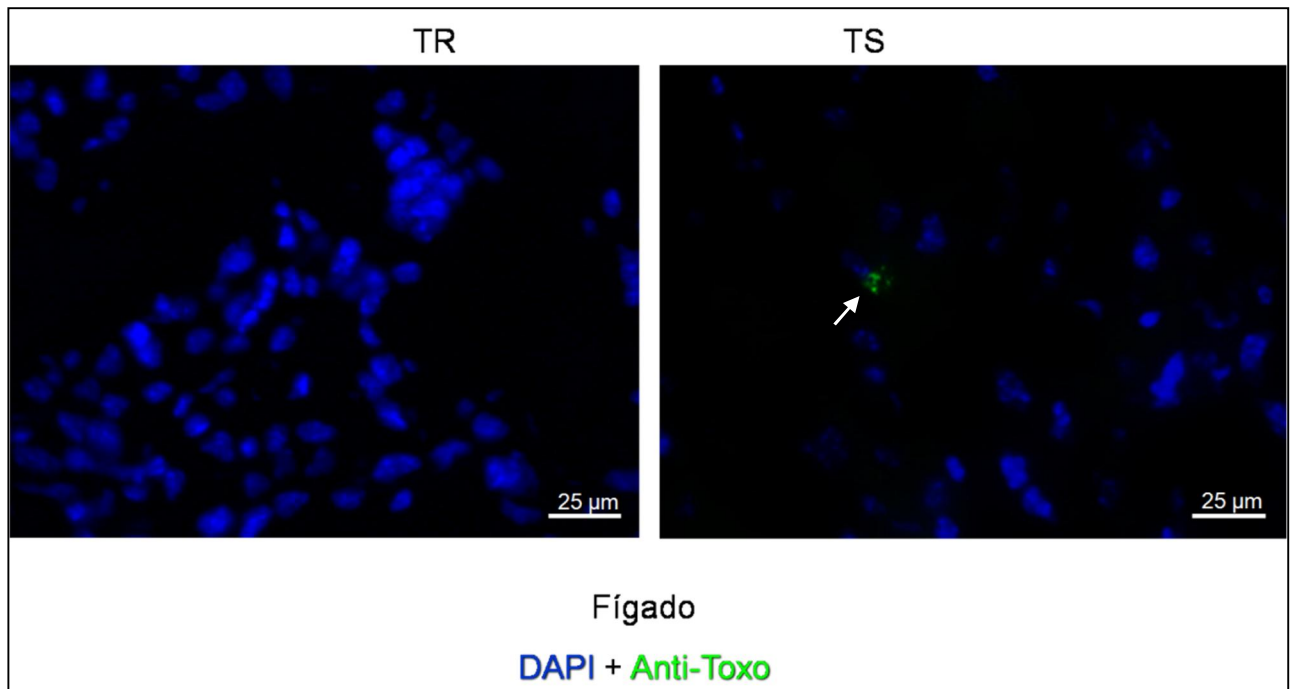


Figura 7 - Análise imunohistoquímica do fígado de camundongos TR e TS, infectados por gavagem com 100 cistos de *T. gondii* ME-49, 14 dias após a infecção. *T. gondii* marcado com anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (verde) e núcleos das células marcados com DAPI (azul). Parasitos indicados por seta. Área da figura =  $25.881 / \mu\text{m}^2 = 0,02588 \text{ mm}^2$ .

A estimativa da quantidade de parasitos por qPCR no íleo dos camundongos TS 7, 14 e 21 dias após a infecção por gavagem com *T. gondii* foi superior à quantidade de parasitos observada nos camundongos TR (Figura 8). No 7º dia da infecção, os camundongos TS apresentaram média de  $7,6 \times 10^2$  parasitos/g contra  $1,6 \times 10^2$  parasitos/g de tecido nos camundongos TR. No 14º dia após a gavagem, observou-se um aumento geral na quantidade de parasitos avaliada por esta técnica, sendo que os camundongos TS apresentaram média de  $9,5 \times 10^2$  parasitos/g contra  $5,0 \times 10^2$  na linhagem TR. No 21º dia, as quantidades observadas para as linhagens TS e TR foram, respectivamente,  $1,1 \times 10^3$  e  $2,7 \times 10^2$  parasitos/g.

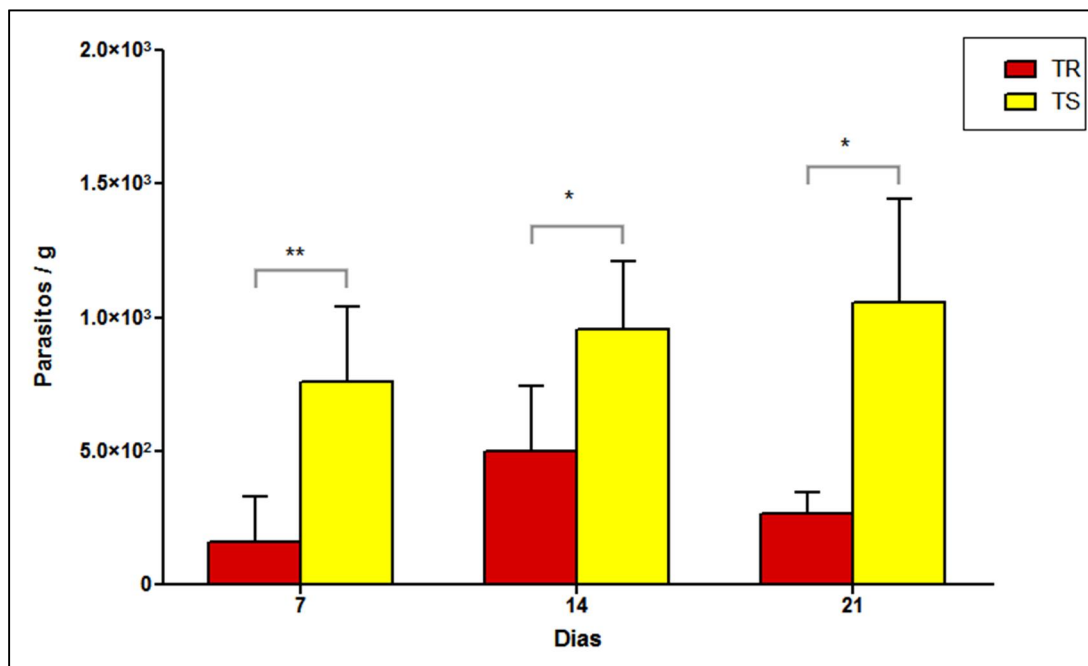


Figura 8 - Quantificação de parasitos por qPCR, no íleo de camundongos TR e TS após infecção por gavagem com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. Valores expressos em parasitos/g de tecido. Diferença estatística entre os dados indicada por \* ( $P < 0,05$ ) e \*\* ( $P < 0,01$ ).

### 4.3 Análise histopatológica do íleo

A Figura 9 mostra os camundongos usados como controle para a avaliação de alterações histopatológicas no intestino.

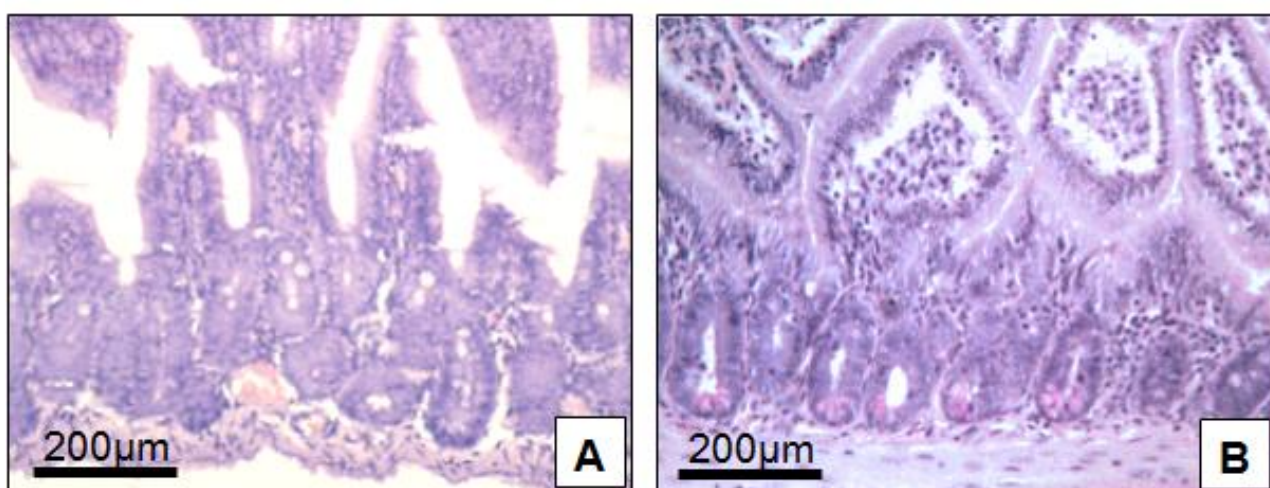


Figura 9 - Aspecto histológico do íleo de camundongos TR e TS não infectados. (A) camundongo TR.; (B) camundongo TS. Em ambas as imagens, a estrutura dos vilos se mostra conservada, sem infiltrados ou outras alterações histológicas. Coloração por H&E.

A análise histopatológica do intestino dos animais infectados após 7 dias mostrou uma necrose severa da área dos vilos nos camundongos TR, com grande perda da arquitetura normal dos vilos e das criptas, assim como uma grande quantidade de infiltrado linfóide na lamina própria (Figura 10A). Nos camundongos TS, no mesmo tempo de infecção, não se observou perda de arquitetura ou infiltração na lamina propria. A única alteração notada foi a presença de amiloidose focal (Figura 10B).

No 14º dia de infecção, observou-se uma melhora no quadro de necrose intestinal nos camundongos TR. A região apical dos vilos ainda se apresentava bastante danificada, porém a região das criptas já exibia sinais de melhora. Não foi possível observar o infiltrado linfóide, apenas alguns pontos de amiloidose (Figura 10C). O quadro geral dos camundongos TS durante esse período diferiu muito pouco do observado aos 7 dias, ou seja, exibiram arquitetura preservada tanto dos vilos quanto das criptas, sem infiltrado linfóide (Figura 10D).

Vinte e um dias após a infecção, a análise histopatológica do íleo mostrou que os camundongos TR apresentaram uma recuperação quase completa da arquitetura intestinal característica, apenas demonstrando uma leve necrose apical nas vilosidades e presença de grânulos de amilóide esparsos (Figura 10E). Os camundongos TS passaram a exibir um discreto aumento de celularidade na camada muscular, porém sem alteração na estrutura geral dos vilos e criptas (Figura 10F).

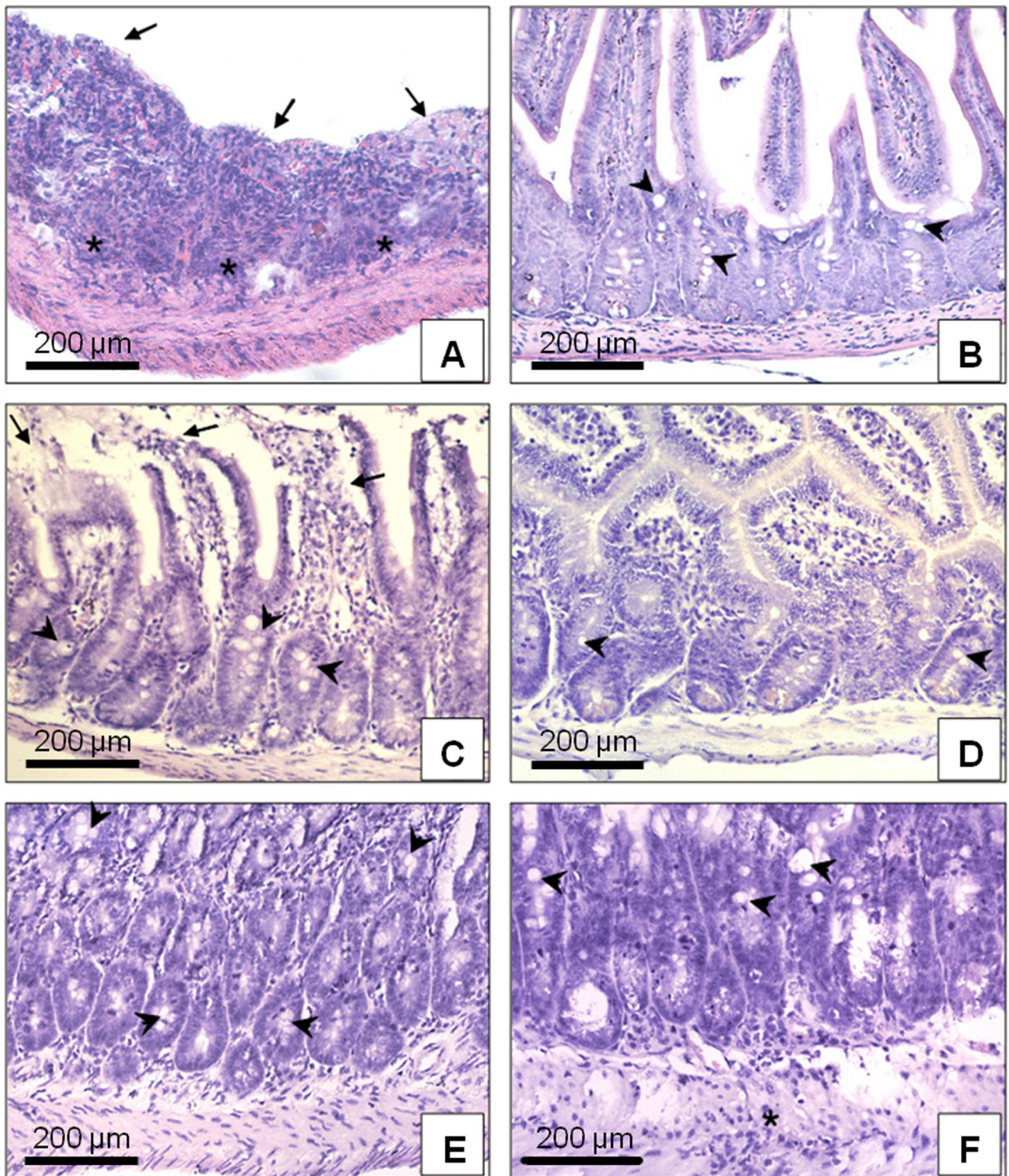


Figura 10 - Aspectos histopatológicos do íleo de camundongos TR e TS após infecção com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. (A) camundongo TR, 7 dias de infecção. Infiltrado linfóide nos vilos e na lâmina própria (asterisco), intensa necrose dos vilos e das criptas, com perda de integridade estrutural em ambos (setas); (B) camundongo TS, 7 dias de infecção. Estrutura dos vilos preservada, livre de necrose ou infiltrados de células linfóides. Presença de grânulos de amilóide distribuídos de maneira esparsa (cabeça de seta); (C) camundongo TR, 14 dias de infecção. Áreas de necrose restritas à porção luminal das vilosidades (setas), sem a presença de infiltrados linfóides. Focos ocasionais de amiloidose podem ser observados (cabeça de seta); (D) camundongo TS, 14 dias de infecção. Íleo íntegro, sem presença de necrose ou infiltrados linfóides. Presença ocasional de amiloidose (cabeças de seta); (E) camundongo TR, 21 dias após infecção. Criptas normais, sem presença de infiltração de células linfóides. Necrose leve restrita à região apical, amiloidose ocasional (cabeça de seta); (F) camundongo TS, 21 após a infecção. Vilosidades de aparência normal, presença de infiltrado linfóide na camada muscular (asterisco) e amiloidose (cabeça de seta). Coloração por H&E.

#### 4.4 Análise histopatológica do fígado

Na Figura 11, estão representados os camundongos controle usados para a avaliação de alterações histopatológicas no intestino.

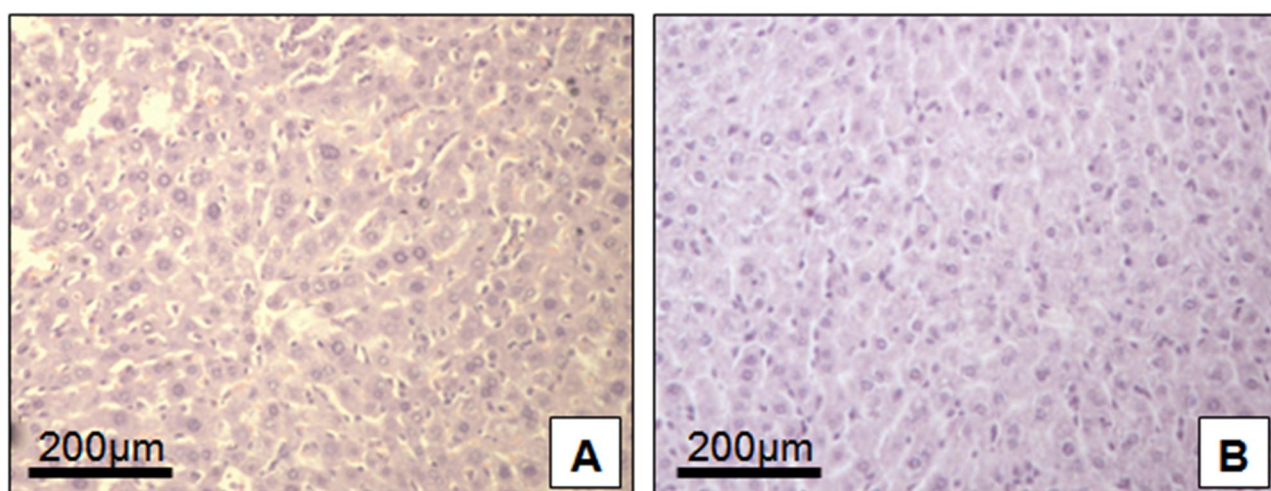


Figura 11 - Aspecto histológico do fígado de camundongos TR e TS não infectados. (A) camundongo TR.; (B) camundongo TS. Em ambas as imagens, não há presença de granulomas, tumefação ou degeneração gordurosa. Coloração por H&E.

O fígado dos camundongos TR mostrou-se aumentado e de coloração mais pálida em relação ao fígado dos camundongos controle não-infectados aos 7 e 14 dias após a infecção, sugerindo que houve acúmulo de gordura no fígado desses camundongos. Além disso, aos 7 dias de infecção, os camundongos TR apresentaram alguns granulomas, de densidade moderada, distribuídos pelo tecido. Também foi possível notar a presença de áreas extensas de tumefação turva, associadas a focos de degeneração gordurosa (Figura 12A).

A tumefação turva pode ser diferenciada da degeneração gordurosa pelo tamanho dos vacúolos presentes em cada uma das condições: na tumefação turva são pequenos e numerosos, contendo água, enquanto na degeneração gordurosa, são pouco numerosos e preenchidos por lipídios. Nesse mesmo tempo de infecção, nenhuma alteração foi observada nos camundongos TS, os quais mantiveram a integridade do tecido hepático (Figura 12B).

No 14º dia da infecção, as áreas de tumefação turva e os focos de degeneração gordurosa permaneceram no fígado dos animais TR, porém os granulomas exibidos anteriormente não foram observados (Figura 12C). Os camundongos TS passaram a apresentar áreas de tumefação turva leve ao longo do tecido (Figura 12D).

Após 21 dias de infecção percebeu-se que o fígado dos camundongos TR estava recuperado, notando-se apenas a presença focal de tumefação turva (Figura 12E). Já os camundongos TS mostraram um agravamento no processo de tumefação, passando a exibir grandes áreas de degeneração gordurosa ao longo do fígado (Figura 12F).



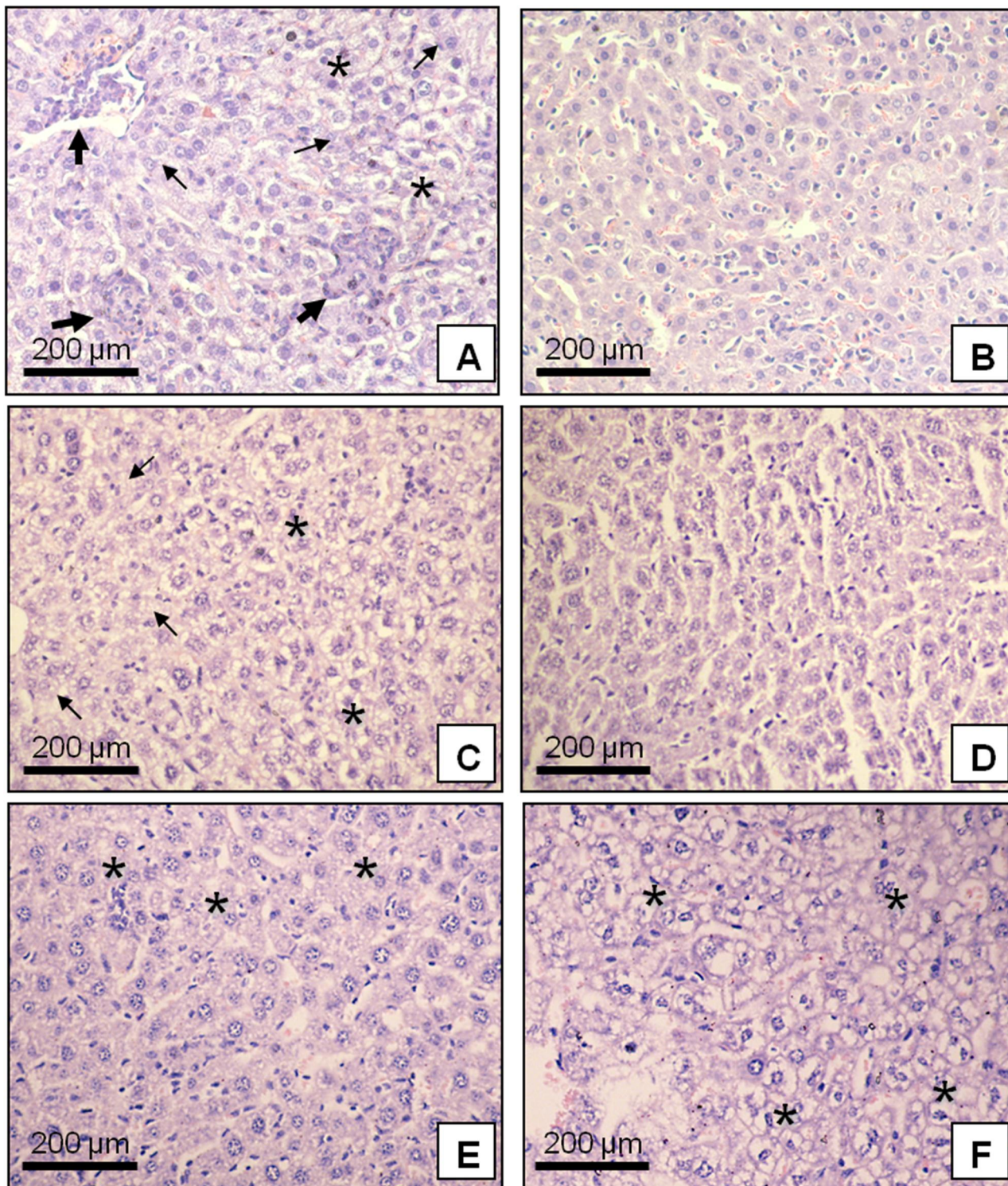


Figura 12 - Histologia do fígado de camundongos TR e TS, aos 7, 14 e 21 dias de infecção com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. (A) camundongo TR, 7 dias de infecção. É possível observar granulomas ao longo do fígado (seta larga), bem como áreas de tumefação turva (seta fina) associadas à áreas de degeneração gordurosa (asterisco). (B) camundongo TS, 7 dias de infecção. Não é possível observar alterações no fígado do camundongo. (C) camundongo TR, 14 dias de infecção. Permanência das áreas de tumefação (seta fina) próximas à zonas de degeneração gordurosa (asterisco). (D) camundongo TS, 14 dias após a infecção. Presença de tumefação discreta ao longo do fígado. (E) camundongo TR, 21 dias de infecção. Regressão da degeneração gordurosa, passando a exibir apenas focos de tumefação turva discreta (asterisco). (F) camundongo TS, 21 dias de infecção. É possível observar grandes áreas de degeneração gordurosa (asterisco) ao longo de todo o tecido hepático nesses camundongos. Coloração por H&E.

#### 4.5 Análise histopatológica do baço

A Figura 13 mostra os camundongos usados como controle para a avaliação de alterações histopatológicas no baço.

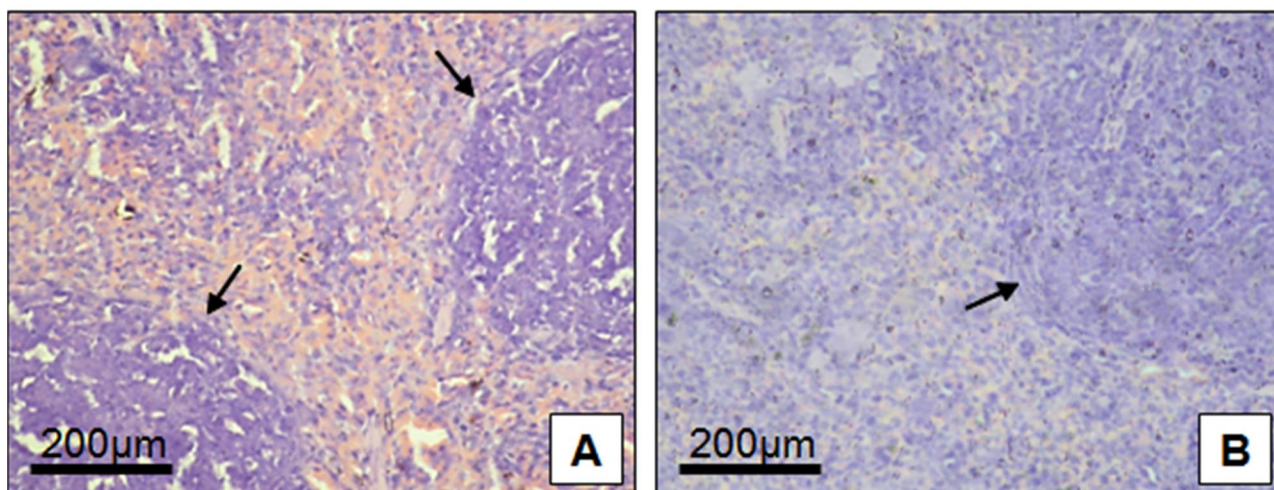


Figura 13 - Aspecto histológico do baço de camundongos TR e TS não infectados. (A) camundongo TR.; (B) camundongo TS. Em ambas as imagens, pode-se observar os centros germinativos organizados e bem delimitados (setas). Coloração por H&E.

O baço dos camundongos TR mostrou uma hipertrofia persistente, durante os 21 dias de análise experimental, que sugere intensa atividade do órgão. Os camundongos TR apresentaram desorganização dos centros germinativos no 7º dia após a infecção, com ausência de delimitação (Figura 14A). Nos camundongos TS, a celularidade foi aparentemente menor, e os centros germinativos estavam mais claramente organizados e delimitados (Figura 14B).

Após 14 dias de infecção a desorganização dos centros germinativos nos camundongos TR foi intensa, com aparente aumento de celularidade (Figura 14C). Nos camundongos TS, foi possível observar também um aumento da celularidade do órgão, sem delimitação dos centros germinativos (Figura 14D). Vinte e um dias após a infecção, os camundongos TR mostraram uma recuperação na organização dos centros germinativos, apesar do aumento de celularidade ainda estar presente (Figura 14E). Nos camundongos TS, por outro lado, os centros germinativos ainda se mantiveram desorganizados, com intensa hiperplasia (Figura 14F).

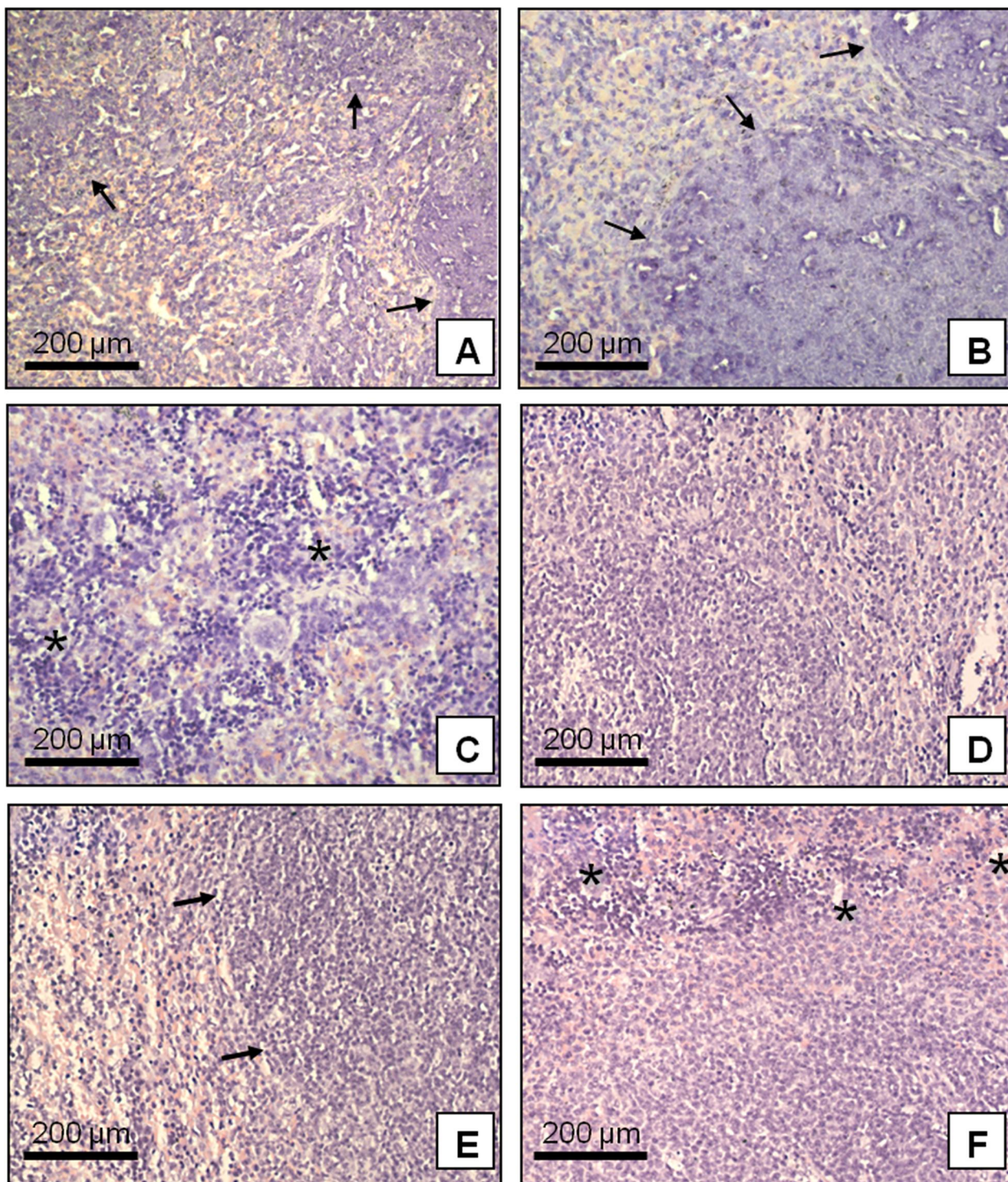


Figura 14 - Aspectos histopatológicos do baço de camundongos TR e TS, aos 7, 14 e 21 dias de infecção com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. (A) camundongo TR, 7 dias de infecção. Centros germinativos mostraram desorganização moderada (setas); (B) camundongo TS, 7 dias após a infecção, mostrando organização dos centros germinativos (setas), e celularidade aparentemente menor; (C) camundongo TR, após 14 dias de infecção nota-se aumento do número de células e desorganização dos centros germinativos (asterisco); (D) camundongo TS, 14 dias de infecção mostrando hiperplasia linfóide pronunciada, dificultando a delimitação dos centros germinativos; (E) camundongo TR, 21 dias após a infecção, observa-se a reorganização dos centros germinativos (setas), apesar do aumento da celularidade ainda estar presente; (F) camundongo TS, 21 dias de infecção ainda mostram hiperplasia e desorganização dos centros germinativos. Coloração por H&E.

## 4.6 Avaliação dos níveis sistêmicos e teciduais de citocinas

### 4.6.1 Níveis de IL-6

Os níveis séricos de IL-6 nos camundongos TR mostraram pouca variação ao longo dos 21 dias de infecção. Os níveis observados nos camundongos TS, ao contrário, apresentaram um aumento gradual ao longo dos pontos observados. Comparativamente, os níveis de IL-6 foram considerados estatisticamente maiores nos camundongos TS aos 14 e 21 dias da infecção, quando comparados aos TR (Figura 15). Os valores de IL-6 dos animais controle estavam dentro da normalidade.

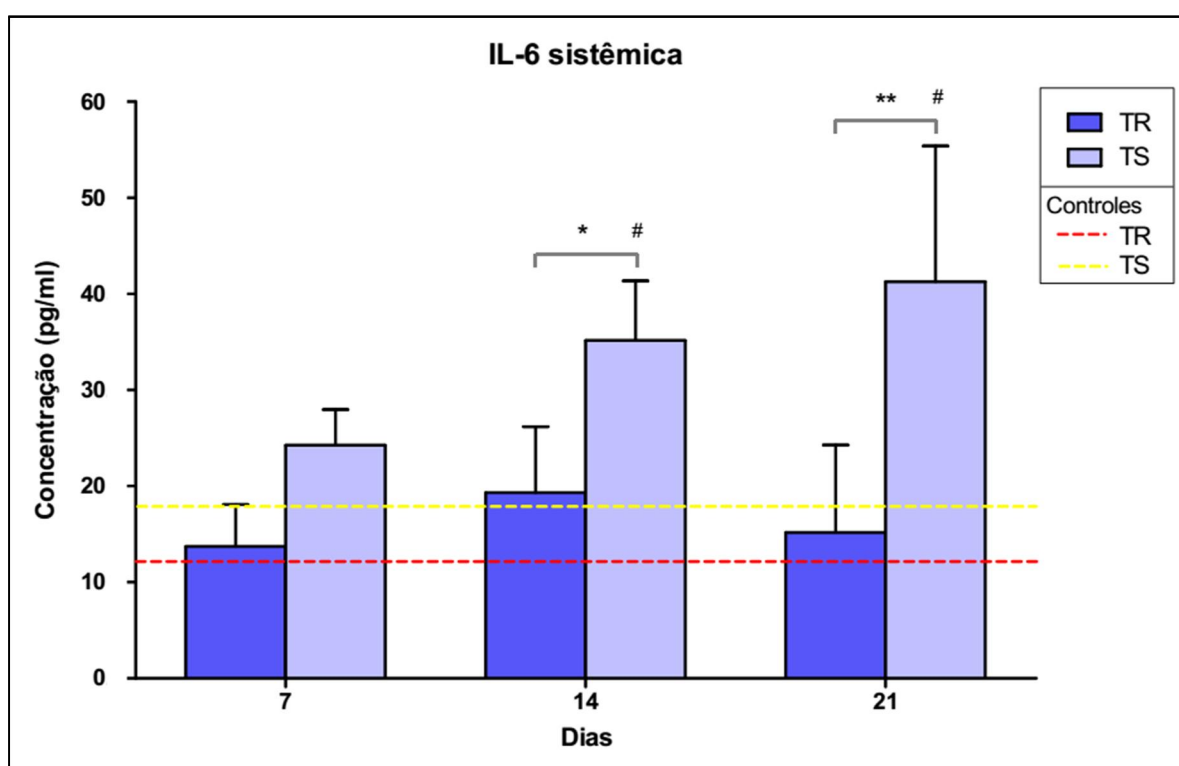


Figura 15 - Concentração sérica de IL-6 nos camundongos TR e TS infectados com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \* (P<0,05) e \*\* (P<0,01) e entre animais experimentais e controles por # (P<0,05). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

O nível de IL-6 no intestino dos camundongos TS se mostrou mais elevado no 7º dia de infecção, caindo para níveis normais no 14º dia de infecção. No baço dos camundongos da mesma linhagem, o aumento observado no 7º dia foi menos pronunciado, estando bastante próximo aos valores dos controles. Nos camundongos TR, a quantidade de IL-6 no intestino se mostrou um pouco elevada em relação aos controles, de maneira semelhante ao observado no baço para essas linhagens. A diferença de produção entre esta citocina só foi estatisticamente significativa no intestino, após 7 dias da infecção oral com *T. gondii* (Figura 16).

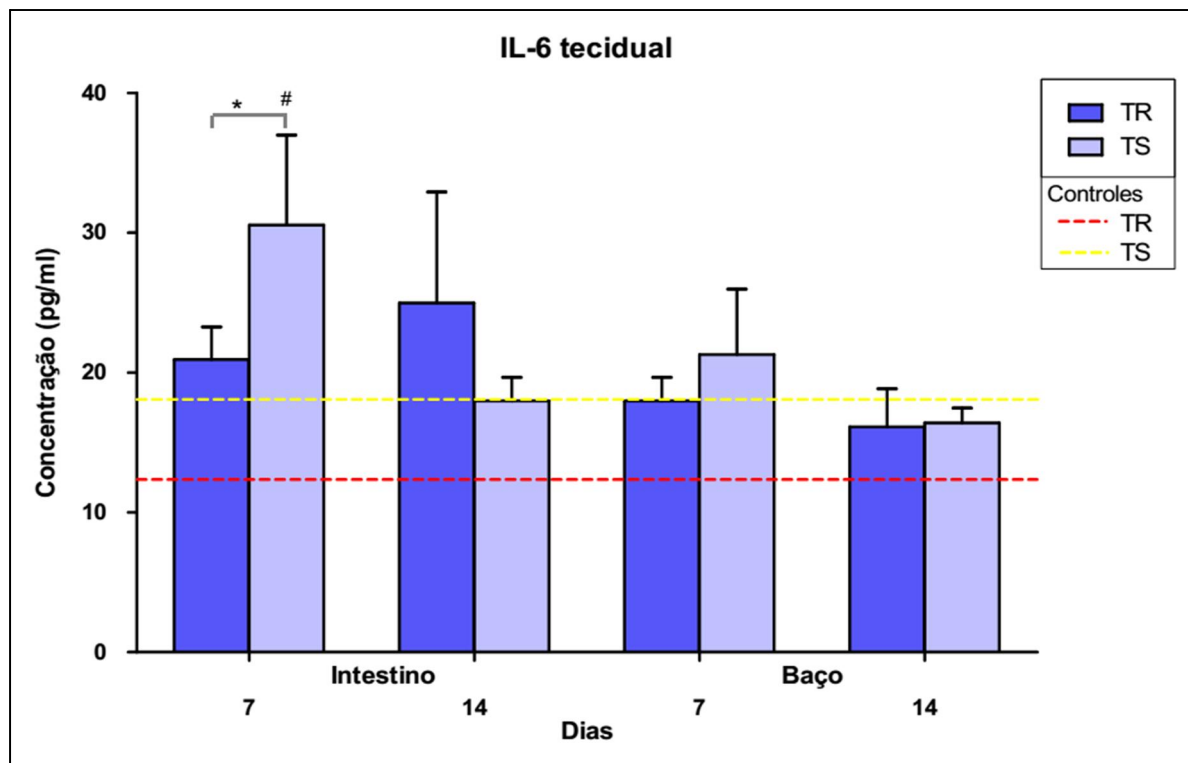


Figura 16 - Concentração de IL-6 no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \* ( $P < 0,05$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.2 Níveis de IL-10

Os camundongos TR não apresentaram variação acentuada de IL-10 em nenhum dos dias analisados, permanecendo os valores próximos aos observados no grupo de camundongos controle, não-infectados. Os camundongos TS, de maneira semelhante ao observado para os níveis séricos de IL-6, apresentam uma tendência de elevação da quantidade de IL-10, à medida que a infecção se tornava crônica (Figura 17). Apenas no 21º dia de infecção notou-se a diferença, estatisticamente significativa, nos níveis de IL-10 entre os camundongos TS e TR ( $P < 0,01$ ).

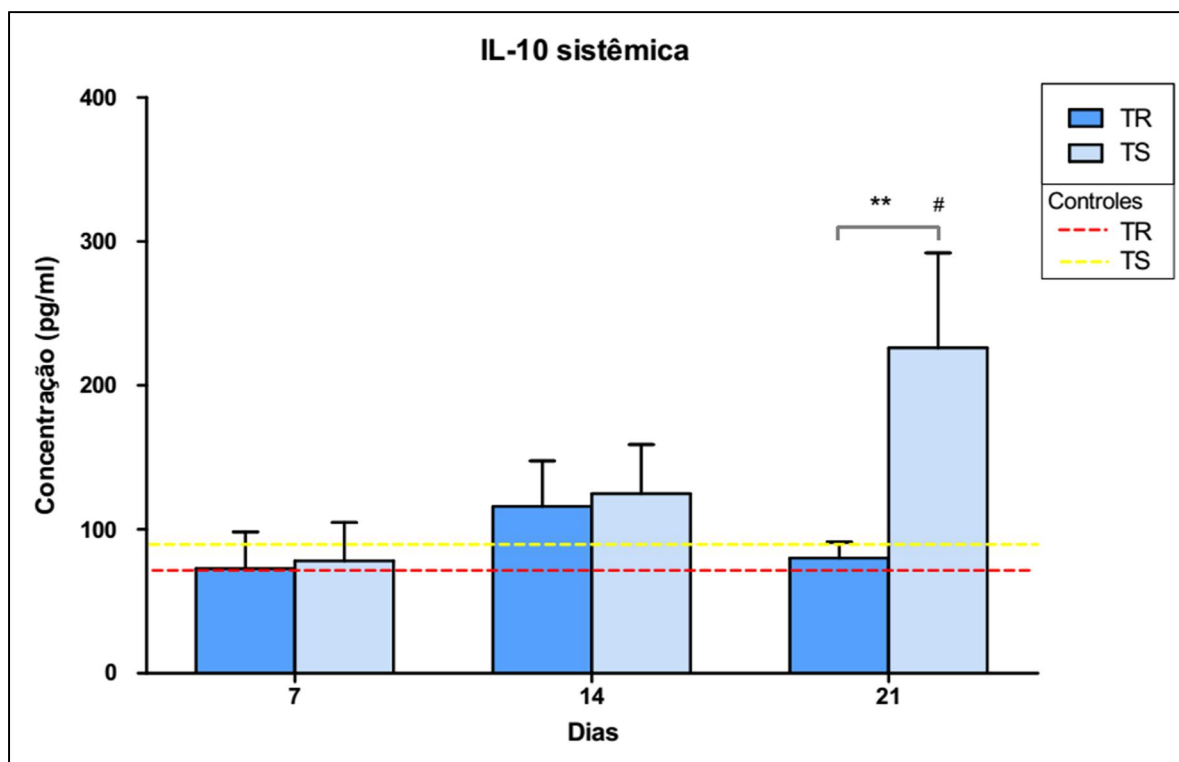


Figura 17 - Concentração sérica de IL-10 no soro de camundongos TR e TS infectados com 50 cistos de ME-49 por gavagem. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P < 0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

No intestino, os níveis de IL-10 dos camundongos TR não mostraram variação ao longo da infecção, permanecendo acima dos valores considerados normais; porém, observou-se nos camundongos TS, no 7º dia de infecção, que a quantidade de IL-10 foi significativamente maior que a encontrada nos camundongos TR. Essa quantidade caiu no 14º dia da infecção, atingindo um patamar semelhante ao dos camundongos TR. A quantificação de IL-10 no baço de ambas as linhagens não mostrou diferença significativa, independente do tempo de infecção. (Figura 18).

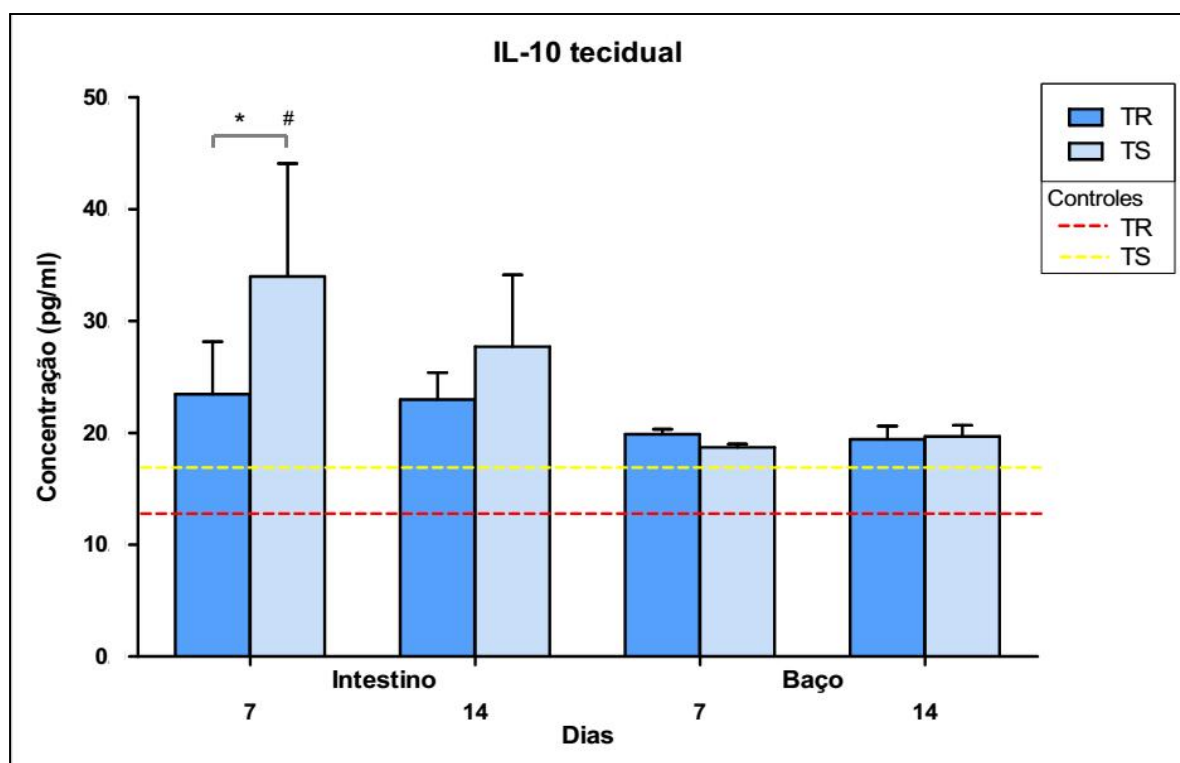


Figura 18 - Concentração de IL-10 no baço e fígado de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \* ( $P < 0,05$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

### 4.6.3 Níveis de MCP-1

A quantidade de MCP-1 sistêmica observada nos camundongos TR e TS, no 7º dia após a infecção por *T. gondii*, não apresentou diferença significativa entre as duas linhagens, apesar de estar acima dos valores observados no grupo controle. No 14º dia, os camundongos TR apresentaram valores baixos de MCP-1, em contraste com os camundongos TS, que exibiram valores elevados desta citocina (Figura 19). No 21º dia os camundongos TR mantiveram a baixa produção de MCP-1 sistêmica, enquanto os camundongos TS apresentaram uma queda acentuada na produção e passaram a exibir valores bastante próximos aos constatados nos animais do grupo controle.

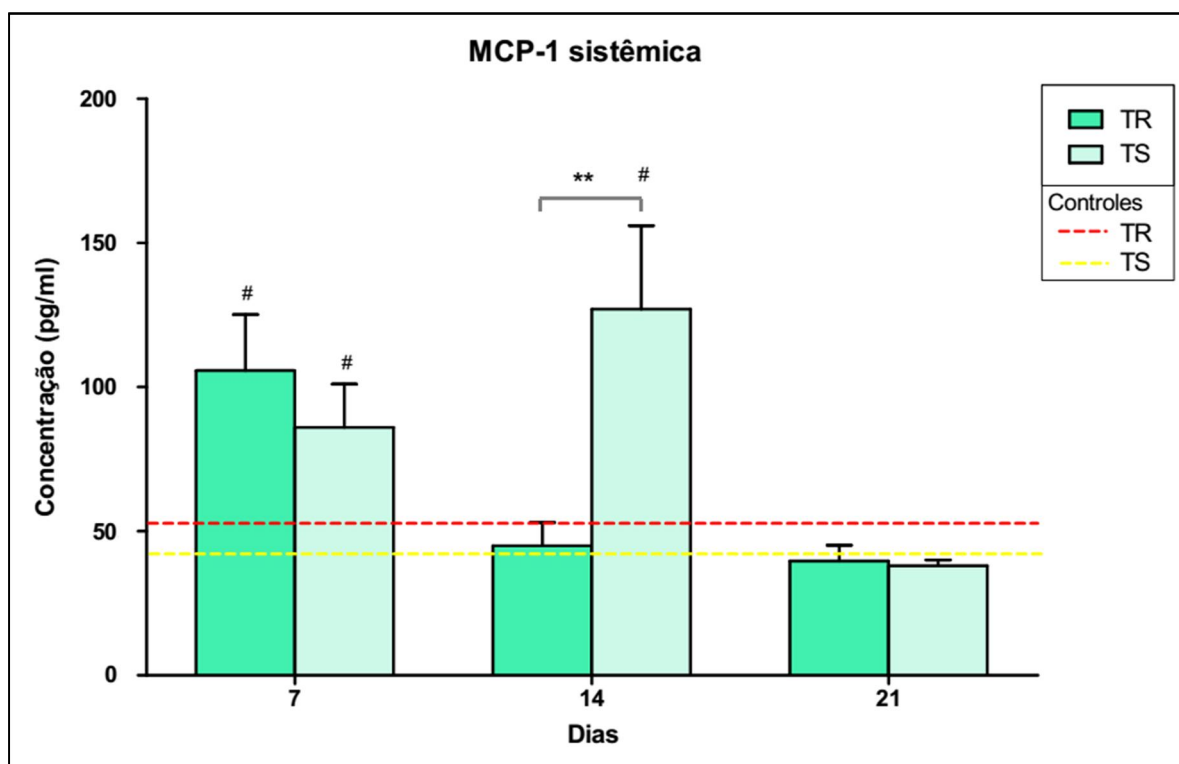


Figura 19 - Concentração de MCP-1 de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P < 0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.



A análise dos intestinos dos camundongos TR, aos 7 dias de infecção, mostrou uma quantidade elevada de MCP-1 significativamente maior que a observada nos camundongos TS. No 14º dia, porém, os níveis de MCP-1 intestinal foram reduzidos para valores basais em ambas as linhagens (Figura 20).

A concentração de MCP-1 no baço dos camundongos TS e TR mostrou-se muito próxima quando comparamos ambas linhagens nos mesmo tempo de infecção. Quando comparamos a concentração no 7º dia de infecção com o 14º dia, porém, podemos perceber uma tendência discreta de queda na concentração desta citocina para ambas as linhagens (Figura 20).

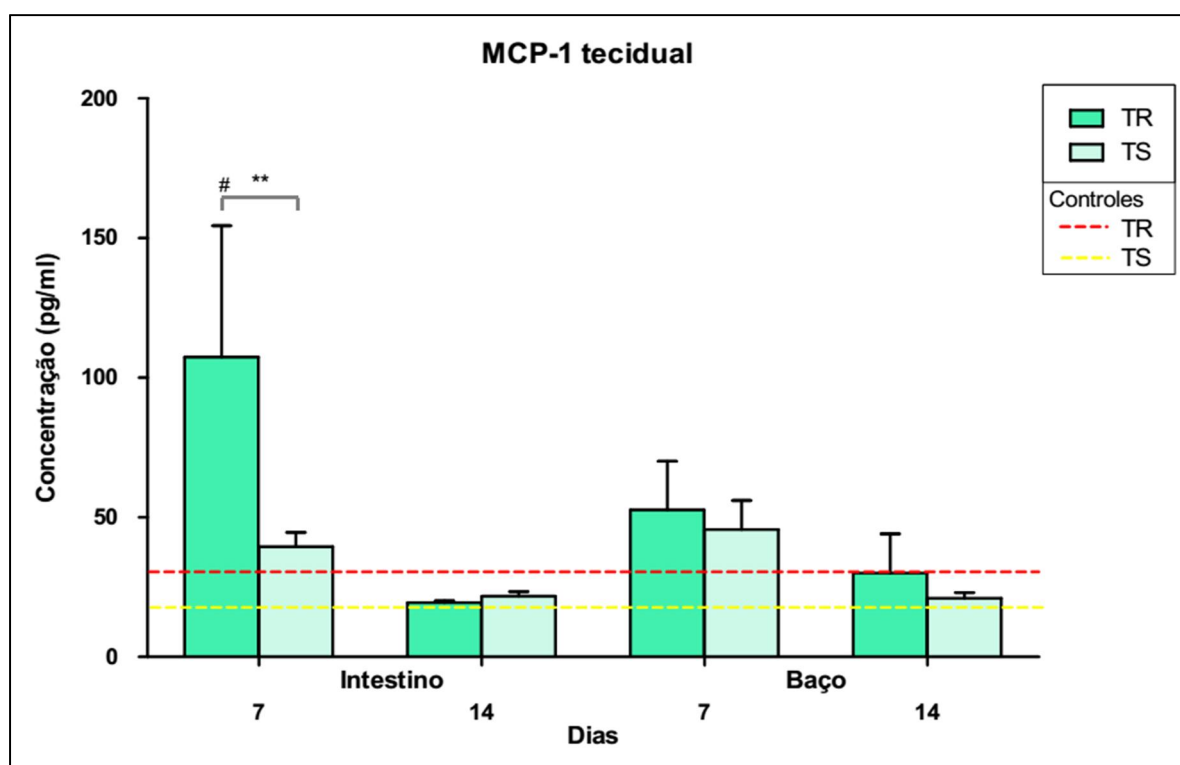


Figura 20 - Concentração de MCP-1 no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P<0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P<0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.4 Níveis de IFN- $\gamma$

A quantificação de IFN- $\gamma$  no soro dos camundongos de ambas as linhagens, aos 7 dias de infecção, mostrou níveis bastante altos desta citocina. Nos camundongos TR, porém, a quantidade de IFN- $\gamma$  detectada foi maior que nos camundongos TS, alcançando média de aproximadamente 800 pg/ml, com um máximo de 900 pg/ml (Figura 21).

A produção de IFN- $\gamma$  apresentou redução aos 14 dias de infecção, alcançando cerca de 100 pg/ml em ambas as linhagens. Porém, no 21º dia de infecção, os camundongos da linhagem TR mantiveram o mesmo nível de IFN- $\gamma$  observado anteriormente, enquanto nos camundongos TS esses níveis mostraram-se ainda mais reduzidos, chegando a valores próximos aos determinados nos animais do grupo controle (Figura 21).

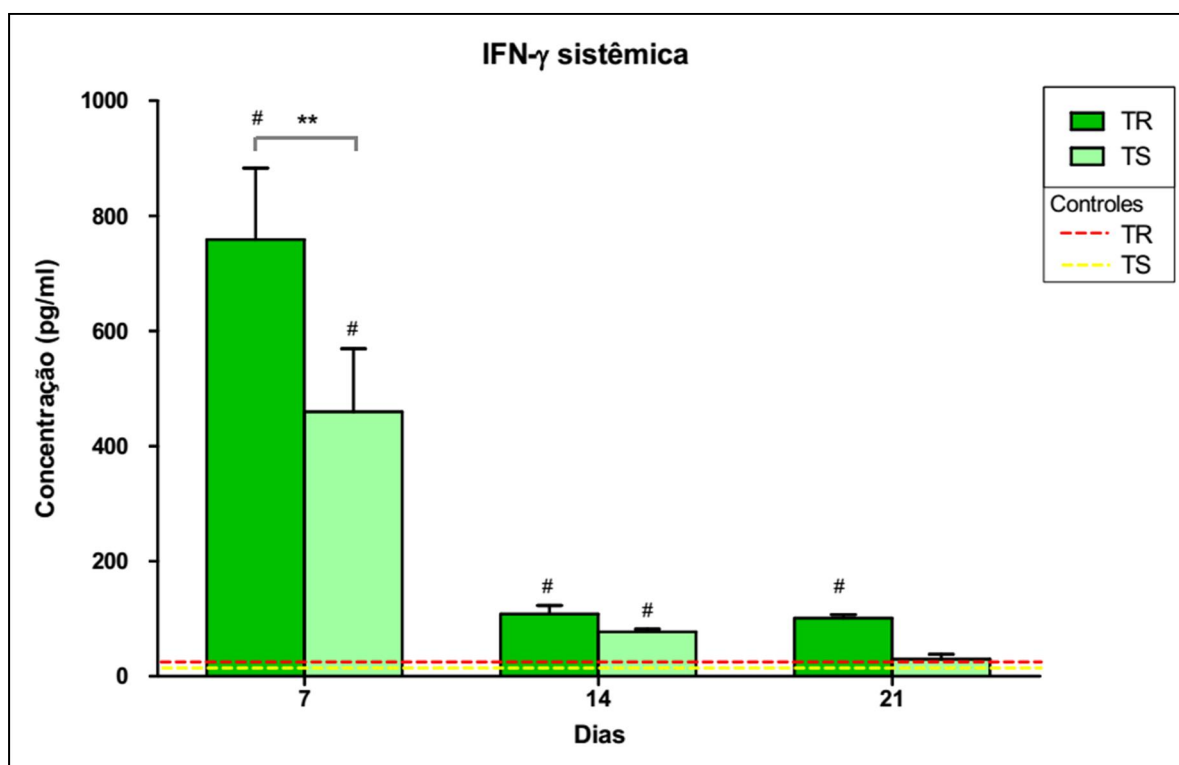


Figura 21 - Concentração de IFN- $\gamma$  no soro de camundongos TR e TS infectados por gavage com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P < 0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

No intestino, a quantidade de IFN- $\gamma$  se mostrou igualmente elevada no 7º dia de infecção, tanto nos camundongos TR quanto nos camundongos TS, alcançando uma média de cerca de 200 pg/ml. Essa quantidade diminuiu, no 14º dia após a infecção, para níveis próximos aos observados em camundongos do grupo controle, em ambas as linhagens (Figura 22).

Quando a IFN- $\gamma$  foi quantificada no baço dos camundongos, foi possível observar que os camundongos TR possuem uma produção elevada desta citocina aos 7 dias de infecção, alcançando mais de 1.500 pg/ml em média, podendo chegar a um máximo de 2.000 pg/ml. Esta quantidade é mais que o dobro da observada para os camundongos TS no mesmo período de tempo (média de 700 pg/ml). Após 14 dias de infecção, a quantidade de IFN- $\gamma$  em ambas as linhagens diminuiu, porém os camundongos TR mantiveram uma quantidade quase duas vezes superior à observada nos camundongos TS (Figura 22).

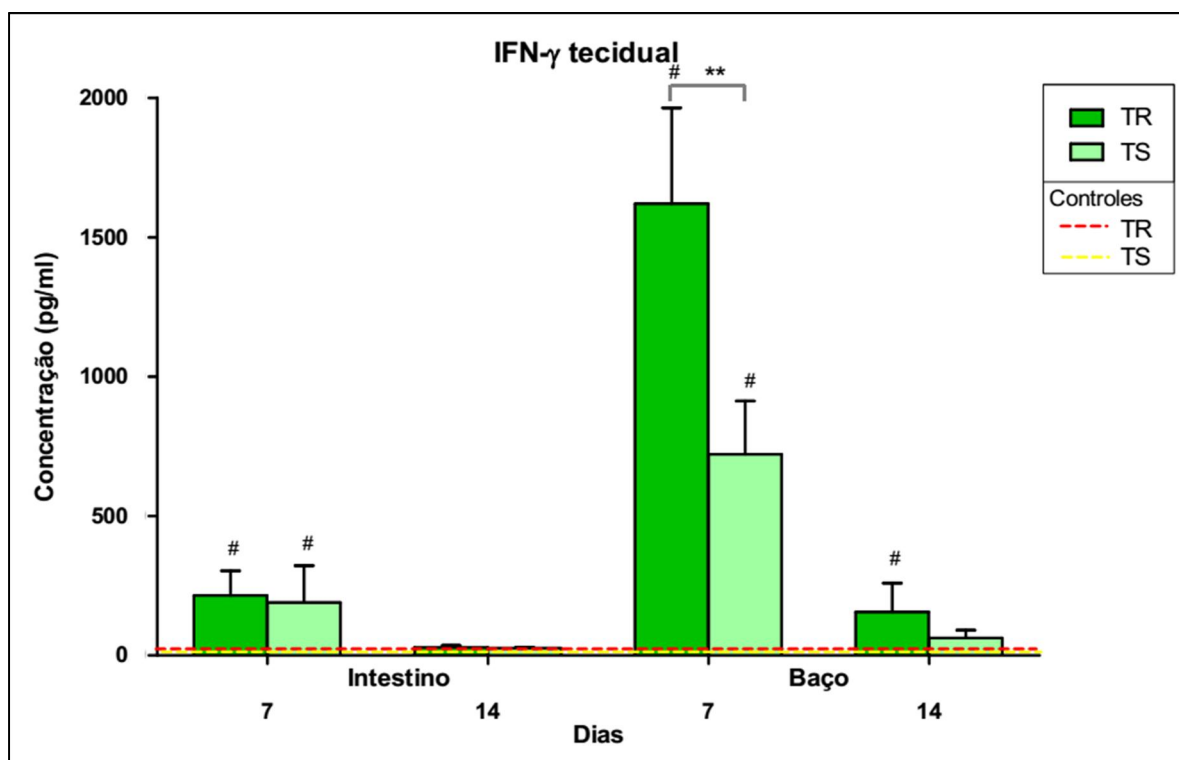


Figura 22 - Concentração de IFN- $\gamma$  no intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavage com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P < 0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.5 Níveis de TNF- $\alpha$

Os níveis de TNF- $\alpha$  no soro dos camundongos TR apresentou um pico de produção aos 7 dias de infecção. Esse nível decresceu aos 14 dias, e novamente aos 21 dias, alcançando um valor cerca de duas vezes superior ao apresentado em camundongos do grupo controle. Os camundongos TS apresentaram valores significativamente menores que os camundongos TR no 7º dia após a infecção, mantendo um nível semelhante aos 14 dias, e reduzindo para valores próximos aos normais no 21º dia (Figura 23).

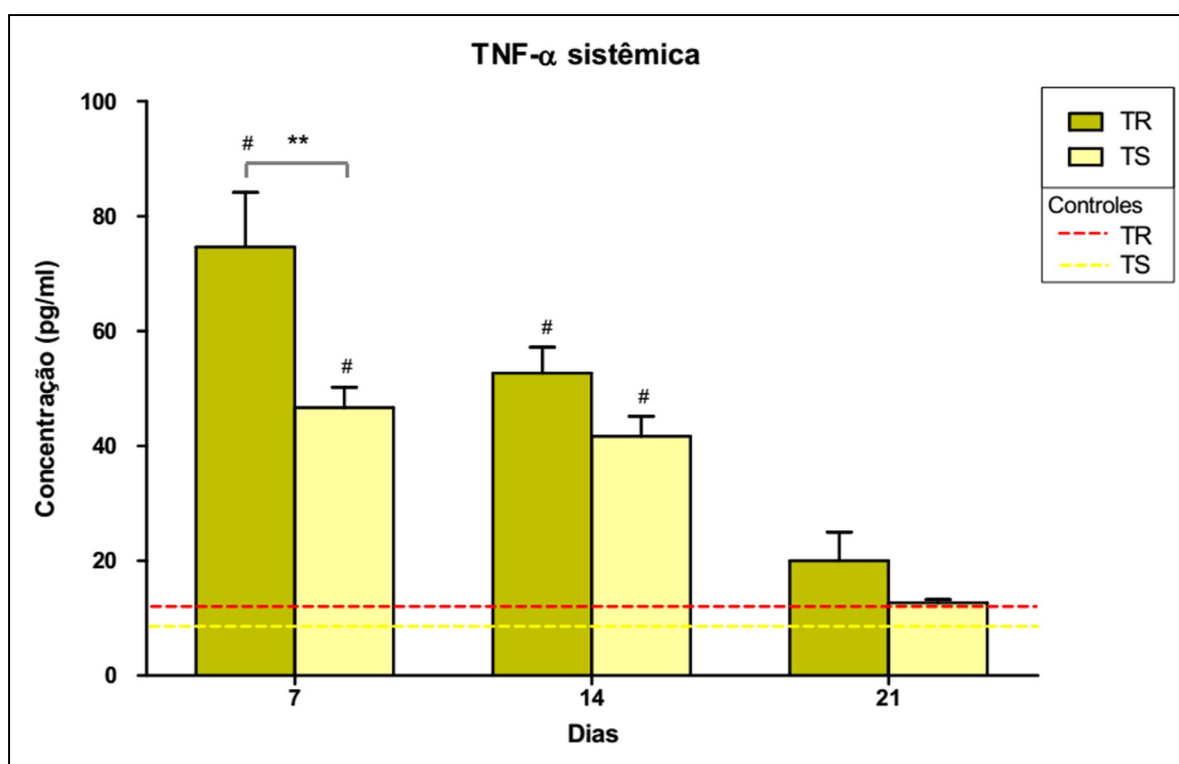


Figura 23 - Quantificação de TNF- $\alpha$  no soro de camundongos TR e TS infectados por gavage com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* (P<0,01) e entre animais experimentais e controles por # (P<0,05). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

A quantidade de TNF- $\alpha$  produzida no íleo dos camundongos TR não apresentou variação durante a infecção, permanecendo elevada quando comparada com os camundongos dos grupos controle. Nos camundongos TS, mostrou-se inicialmente elevada, cerca de três vezes maior que a observada nos animais controle. No 14º dia de infecção esta quantidade de citocina foi reduzida a níveis similares as observadas nos animais TR. Porém, mesmo com a queda de produção, essa quantidade permaneceu elevada, atingindo cerca de duas vezes a produção normal (Figura 24).

No baço, a produção inicial de TNF- $\alpha$  (7 dias de infecção), em ambas as linhagens, foi elevada, com níveis similares. Aos 14 dias de infecção, a queda da produção também ocorreu de maneira praticamente idêntica à observada no intestino, porém a produção de TNF- $\alpha$  ainda permaneceu maior que a observada nos controles (Figura 24).

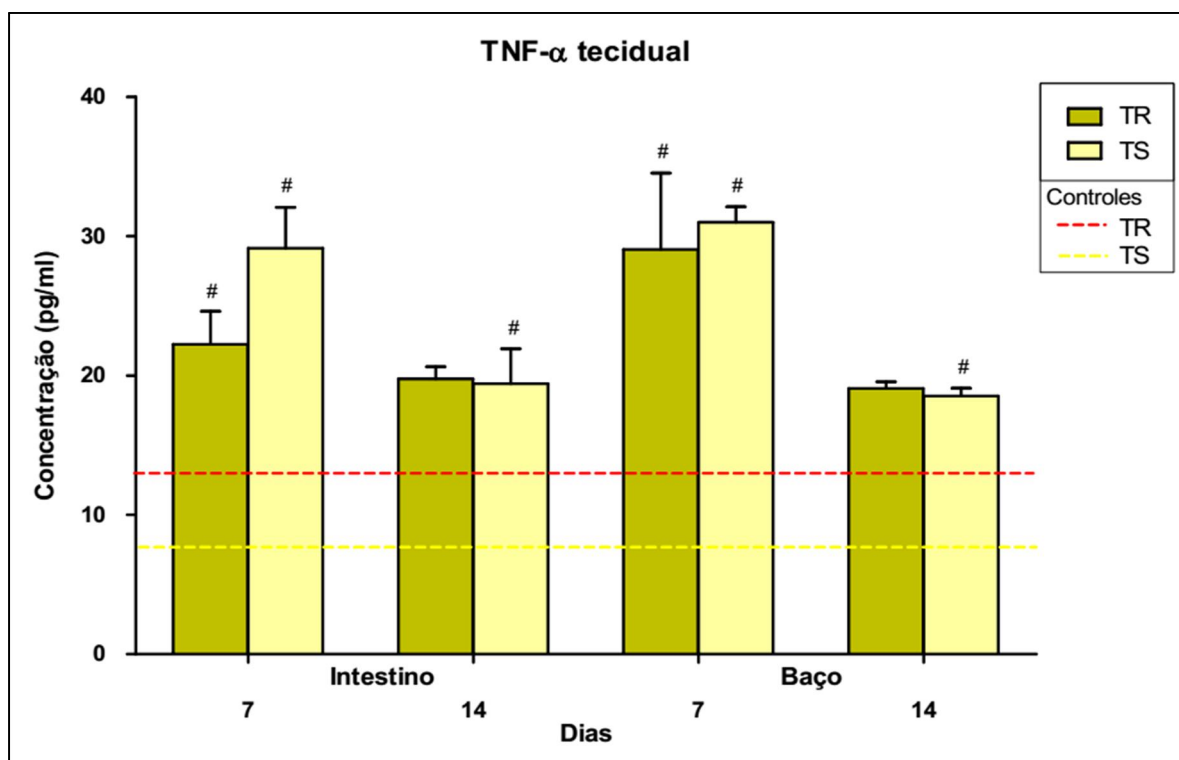


Figura 24 - Concentração de TNF- $\alpha$  do intestino e baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre animais experimentais e controles indicada por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.6 Níveis de IL12p70

A produção de IL12p70 observada em ambas as linhagens durante os tempos de infecção analisados mostrou uma produção levemente maior desta citocina nos camundongos TR, apesar de não ser estatisticamente significativa. Além disso, esta produção sempre esteve bastante próxima aos valores apresentados pelos camundongos dos grupos controle, em ambas as linhagens (Figura 25).

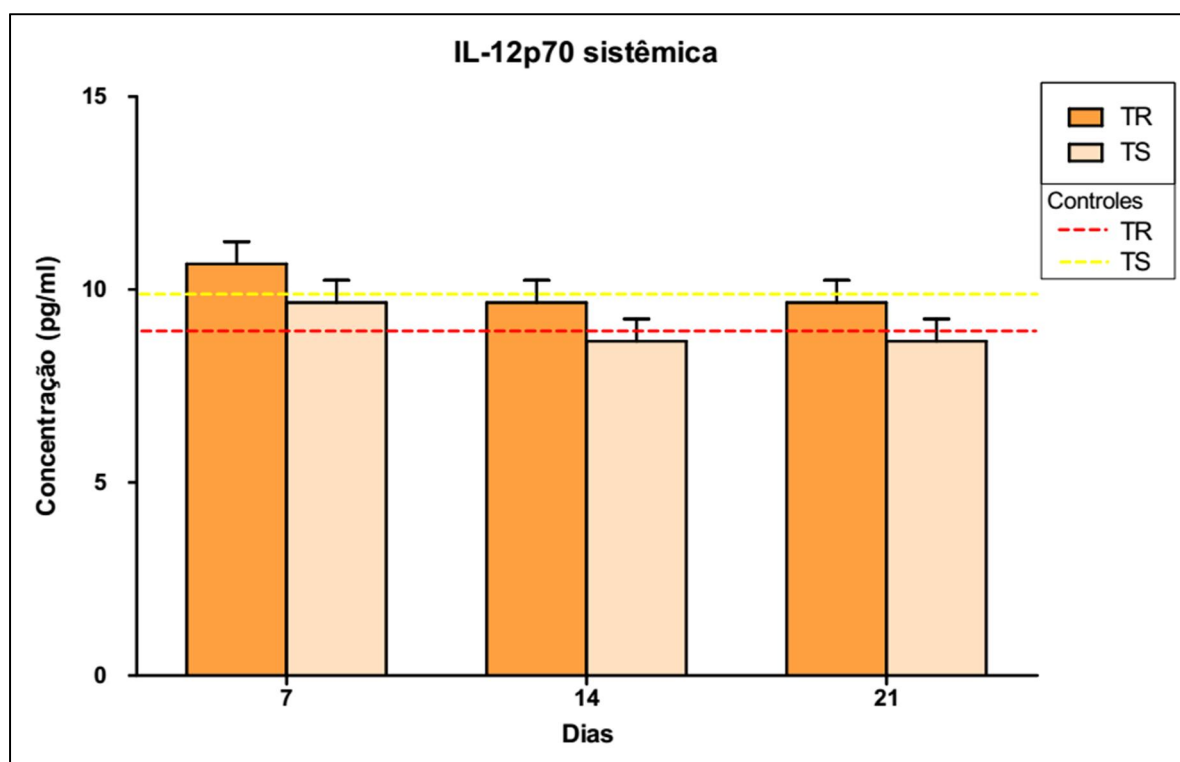


Figura 25 - Concentração de IL-12p70 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

A quantificação no intestino e no baço mostrou valores estatisticamente semelhantes entre as linhagens, aos 7 e 14 dias de infecção. No intestino, os valores foram ligeiramente maiores para os camundongos TS, enquanto no baço, o nível dessa citocina decresceu discretamente. Em relação à quantidade observada nos camundongos dos grupos controle, o nível de produção em ambas as linhagens, nos dois órgãos avaliados, se mostrou duas vezes superior ao normal (Figura 26).

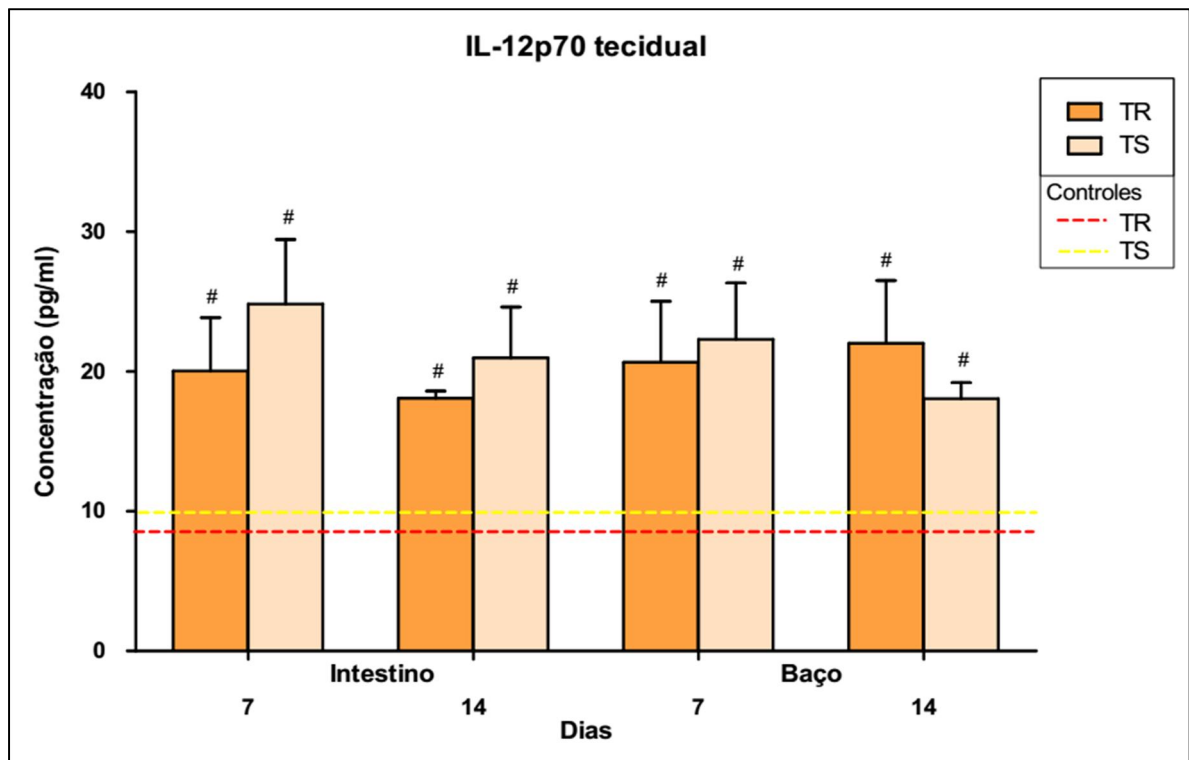


Figura 26 - Concentração de IL-12p70 no intestino e no baço de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de *T. gondii* ME-49. Diferença estatística entre animais experimentais e controles indicada por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.6.7 Níveis de IL-17, IL-4 e IL-2

A produção de IL-17 pelos camundongos TR permaneceu praticamente inalterada durante o tempo observado, sempre próximas à valores normais, inferidos dos camundongos controle.

Para os camundongos TS, a quantidade de produção da citocina também foi próxima aos níveis observados nos camundongos controle, porém essa quantidade aumentou levemente no 14º dia de infecção e novamente aos 21 dias após a infecção, apesar de, em ambos os casos, os valores encontrados não serem considerados estatisticamente diferentes dos apresentados pelos camundongos TR (Figura 27).

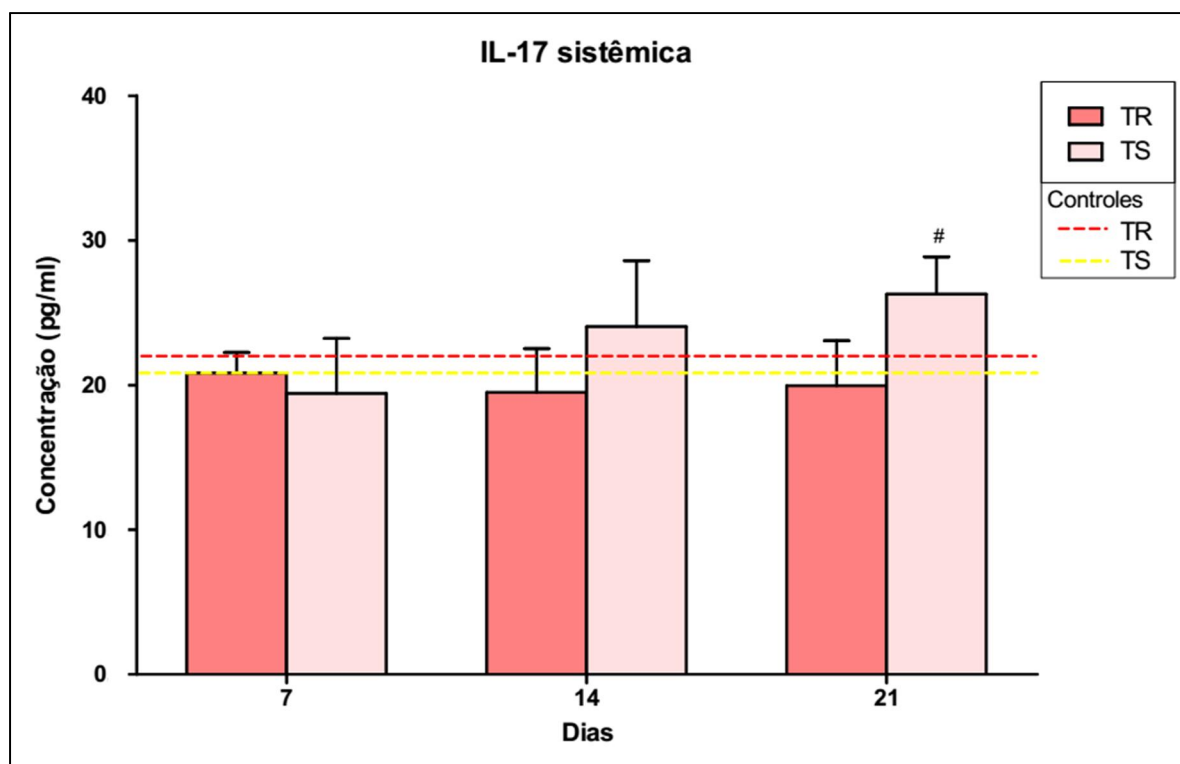


Figura 27 - Concentração de IL-17 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavage com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre animais experimentais e controles indicada por # ( $P < 0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.



A quantificação de IL-4 sistêmica mostrou níveis basais em ambas as linhagens após 7 dias da infecção oral, entretanto aos 14 dias após a infecção, a quantidade dessa citocina, mostrou-se acima do normal em ambas as linhagens. Aos 21 dias, houve uma queda na produção em ambas as linhagens, porém, a queda observada para os camundongos TR voltou aos níveis dos valores normais. Nos camundongos TS essa queda foi menos acentuada, com o níveis permanecendo discretamente acima do normal (Figura 28).

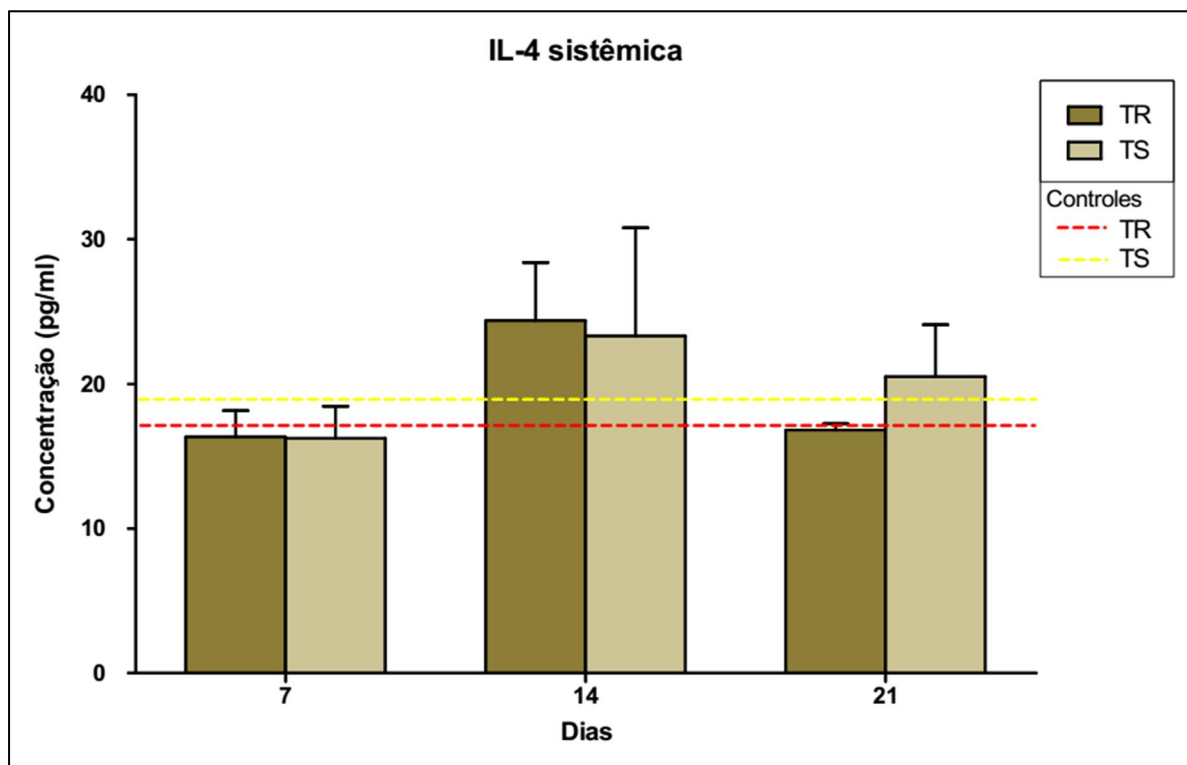


Figura 28 - Concentração de IL-4 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

A produção de IL-2 sistêmica para os camundongos TR, nos dias 7 e 14 após a infecção mostrou valores levemente elevados em relação aos valores normais. Aos 21 dias de infecção, a quantidade caiu para valores próximos aos obtidos nos animais do grupo controle. Para os camundongos TS, a produção inicial se mostrou menor que os valores normais, no 7º dia da infecção. A produção da IL-2 apresentou valores aumentados aos 14 dias de infecção, aproximando-se dos resultados observados nos camundongos TR. Houve um segundo aumento na produção desta citocina aos 21 dias de infecção atingindo o dobro da produção observada nos animais do grupo controle (Figura 29).

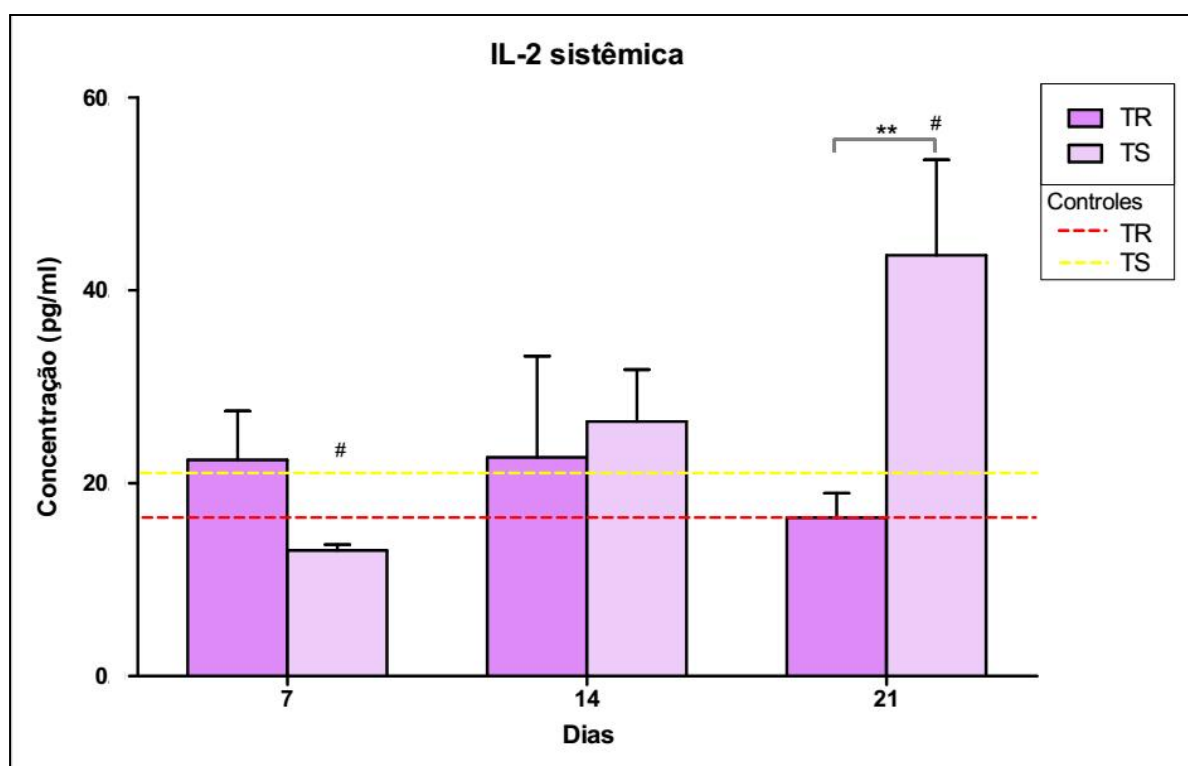


Figura 29 - Concentração de IL-2 no soro de camundongos TR e TS infectados por gavagem com 50 cistos de ME-49. Diferença estatística entre os grupos experimentais indicada por \*\* ( $P<0,01$ ) e entre animais experimentais e controles por # ( $P<0,05$ ). Valores representativos da média de 3 experimentos independentes.

#### 4.7 Imunohistoquímica para macrófagos e células dendríticas

A avaliação da região terminal do íleo para a presença de macrófagos aos 7 dias de infecção mostrou nos camundongos TR marcação positiva para F4/80, em geral na lâmina própria (Figura 30) e em alguns casos, também na base das criptas.

Nos camundongos TS, a presença de marcação positiva para F4/80 foi menos frequente que o observado nos camundongos TR. Quando esta marcação estava presente, sua fluorescência era menos intensa que nos camundongos TR. Além disso, as marcações positivas observadas nos TS se apresentavam mais distantes da lamina propria e mais próxima às criptas (Figura 30).

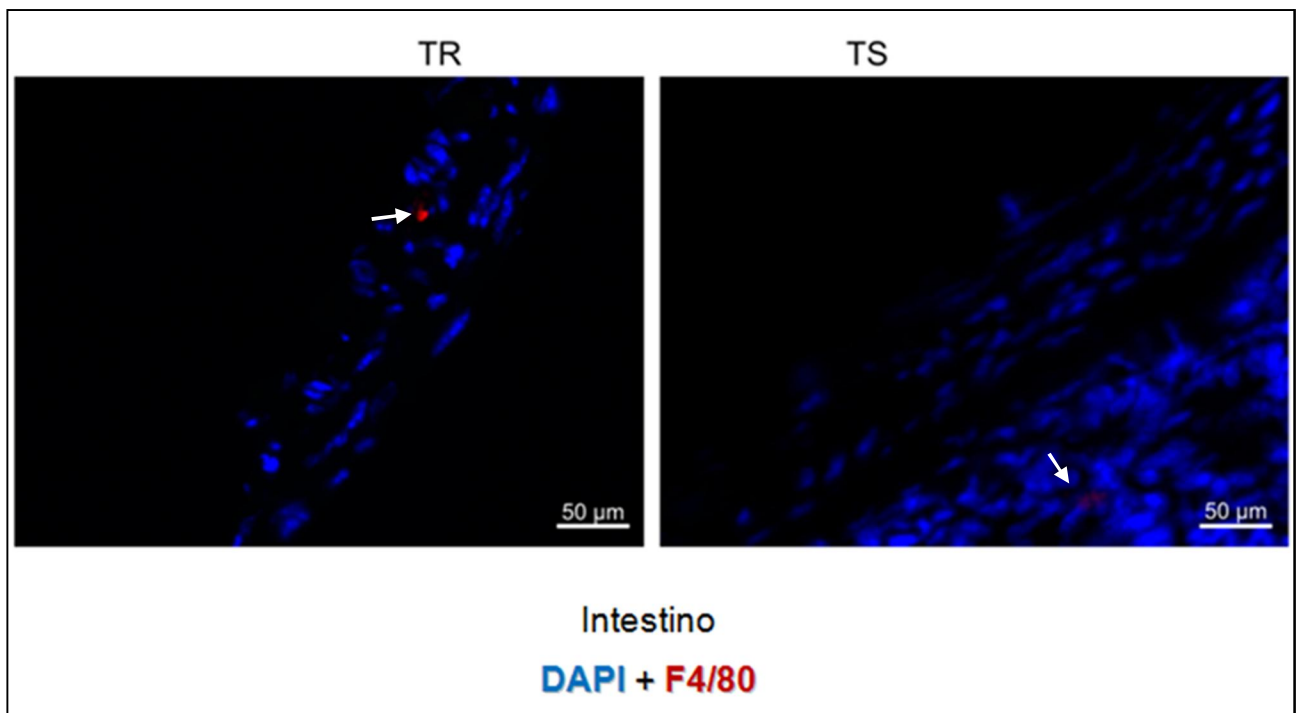


Figura 30 - Análise imunohistoquímica para observação de macrófagos (anti-F4/80 - vermelho) no intestino de camundongos TR e TS, 7 dias após infectados por gavagem com 100 cistos de ME-49. Macrófagos indicados por seta.

Ao analisar esse grupo aos 14 dias de infecção, foi possível observar a presença de marcação positiva para macrófagos na lâmina própria (Figura 31) e na região basal das vilosidades, e a quantidade de marcação se mostrou maior em algumas das lâminas observadas.

Para os camundongos TS, a marcação, quando presente, bem como sua localização, foi semelhante à observada no tempo anterior, ou seja, bem menos frequente, de fluorescência menos intensa e mais afastada da lâmina própria.

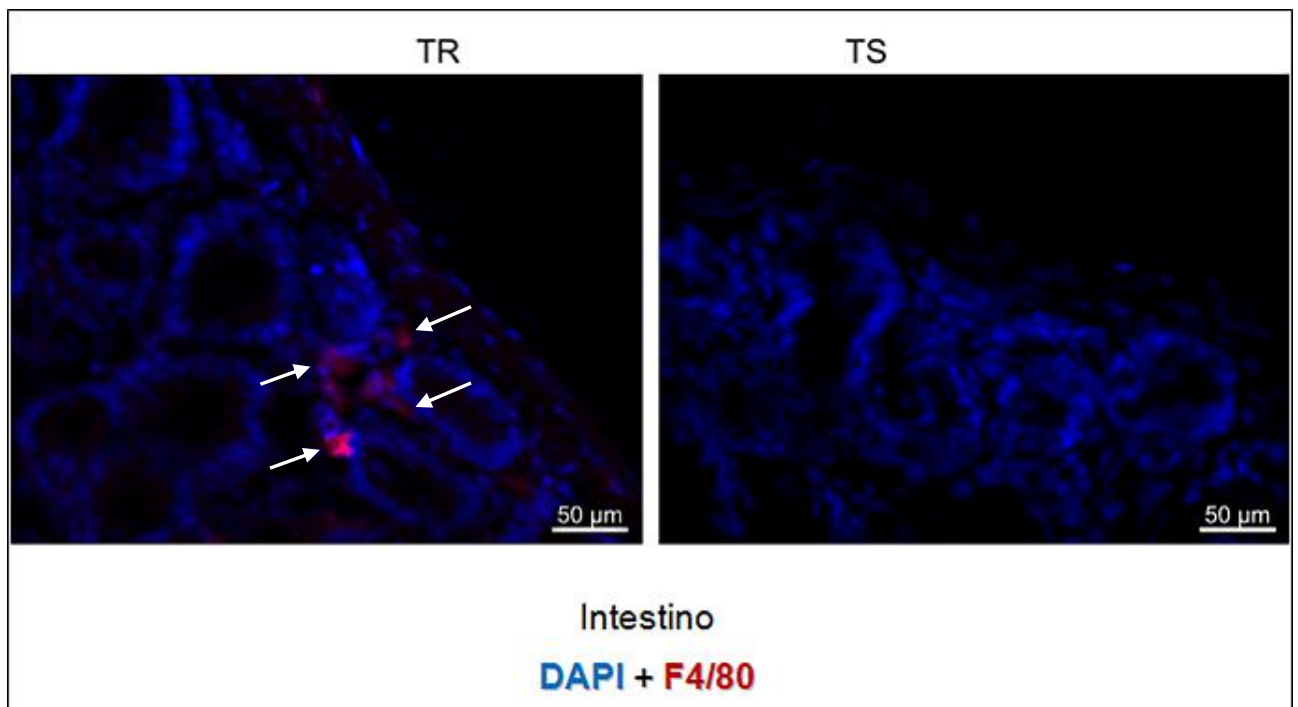


Figura 31 - Análise imunohistoquímica para a visualização de macrófagos (anti-F4/80 - vermelho), no intestino de camundongos TR e TS, 14 dias após infectados por gavagem, com 100 cistos de ME-49. Macrófagos indicados por seta.

A marcação de células dendríticas nos camundongos TR foi de menor intensidade, e em muitos casos não foi possível observar marcação positiva para essa população celular. Nos raros casos em que foi positiva, a marcação estava presente na região das vilosidades (Figura 32).

Nos camundongos TS, porém, a presença de células dendríticas foi positiva na maioria dos tecidos analisados. Entretanto, a detecção desta população de células foi restrita ao interior das vilosidades. Em poucas vezes, a marcação foi positiva também na região exterior próxima das vilosidades (Figura 32).

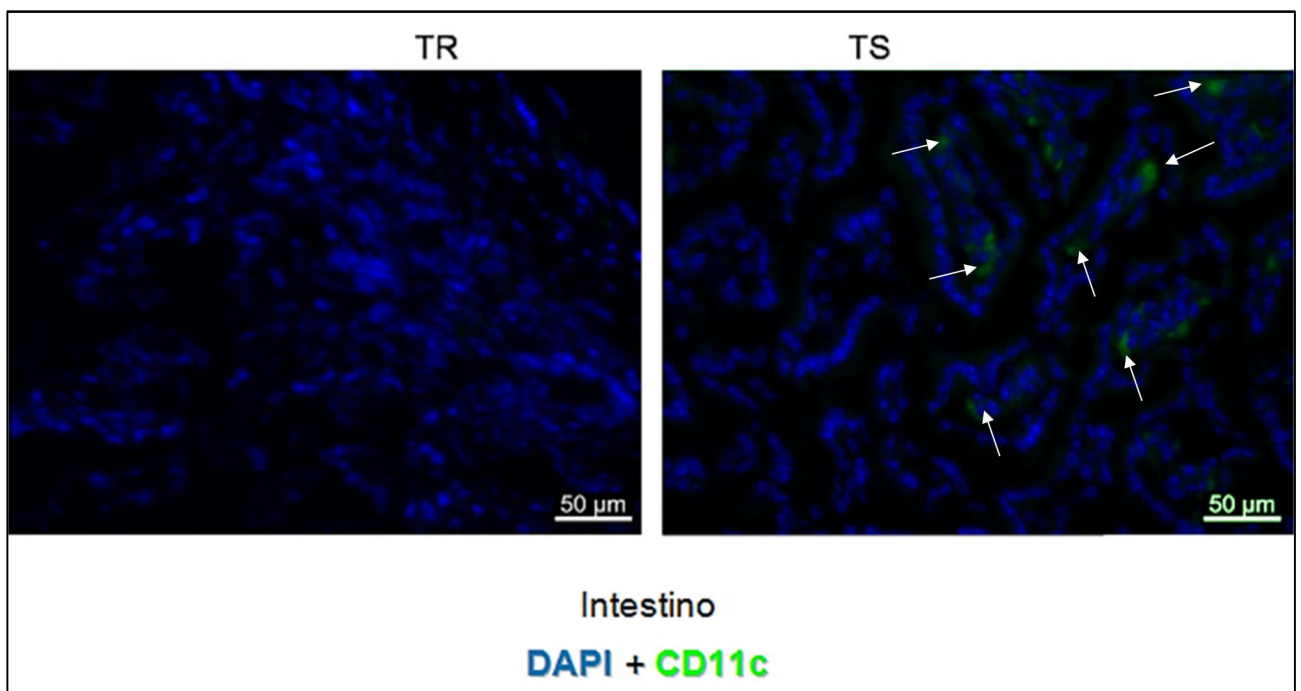


Figura 32 - Marcação por imunofluorescência para células dendríticas (anti-CD11c), no intestino de camundongos TR e TS, 7 dias após infectados por gavagem com 100 cistos de ME-49. Células dendríticas indicadas por seta.

#### 4.8 Análise da microbiota intestinal por PCR

As análises por PCR utilizando os iniciadores para o endogen  $\beta$ -catenina demonstram a amplificação de um fragmento de 120pb, conforme o esperado (Figura 33).

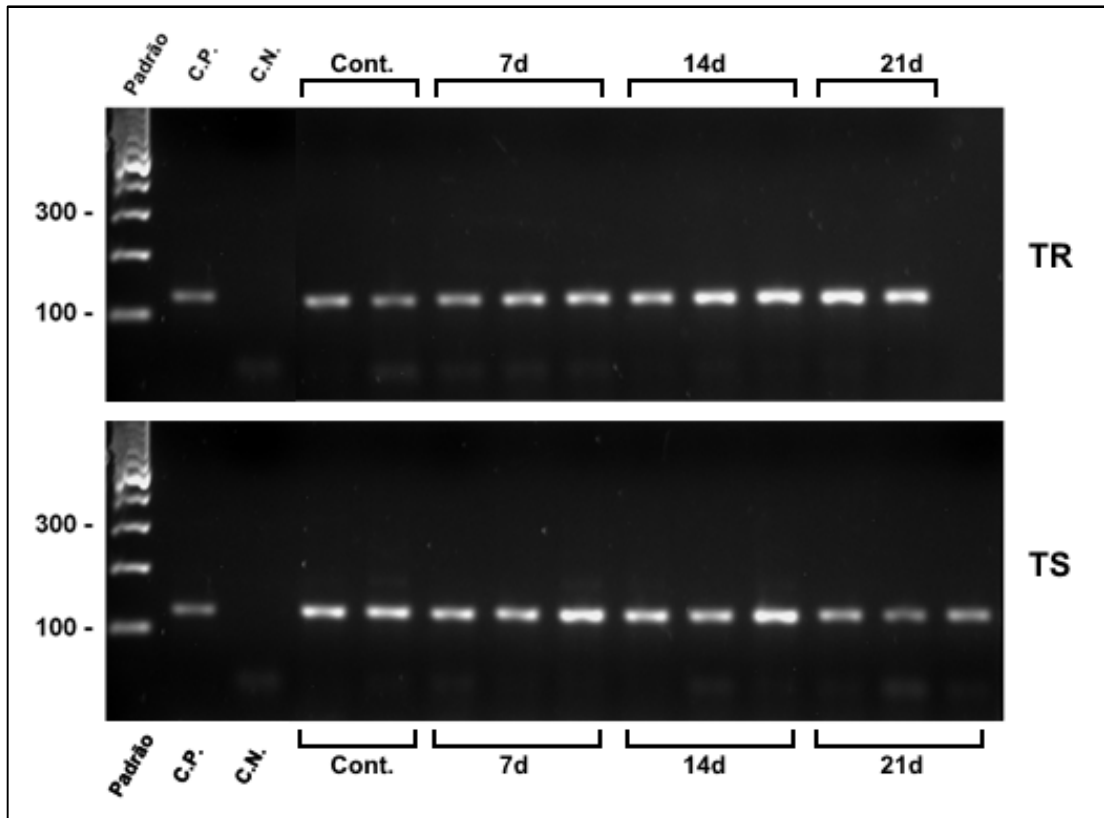


Figura 33 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para  $\beta$ -catenina, com controle positivo de 120pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

A amplificação para o gênero *Bacillus* apresentou controle positivo por volta de 300pb, diferentemente do produto esperado pelo primer, de 411pb (Hansen *et al.*, 2001). Ainda, os produtos de amplificação encontrados nos camundongos TS, tanto os controles quanto os camundongos com 7 dias de infecção e com 14 dias, tiveram peso de 200pb, abaixo do controle positivo, sendo portanto os resultados considerados negativos para esse gênero (Figura 34).

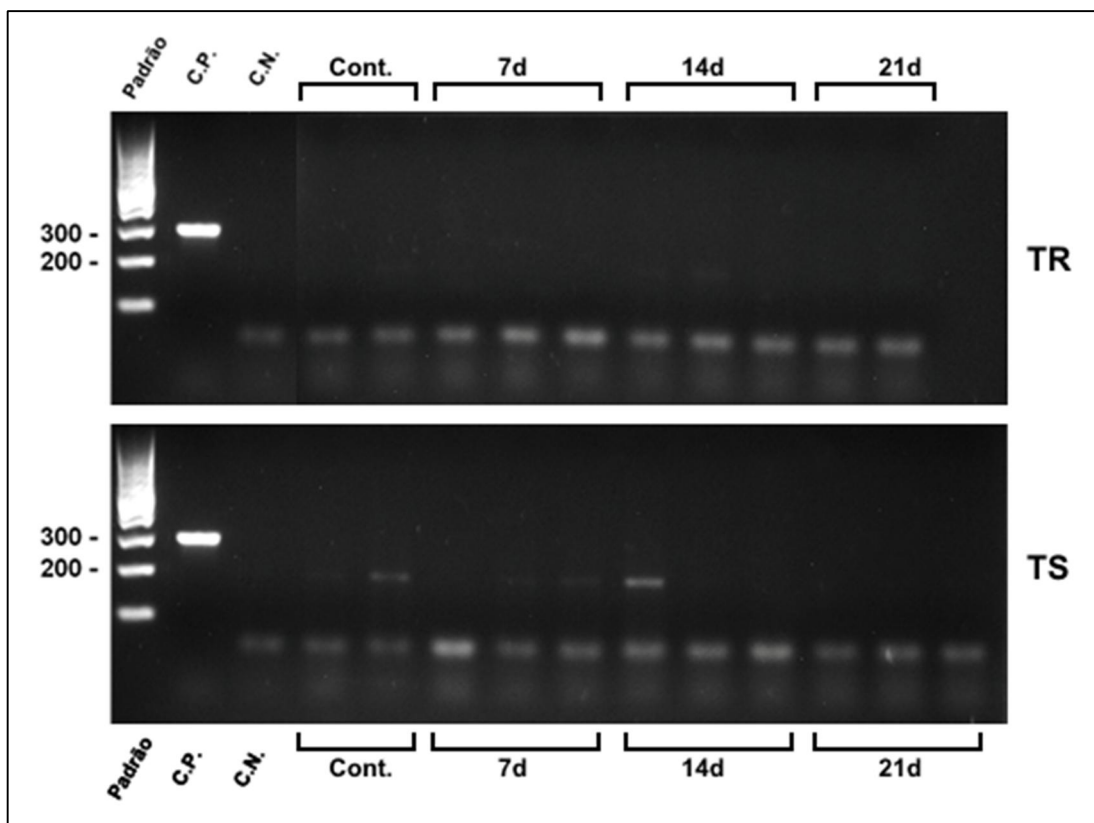


Figura 34 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero *Bacillus*, com controle positivo de aproximadamente 300pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

O PCR para o grupo *Bacteroides* não apresentou amplificação em nenhuma das amostras testadas (Figura 35).

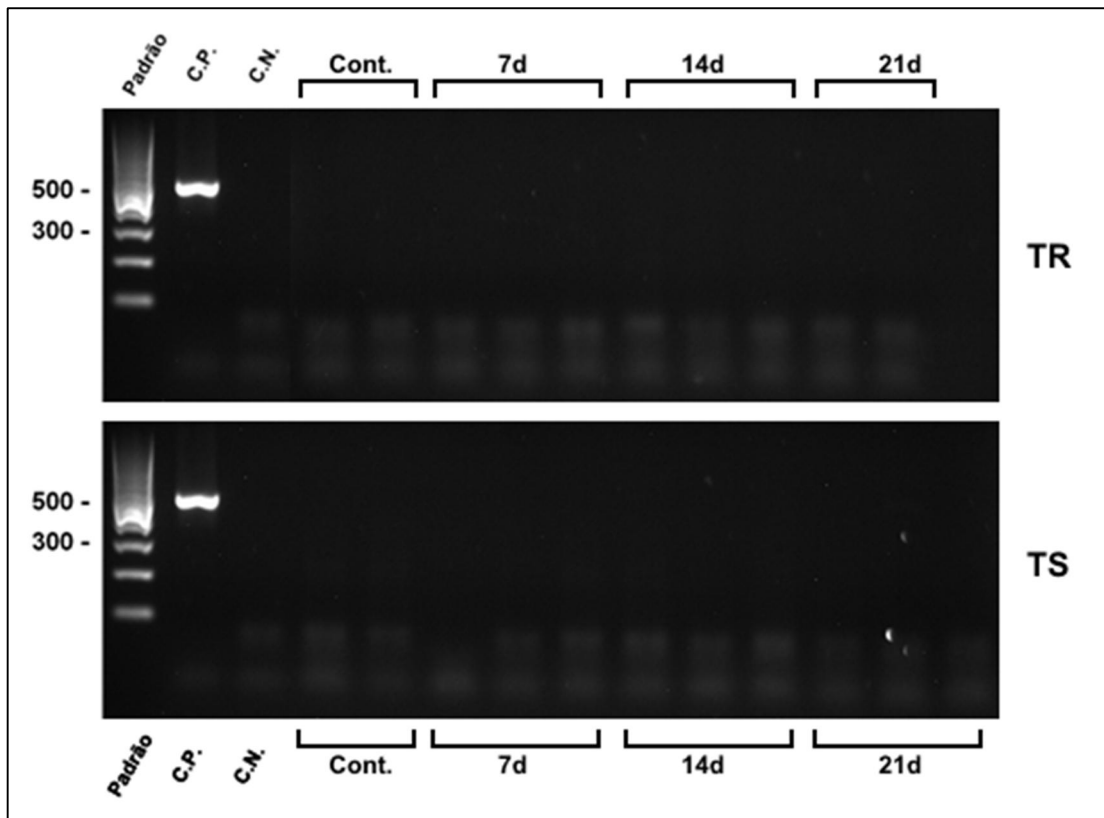


Figura 35 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para grupo *Bacteroides*, com controle positivo de aproximadamente 500pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.



O PCR para o grupo *Clostridium* apresentou amplificação de forte intensidade em um camundongo TS e um camundongo TR com 21 dias de infecção. Também é possível observar bandas de amplificação de fraca intensidade em dois dos camundongos TR com 7 dias de infecção, e em um camundongo da mesma linhagem com 14 dias de infecção. As bandas de amplificação positivas estão dentro do peso esperado no controle positivo, cerca de 450pb (Figura 36).

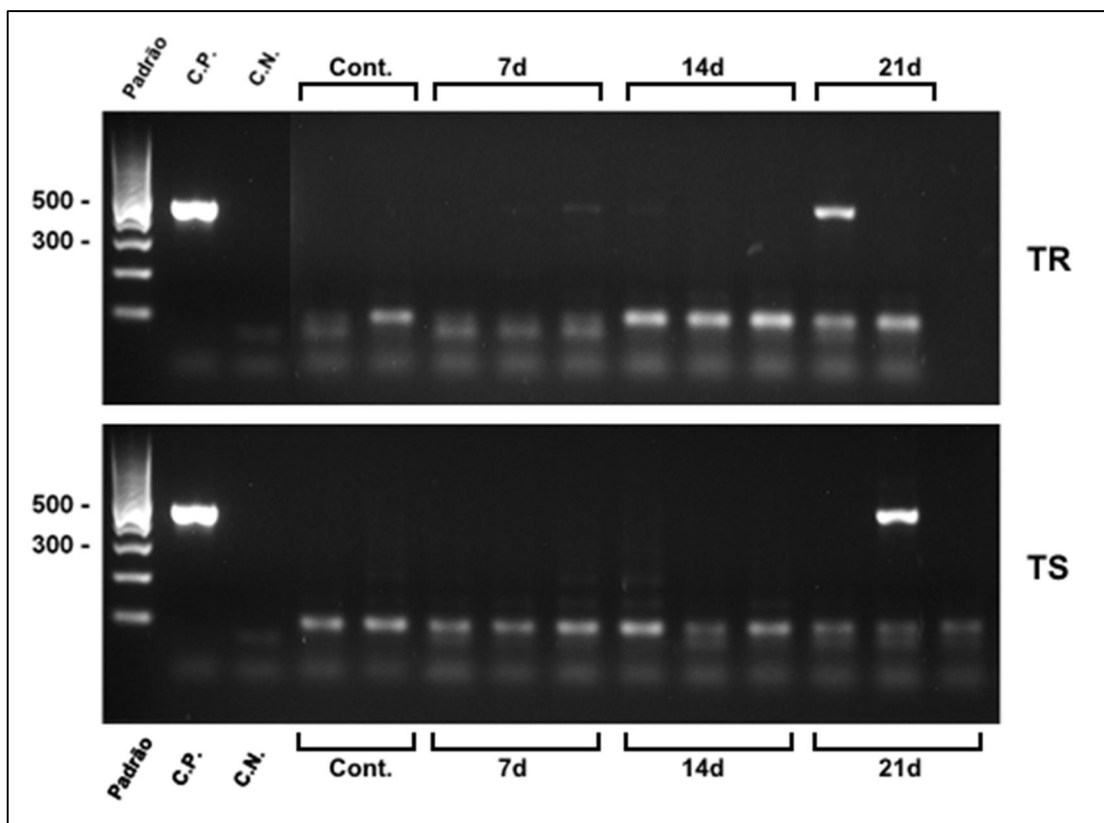


Figura 36 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para grupo *Clostridium*, com controle positivo de aproximadamente 450pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

A amplificação para a família *Enterobacteriaceae* foi positiva em todos os grupos observados, tanto os camundongos TR quanto os TS. Porém, houve diferença na intensidade das bandas amplificadas. Enquanto nos camundongos TS a intensidade de amplificação foi fraca, nos camundongos TR essa amplificação foi visivelmente mais intensa. É possível perceber também que essa intensidade de amplificação não variou conforme o tempo, permanecendo bastante semelhante entre as linhagens independente do tempo de infecção, mesmo em relação aos controles (Figura 37).

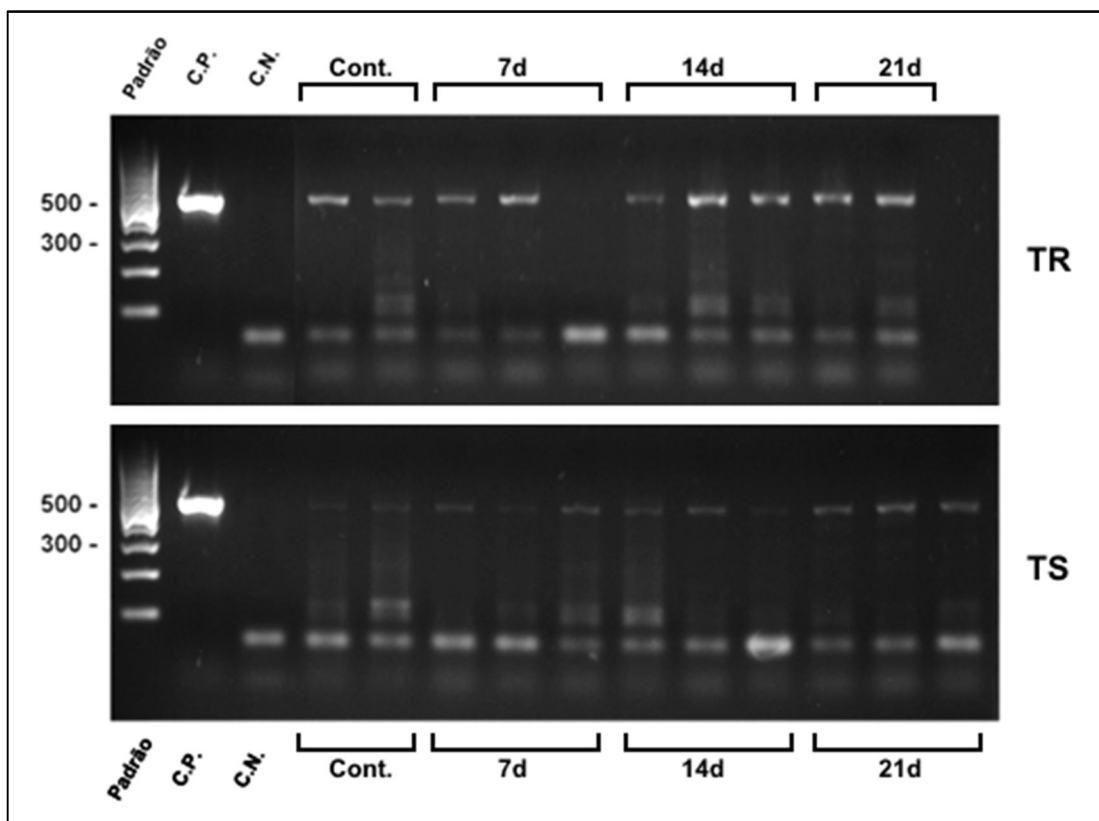


Figura 37 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para família *Enterobacteriaceae*, com controle positivo de aproximadamente 500pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

O PCR para o gênero *Enterococcus* (Figura 38) não apresentou evidência de amplificação positiva em nenhuma das amostras testadas. Da mesma maneira, o PCR para as espécies *Lactobacillus acidophilus* (Figura 39) e *Lactobacillus rhamnosus* (Figura 40) não produziu amplificação em nenhuma das amostras avaliadas.

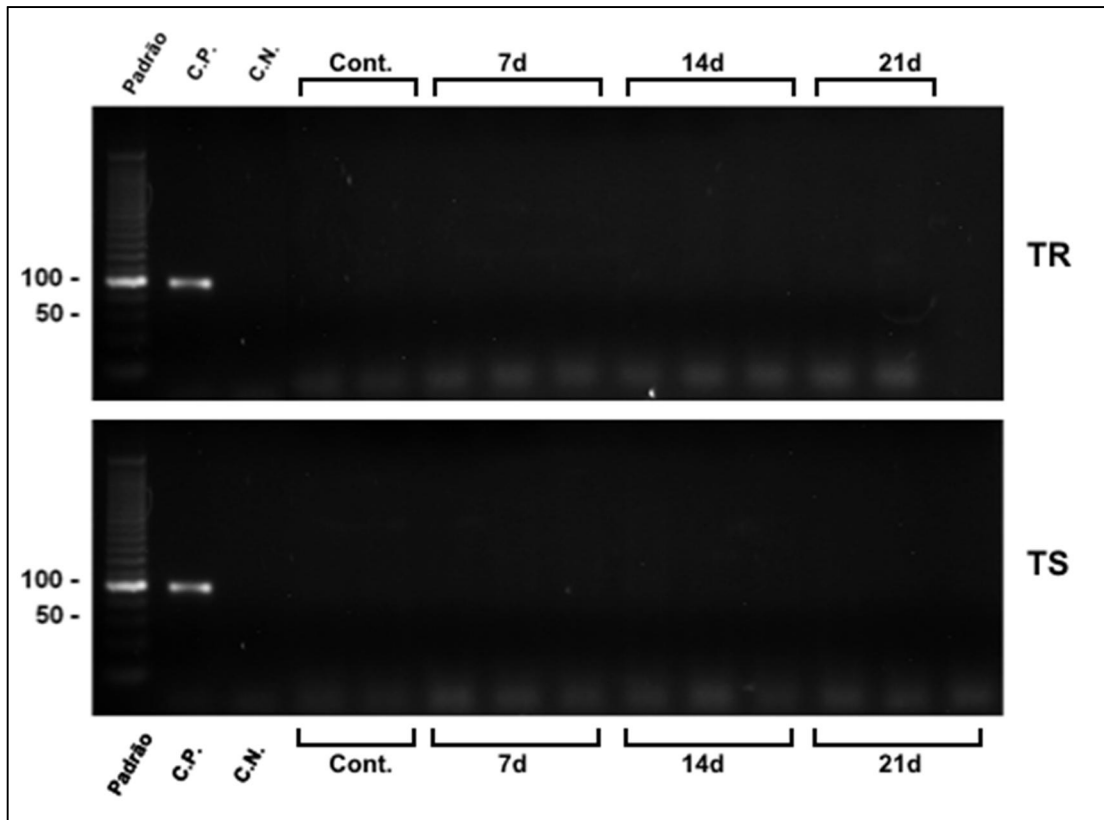


Figura 38 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero *Enterococcus*, com controle positivo de aproximadamente 100pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

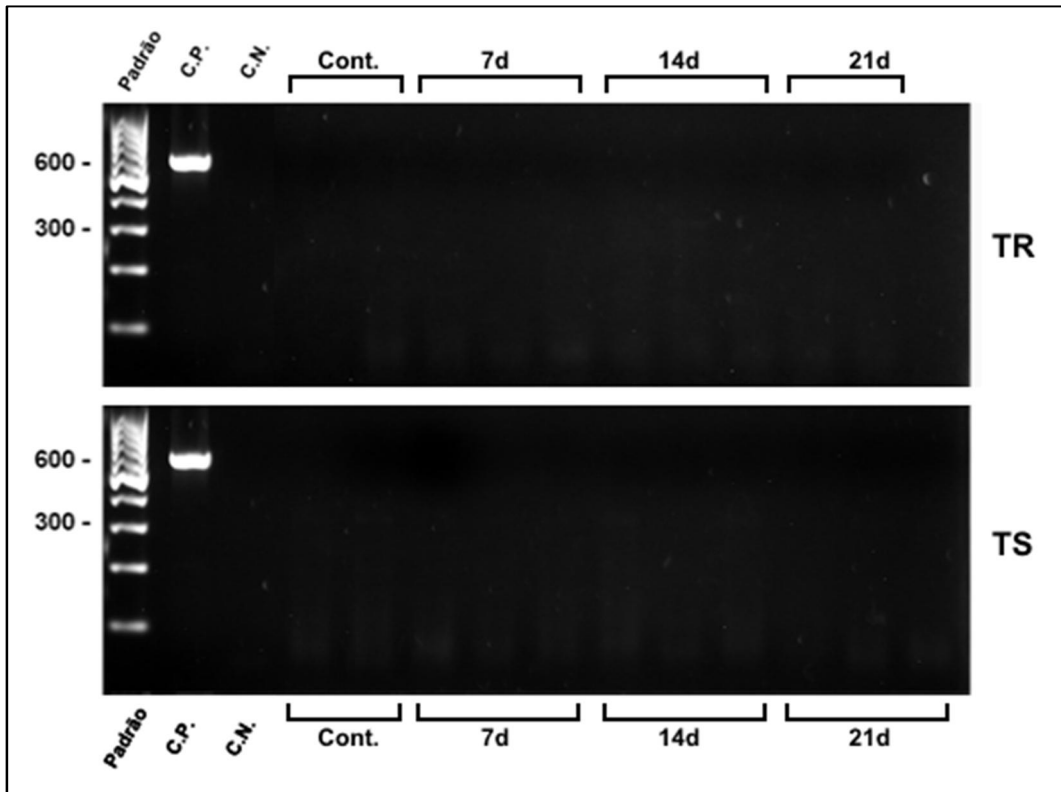


Figura 39 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para *Lactobacillus acidophilus*, com controle positivo de aproximadamente 575pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

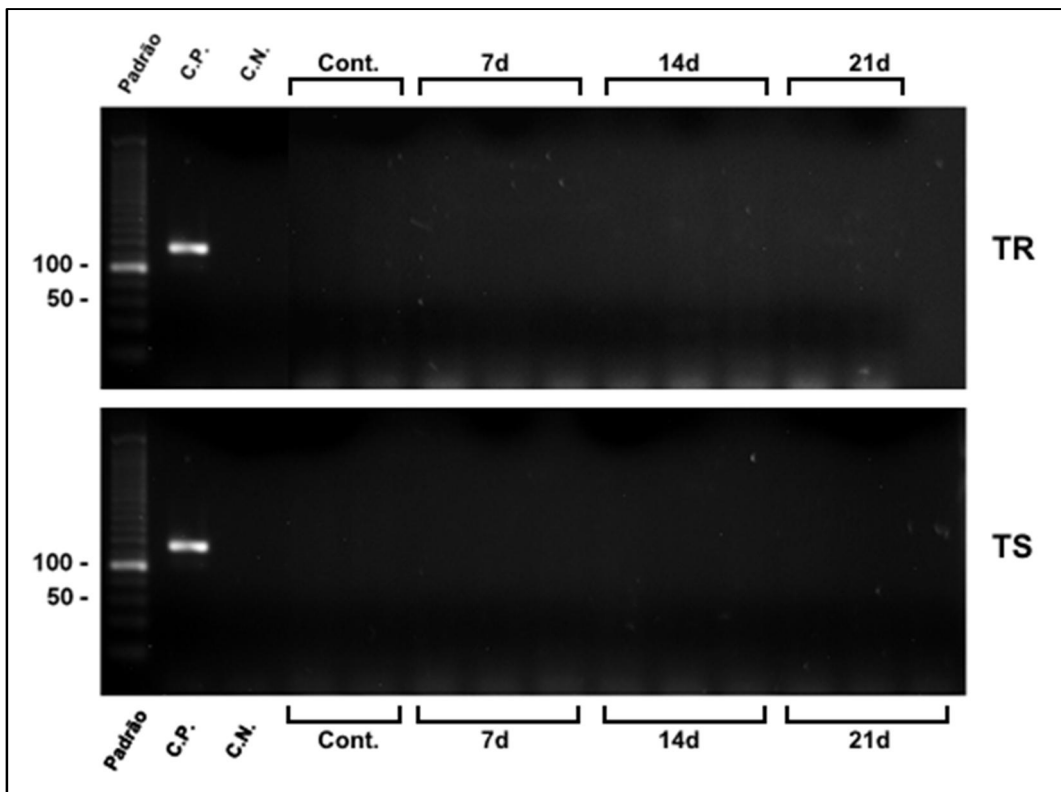


Figura 40 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para *Lactobacillus rhamnosus*, com controle positivo de aproximadamente 150pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

A amplificação para detecção do gênero *Prevotella* foi positiva em ambas as linhagens observadas, incluindo os animais dos grupos controle. Foi possível perceber uma diferença de intensidade entre as linhagens TR e TS, a última apresentando uma intensidade maior que a observada nos camundongos TR. Aparentemente essa intensidade não varia ao longo da infecção. (Figura 41). Para os camundongos TR, a intensidade observada nos camundongos após 21 dias da infecção foi aparentemente menor que nos outros pontos observados (Figura 41).

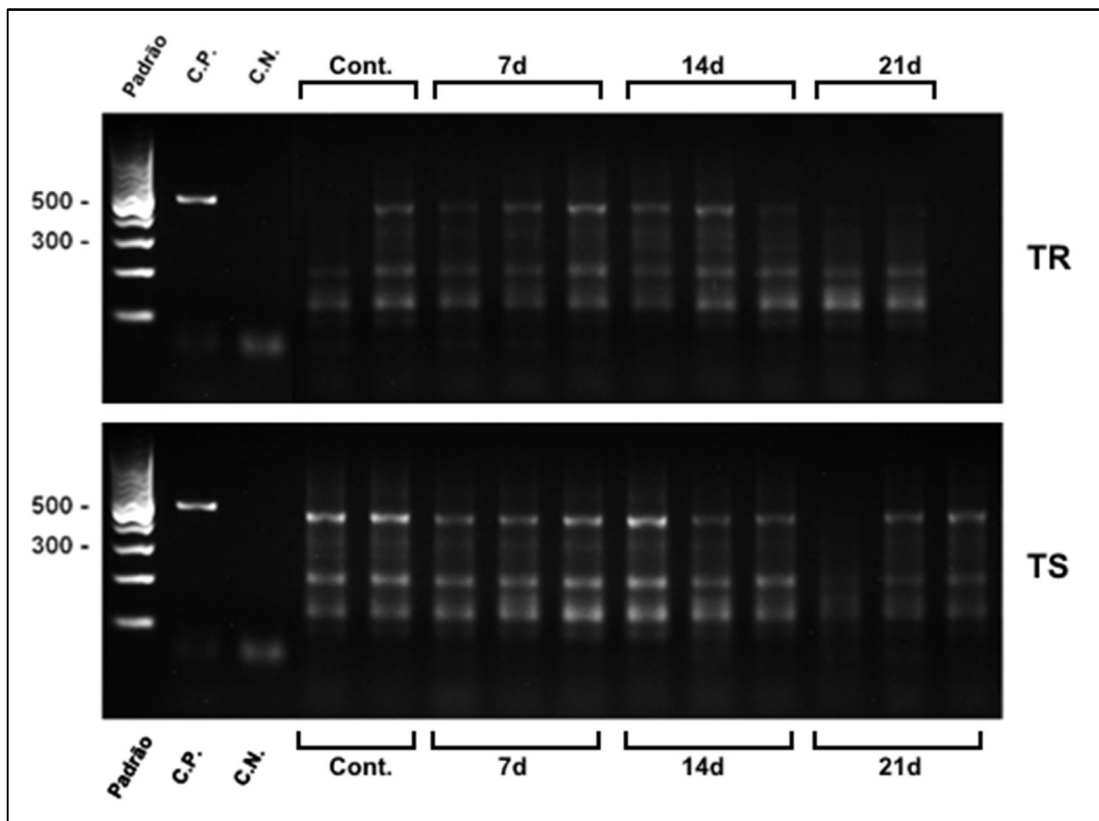


Figura 41 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero *Prevotella*, com controle positivo de aproximadamente 550pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

O PCR para o gênero *Streptococcus* apresentou amplificação bastante fraca para alguns camundongos das linhagens TS e TR, assim como para os animais do grupo controle, independente do tempo de infecção. As bandas de amplificação positivas estavam dentro da faixa esperada, cerca de 550pb (Figura 42).

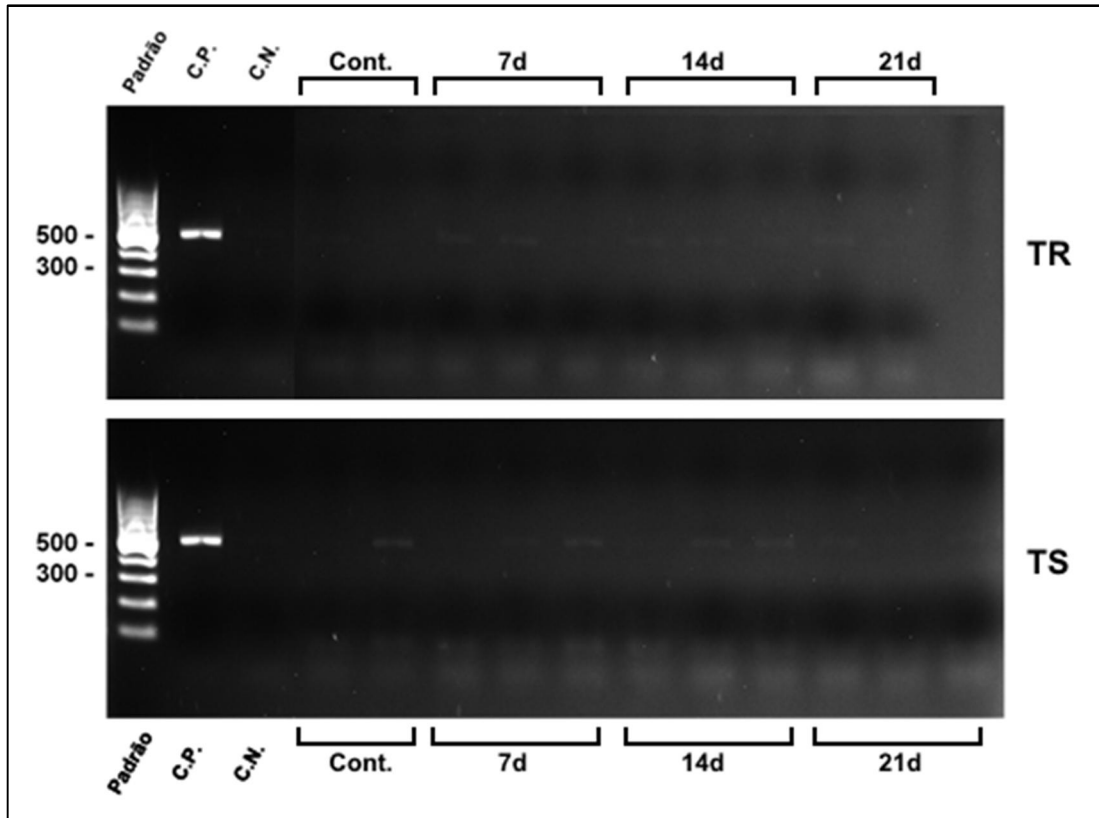


Figura 42 - Produtos de amplificação por PCR simples com primer para gênero *Streptococcus*, com controle positivo de aproximadamente 550pb. Infecção por gavagem com 50 cistos de ME-49.

## 4.9 Sumário dos resultados

Tabela 3 – Sumário dos resultados obtidos durante a infecção por gavagem com cistos de *T. gondii* da cepa ME-49

	<b>Camundongos TR</b>	<b>Camundongos TS</b>
<b>Sobrevivência</b>	Mortalidade a partir do 8º dia, alcançando 45% de sobrevivência no 21º dia.	Sobrevivência de 90% até o 21º dia.
<b>Carga parasitária</b>	Cultura de tecido e imunofluorescência: Menos parasitos no fígado e no intestino, Quantificação por qPCR: menor número de parasitos no íleo no 7º dia, aumento no 14º dia e diminuição no 21º dia.	Cultura de tecido e imunofluorescência: Mais parasitos no fígado e no intestino. Quantificação por qPCR: maior número de parasitos no íleo com aumentou gradativamente até o 21º dia.
<b>Alterações histológicas</b>	Íleo, fígado e baço: sinais de inflamação aguda, principalmente aos 7º e 14º dias de infecção, com melhora significativa no 21º dia, com o íleo revertendo para um quadro de normalidade.	Íleo, o baço e o fígado: sem sinais de inflamação até o 7º dia da infecção. No 21º dia, é possível observar alterações histológicas, principalmente no fígado.
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Produção sistêmica e no baço: bastante elevada, apresentando queda significativa aos 14 dias, porém ainda elevada comparada aos controles. Produção no intestino elevada aos 7 dias.	Produção sistêmica elevada aos 7 dias, com queda significativa aos 14 dias, atingindo patamar dos camundongos controle aos 21 dias. Baço: elevada, atingindo nível dos controles aos 14 dias.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Produção sistêmica elevada aos 7 dias, com queda gradual até o 21º dia. No intestino e baço: elevada em relação aos controles no 7º dia.	No soro: produção elevada aos 7 e 14 dias, atingindo níveis de controle aos 21 dias. Intestino e baço: produção elevada aos 7 dias com queda aos 14 dias.
<b>IL-12p70</b>	Produção sistêmica sem alteração em relação aos controles. No baço e intestino, produção elevada em relação aos controles.	Produção no soro: próxima a observada nos controles. Produção tecidual elevada em relação aos controles.
<b>IL-2</b>	Produção sistêmica: sem alteração em relação aos camundongos controle.	Produção sistêmica significativamente baixa aos 7 dias, aumentando gradualmente até o 21º dia.
<b>IL-10</b>	A produção no soro: pouca alteração. No intestino: um pouco maior do que nos camundongos controle.	A produção sistêmica aos 7 dias foi normal, com aumento gradativo até o 21º dia. No intestino: nível foi elevado no 7º dia, sofrendo pequena queda no 14º dia.
<b>IL-4</b>	Sem alteração em relação aos controles.	Sem alteração em relação aos controles.
<b>IL-6</b>	Pouca alteração na produção de IL-6 no soro e baço. No intestino, a produção foi acima da média dos camundongos controle.	Com 7 dias de infecção, a produção de IL-6 no soro e no intestino já era mais alta que nos TR. A quantidade no soro dobrou no 21º dia de infecção.
<b>IL-17</b>	Produção sem alteração comparada aos camundongos não infectados.	Produção sistêmica aos 7 e 14 dias sem alteração em relação aos controles. No 21º dia, produção elevada comparada aos controles.
<b>MCP-1</b>	Produção sistêmica: inicialmente elevada, atingindo patamar dos controles ao 14º dia. No intestino: concentração bastante elevada aos 7 dias de infecção.	Produção no soro: pico de produção aos 14 dias, seguida de uma queda acentuada no 21º dia. No íleo e baço: aos 7 dias de infecção, elevada em relação aos controles.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os camundongos TS e TR se mostraram modelos importantes para o estudo da doença inflamatória intestinal causada pela infecção oral por *T. gondii*. A infecção por *T. gondii* pode causar diferentes manifestações clínicas e respostas imunológicas, tanto locais como sistêmicas, variando de indivíduo para indivíduo, em função de suas diferentes origens genéticas e do *status* imunológico (Csöngéi *et al.*, 2010).

Camundongos TR mostraram alta taxa de mortalidade na fase inicial da infecção, que foi até o 21º dia de infecção, tanto em infecções com 50 cistos quanto em infecções com 100 cistos. Foi possível observar, nos camundongos infectados com 50 cistos, uma queda gradual, que iniciou-se no 7º dia, durando até o 21º dia de infecção. A partir desse período, os camundongos da linhagem TR sobreviventes se mantiveram vivos por períodos superiores a 90 dias (dados não mostrados). A taxa de sobrevivência se estabiliza em cerca de 45% para essa linhagem. Camundongos TS apresentaram menor mortalidade na fase inicial da infecção, atingindo uma taxa de sobrevivência de 90% até o 21º dia. A mortalidade observada nessa linhagem também se inicia mais tardiamente que nos camundongos TR, por volta do 13º dia.

A avaliação da carga parasitária por método biológico, utilizando células Vero, mostrou nos camundongos da linhagem TR uma baixa carga parasitária no fígado. Essa avaliação, realizada aos 21 dias após a infecção oral, mostrou que os camundongos TR apresentam média de  $5 \times 10^4$  parasitos por grama de tecido, contra quase quatro vezes mais observado nos camundongos da linhagem TS ( $1,8 \times 10^5$  parasitos por grama).

A análise imunohistoquímica do fígado de camundongos TR também mostrou resultados parecidos. Nos camundongos TR, não foi possível detectar a presença de parasitos aos 14 dias de infecção usando essa metodologia, enquanto nos camundongos da linhagem TS, foi possível observar uma média de  $2,75 \pm 2,22$  parasitos na contagem absoluta. Expandindo essa contagem levando em consideração a área da figura, podemos aproximar o número para  $112,15 \pm 90,53$  parasitos por  $\text{mm}^2$  nesse órgão. Os camundongos TR também mostraram quantidades elevadas de parasitos no íleo, utilizando diferentes metodologias. A análise do íleo de camundongos TR infectados com 100 cistos por imunohistoquímica mostrou uma carga parasitária menor que a observada nos camundongos TS. Os valores contabilizados para os camundongos TS foram quase quatro vezes maiores ( $38,75 \pm 14,17$ ) do que os contabilizados nos camundongos da



linhagem TR ( $8,75 \pm 7,46$ ). Em termos relativos, temos  $1580,23 \pm 577,85$  e  $356,83 \pm 304,22$  parasitos por  $\text{mm}^2$  no íleo dos TS e TR, respectivamente. A avaliação da carga parasitária no íleo também foi realizada por PCR em tempo real, dessa vez avaliando a quantidade de parasitos ao longo de 3 pontos na infecção. Baseado nesta metodologia foi possível perceber que a quantidade de parasitos no íleo dos camundongos TR apresentou uma variação ao longo da infecção, inicialmente com uma quantidade pequena, de cerca de  $1,6 \times 10^2$  parasitos por grama de tecido. Após 14 dias de infecção essa quantidade aumentou para  $5,0 \times 10^2$  parasitos por grama. No 21º dia, porém, a quantidade de parasitos apresentou uma redução, atingindo cerca de  $2,7 \times 10^2$  parasitos por grama de tecido analisado. Por outro lado, nos camundongos TS o aumento na quantidade de parasitos foi progressiva ao longo da infecção, demonstrando com 7 dias de infecção,  $7,6 \times 10^2$  parasitos por grama de tecido, elevando-se para  $9,5 \times 10^2$  parasitos aos 14 dias de infecção, progredindo para  $1,1 \times 10^3$  parasitos por grama de tecido aos 21º dia de infecção. Esses resultados permitiram observar que, comparativamente, os camundongos TR apresentaram uma menor quantidade de parasitos nos órgãos estudados, independentemente do tempo de infecção. Além disso, essa quantidade de parasitos apresentou uma tendência uniforme de aumento na linhagem TS.

Na linhagem TR os parasitos apresentaram um pico entre o 7º e o 14º dia após a infecção, que regridiu no 21º dia. Somado a isso, analisando conjuntamente a taxa de sobrevivência, podemos inferir que a mortalidade elevada dos camundongos TR durante a fase aguda é resultante da tentativa de controle da população de *T. gondii* nesses camundongos, ao passo que a maior quantidade de parasitos observada na linhagem TS deve-se ao fato da baixa resposta inflamatória dessa linhagem frente à infecção por *T. gondii*.

Outro fator que pesa em favor dessa afirmação é o fato dos camundongos TR possuírem poucas células CD4+Foxp3+, produzindo assim baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, que implicam um alto potencial inflamatório e baixa capacidade regulatória (Silva et al, 2001; Silva et al., 2006). Camundongos TS, por outro lado, possuem um elevado número de células T reguladoras CD4+Foxp3+, mostrando uma melhor regulação da resposta inflamatória (Silva et al, 2001; Silva et al., 2006). Estas informações são corroboradas pela extensa necrose do íleo observada nos camundongos TR, enquanto camundongos TS apresentaram menor alteração dessa região do intestino, caracterizada basicamente pela presença de amiloidose pontual. Além disso, os camundongos TR apresentaram um perfil de citocinas pró-

inflamatórias, com níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  elevados, e pequena produção de IL-10 e IL-6. Assim, os camundongos TR, devido ao seu elevado potencial de resposta inflamatória, podem morrer de necrose intestinal durante os estágios iniciais da toxoplasmose justamente pelo fato de não conseguirem controlar com eficácia a intensidade da resposta imunológica para eliminar o parasito. Além disso, a sobrevivência dos camundongos TR nas fases tardias da infecção pode ser explicada por essa resposta inflamatória intensa ser capaz de controlar a proliferação do parasito durante as fases iniciais da infecção, o que permite que os camundongos sobreviventes tenham uma doença mais branda e sobrevivam à fase crônica da infecção.

Na infecção aguda, camundongos TR apresentam lesões intensas no íleo e fígado, assim como desorganização dos centros germinativos do baço. As lesões observadas na região terminal do íleo apresentam maior gravidade nos camundongos TR, onde pôde ser observada necrose intensa das vilosidades e infiltrado linfóide na lamina própria e camada muscular. Esses sinais de inflamação intestinal apresentaram maior intensidade nas duas primeiras semanas após a infecção (7 e 14 dias), evoluindo para um quadro de melhora nos camundongos que sobrevivem até o 21º dia. Nesse estágio, ocorre o aparecimento de amiloidose pontual, mas nenhuma outra alteração foi observada em camundongos desta linhagem. Uma inflamação intestinal semelhante foi observada em camundongos C57BL/6, mas somente quando infectados com 100 cistos (Liesenfeld, 2002). No entanto, os camundongos C57BL/6 não sobrevivem à esse inóculo, ocorrendo mortalidade de 100% até o 14º dia da infecção, o que limita o estudo da inflamação intestinal. A recuperação do íleo após a segunda semana de infecção foi observada nos camundongos TR, e este fato é sustentado pela redução de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  sistêmicas ao final da fase aguda da infecção (dia 14) e no início da fase crônica (dia 21), o que sugere uma resolução da reação inflamatória intestinal nos camundongos TR que sobreviveram à fase aguda da infecção.

Em humanos, IBDs como a colite ulcerativa ou a doença de Crohn frequentemente causam danos epiteliais no intestino. Em geral, o epitélio intestinal é capaz de reparar-se rapidamente através de restituição, proliferação e diferenciação de células epiteliais, quando tal dano tecidual ocorre (Okamoto & Watanabe, 2005). É também evidente que a IL-10 produzida por células T pode inibir a inflamação no intestino e, assim, o desenvolvimento de enterocolite grave (Kuhn *et al.*, 1993; Burtsov *et al.*, 2008). Na toxoplasmose, T regs são essenciais durante a proteção

em fase precoce da infecção por *T. gondii*. A depleção de CD25<sup>+</sup> conduz a um aumento da mortalidade em camundongos resistentes BALB/c, infectados com *T. gondii* (Skelsey *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, os níveis de citocinas observados especificamente no intestino corroboram com esses resultados da inflamação intestinal: tanto IL-6 quanto IL-10 se mostraram significativamente menores nos camundongos TR, comparados aos camundongos TS, no período de 7 dias da infecção. Os níveis de IFN- $\gamma$  no íleo também se mostraram muito elevados em relação aos camundongos controle.

Devido a sua atividade quimiotática para monócitos, a MCP-1 também pode estar implicada na maior presença de infiltrados linfoides observada nos camundongos suscetíveis à inflamação intestinal (MacDermott *et al.*, 1998), além de favorecer o aumento da população e a permanência de macrófagos responsáveis pelas lesões intestinais, levando assim à um aumento na severidade das inflamações observadas nestas linhagens (Gaddi & Yap, 2007). Em pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa, MacDermott e colaboradores (1998) observaram níveis marcadamente maiores de expressão de mRNA para MCP-1. A quantidade de MCP-1 medida no íleo dos camundongos TR foi significativamente maior, chegando a 3 vezes mais que a produção da mesma citocina pelos camundongos TS. Esse nível cai para valores basais aos 14 dias de infecção. Sistemicamente, a MCP-1 também se mostra elevada nos camundongos TR, aos 7 dias de infecção. Com isso, fica evidente que a maior produção de MCP-1 pelos camundongos TR durante a fase aguda da infecção pode levar à ampliação da população de monócitos Gr1<sup>+</sup> no intestino, contribuindo para o aumento da ocorrência e da intensidade das lesões intestinais.

Ainda para os camundongos TR, o fígado apresentou uma série de alterações, entre as quais: granulomas de variadas intensidades, tumefação turva e degeneração gordurosa, sendo que essas alterações se concentraram principalmente nos dois pontos iniciais observados (7 e 14 dias). A tumefação turva se distingue da degeneração gordurosa principalmente pelo tamanho e material acumulado nos vacúolos observados nos hepatócitos dos camundongos. Na tumefação, os vacúolos são numerosos, e seu volume é preenchido por água, dando ao citoplasma da célula um aspecto rendado, enquanto na degeneração gordurosa o vacúolo geralmente é único e preenchido por lipídios. Tal como observado no íleo, esse quadro apresentou uma clara melhora no 21<sup>o</sup> dia de infecção, quando foi

possível observar apenas pequenos focos de tumefação turva nos camundongos TR.

O baço dos camundongos da linhagem TR também apresentou alterações sugestivas de infecção. A primeira alteração observada, ainda macroscopicamente, foi o aumento do tamanho do órgão em relação tanto aos baços de camundongos TR saudáveis quanto aos de camundongos TS infectados. Esse aumento do baço é um indicativo que o órgão esteve sob intensa atividade durante o período da infecção, e essa atividade aumentada foi confirmada pela grande produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e MCP-1 nesse órgão durante os primeiros dias da infecção. A produção de IL-6 e IL-10 no baço, porém, não foi muito maior que o observado nos camundongos controle. Como visto para o íleo e fígado, as principais alterações histológicas ocorreram durante as duas primeiras semanas da infecção, período em que se observa maior irregularidade dos centros germinativos e aumento de celularidade, o que sugere uma forte resposta imunológica na infecção por *T. gondii* nesse intervalo de tempo. Esta hipótese é respaldada pela detecção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e menores níveis de IL-10 e de IL-6 nestes camundongos durante a fase inicial da infecção. Camundongos C57BL/6, sabidamente suscetíveis à infecção oral por *T. gondii*, também produzem níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Liesenfeld, 2002) o que indica um resultado semelhante ao observado nos camundongos TR.

Sabe-se que o aumento dos níveis de IL-6 antagoniza a produção de IL-12 e de IFN- $\gamma$ , resultando num sinal anti-inflamatório que bloqueia a geração de imunidade do tipo Th1, protetora contra *T. gondii* (Silver *et al.*, 2011). Após a infecção por *L. amazonensis*, os camundongos TR apresentavam lesões inflamatórias intensas e resposta imunológica celular elevada com baixa carga parasitária e níveis baixos de citocinas anti-inflamatórias, contrastando com os camundongos TS, que tinham poucas lesões inflamatórias e baixa resposta imunológica celular com alta carga parasitária e níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias (Tavares *et al.*, 2006). Nosso estudo apresenta resultados semelhantes, e mostra que durante a fase aguda os camundongos TS produziram menos IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e mais IL-6 e IL-10 que os camundongos TR, e no início da fase crônica estes níveis foram praticamente os mesmos que nos camundongos não infectados, mas os níveis de IL-6 foram maiores. Além disso, como já mostrado, a quantidade de parasitos observada nos camundongos TS é mais elevada que nos camundongos TR. Interessante observar que os gráficos de quantificação de

parasitos por qPCR no íleo apresentaram uma semelhança grande com os gráficos de dosagem de IL-6 e IL-10 sistêmica, o que reforça a observação de que o aumento da quantidade de parasitos está relacionada à maior produção de citocinas anti-inflamatórias nos camundongos TS.

Gazzinelli *et al.* (1996) relataram que camundongos depletados de IL-10 (KO) inoculados com *T. gondii* da cepa ME-49, sucumbiram nas duas primeiras semanas de infecção, apresentando uma infiltração linfocítica generalizada maciça com necrose hepática extensa, e não há evidência de maior proliferação de parasitos e inflamação no sistema nervoso central. A metade dos camundongos TR morreu até a terceira semana após a infecção oral com *T. gondii*, exibindo lesão hepática e no íleo, apesar da baixa carga parasitária. Em ambos os casos foram detectados níveis elevados de IL-6, o que sugere que esta citocina desempenhe um papel fundamental neste sistema. Stumhofer *et al.* (2007) identificaram uma nova via relatando que a IL-27 e IL-6 induzem células T helper do tipo 1 e 2, assim como as células T auxiliares que produzem IL-17, a secretar IL-10. A baixa atividade inflamatória dos camundongos TS pode ser explicada pela sua produção elevada de IL-6, o que limita a resposta inflamatória através da indução da produção de IL-10 e pelos seus efeitos inibitórios sobre a IL-12 e IFN- $\gamma$  (Gaddi & Yap, 2007; Kastelein *et al.*, 2007; Stumhofer *et al.*, 2007; Silver *et al.*, 2011). Sabe-se que os camundongos TS submetidos a diferentes estímulos inflamatórios e alergênicos respondem com níveis elevados de IL-10 (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2006). Controversamente, os níveis de MCP-1 sistêmica nos camundongos TS, aos 14 dias de infecção, se apresentaram significativamente mais elevados que nos camundongos TR e nos camundongos TS controle. A quantidade desta citocina atinge níveis próximos aos dos controles no 21º dia. Essa observação vai de encontro ao que foi observado para o recrutamento de monócitos e para a quantidade de parasitos nesta linhagem; portanto, testes mais específicos deverão ser feitos para verificar como, com níveis altos de MCP-1 neste período, os camundongos TS conseguem manter o baixo recrutamento de monócitos no intestino, um grande número de parasitos e baixos sinais inflamatórios.

A IL-12 é produzida por macrófagos ativados, e leva ao estímulo da resposta Th1. Comparando a produção de IL-12p70 em ambas as linhagens TR e TS, não foi possível observar diferenças significativas. Do mesmo modo, os camundongos infectados não demonstraram níveis significativamente diferentes em relação aos camundongos controle. Quando dosada no íleo e no baço, porém, esta citocina

demonstrou níveis elevados em relação aos camundongos controle, em ambas as linhagens. Esses níveis foram bastante semelhantes tanto para os camundongos TR quanto para os TS. O estímulo de produção de IL-12 sem a produção simultânea de IL-10 pode levar à imunopatologia (Gaddi & Yap, 2007). Sabendo disso, é possível inferir que nos camundongos TR, nos quais há uma baixa produção de IL-10, esta citocina age potencializando a imunopatologia causada pela resposta contra o parasito. Nos camundongos TS, porém, onde há maior produção de IL-10 e presença de células regulatórias, a IL-12 acaba sendo regulada, prevenindo a imunopatologia.

A IL-17 tem sido associada à autoimunidade, estando implicada também em casos de inflamação neurológica causada por infecção com *T. gondii* (Stumhofer *et al.*, 2006). A produção sistêmica de IL-17 nos camundongos TR não apresentou variação durante o período de 21 dias, permanecendo sempre dentro da produção normal exibida pelos camundongos TR controle. Esses valores, comparados com os camundongos TS, também não apresentaram variação significativa. Porém, observando apenas os valores dos camundongos TS infectados em relação aos TS controle, percebe-se uma leve tendência de elevação da IL-17 ao longo do tempo. Embora essa variação seja muito discreta, pode-se levar em consideração que as células Th17 produtoras de IL-17 são inicialmente induzidas por IL-6, e que como demonstrado anteriormente, a IL-6 sistêmica aumenta nos camundongos TS conforme o tempo de infecção. Estudos anteriores envolvendo os camundongos TS mostram que essa linhagem é capaz de desenvolver meningoencefalite em decorrência da infecção por gavagem com este parasito (Dias *et al.*, 2014). Além disso, estudos em astrócitos murinos demonstram um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 no cérebro de camundongos com toxoplasmose crônica (Halonen *et al.*, 1998). Juntos, estes dados sugerem que o aumento tanto da IL-6 como da IL-17 induzida pelo IL-6 podem levar ao desenvolvimento de um quadro de meningoencefalite pelos camundongos TS.

A quantificação dos níveis de IL-4 revelou que não houve diferenças significativas entre os camundongos TR e TS infectados em nenhum dos pontos avaliados. A única observação foi um aumento na produção desta citocina em ambas as linhagens infectadas, em relação aos camundongos controle, aos 14 dias de infecção.

Em um estudo usando camundongos deficientes para IL-2 infectados com *T. gondii*, Villegas *et al.* (2002) mostraram que apesar de produzirem níveis normais de

IL-12p40, estes camundongos apresentaram baixa produção de IFN- $\gamma$  e carga parasitária aumentada. Para os camundongos TR, a produção desta citocina se manteve estável ao longo do tempo em que foi medida, sempre apresentando valores próximos aos dos controles negativos da mesma linhagem. Porém, nos camundongos TS, os níveis de IL-2 dosados se mostraram inicialmente baixos, mas esses níveis aumentaram gradativamente ao longo dos pontos observados. Essa menor produção de IL-2 no 7º dia de infecção corrobora os resultados observados para a produção de IL-12, de IFN- $\gamma$  e da carga parasitária avaliada nesta linhagem. Em conjunto com o observado para IL-17 e IL-6, pode-se teorizar que o aumento da produção desta citocina, sobretudo no início da fase crônica, aos 21 dias da infecção, sugere um início de uma resposta inflamatória. Estudos mais aprofundados, portanto, se mostram necessários.

Quando a infecção por *T. gondii* ocorre por via oral, o parasito entra no organismo infectando primeiro as células epiteliais do intestino, e atravessa a membrana basal, migrando para dentro da lâmina própria (Barragan & Sibley, 2002). Lá, as células dendríticas e os macrófagos são infectados e são, provavelmente, responsáveis pela disseminação do parasito através do sangue para outros locais (Courret *et al.*, 2006). Ambas as células, após infectadas, possuem capacidade de produzir IL-12, que vai induzir a síntese de IFN- $\gamma$  e gerar o principal tipo de resposta contra o parasito (Suzuki, 2002). Os camundongos TR apresentaram marcação positiva para F4/80 no 7º dia após a infecção, porém a quantidade da marcação era relativamente baixa, e não estava presente na totalidade das lâminas avaliadas. Porém, no 14º dia, foi possível observar a presença de macrófagos em todos os cortes histológicos dos camundongos TR, assim como foi perceptível também o aumento no número de marcações em cada lâmina. Contrariamente, a marcação positiva para CD11c na linhagem TR se mostrou mais fraca e menos constante, inclusive ausente em algumas lâminas. Estes dados sugerem que os macrófagos seriam os principais produtores de IL-12 no intestino dos camundongos TR. Conforme observado por Murray, em 2011, os macrófagos intestinais são substancialmente diferentes dos macrófagos derivados da medula óssea, comumente usados em experimentos. Uma das principais diferenças é que os macrófagos intestinais são constitutivamente expostos a IL-10, de forma a prevenir uma resposta excessiva contra produtos microbiais direcionados aos intestinos. Uma vez que esta linhagem possui uma menor produção de IL-10, é possível inferir a

colaboração dos macrófagos com as células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> para o estabelecimento e possível agravamento do quadro de necrose intestinal observado.

Nos camundongos da linhagem TS, por outro lado, a marcação positiva de macrófagos para F4/80 se mostrou bastante rara, e quando presente, de baixa intensidade de fluorescência, em ambos os pontos observados. Por outro lado, a presença de células dendríticas (CD11c) foi muito mais constante, exibindo marcação positiva em quase todas as lâminas avaliadas. Devido à maior presença deste tipo celular nos camundongos TS e a relativa ausência de macrófagos, as células dendríticas parecem ser a principal fonte de produção de IL-12 para essa linhagem. Porém, devido à produção aumentada de IL-10 destes camundongos, associada à menor produção inicial de IL-2, ocorre o bloqueio do estímulo da resposta Th1, levando à ausência de imunopatologia, e também à falha no controle da população do parasito. Além disso, a produção de IL-12 pelas células dendríticas infectadas leva ao aumento da resposta migratória nessas células, contribuindo para a disseminação do parasito no organismo (Lambert *et al.*, 2011). Corroborando estas informações, dados mostram que as células dendríticas infectadas contribuem de maneira específica para a disseminação de parasitos de genótipo II, como a ME-49, capazes de explorar mais eficientemente a capacidade migratória das células dendríticas que as cepas do genótipo I (Lambert *et al.*, 2009). Worbs *et al.* (2006) demonstram que a indução de tolerância oral é dependente da migração correta de células dendríticas para os linfonodos mesentéricos, o que implica que o maior número destas células observadas nos camundongos TS pode estar ativamente estimulando a tolerância oral via apresentação de antígenos derivados de *T. gondii* nos linfonodos mesentéricos.

Sabe-se que a composição da microbiota comensal é de grande importância para o curso da resposta imunológica após a infecção por *T. gondii* (Liesenfeld, 2002; Lidar *et al.*, 2009). Por exemplo, as bactérias comensais do intestino podem influenciar e favorecer a produção de citocinas do eixo IL-23 / IL-17, em detrimento da produção de IL-12, levando à diminuição de resposta do tipo Th1 (Gaddi e Yap, 2007). Outros autores mostram que o LPS bacteriano favorece o desenvolvimento de resposta do tipo Th1, principalmente pela indução de IL-12 e TNF- $\alpha$ , e que esse estímulo da LPS poderia se somar à patologia intestinal observada em camundongos B6 (Buzoni-Gatel & Werts, 2006). Ambas as linhagens usadas nesse estudo apresentaram uma composição semelhante da microbiota intestinal comensal, caracterizada pela amplificação positiva para *Enterobacteriaceae* e



*Prevotella*, e em menor proporção, pela presença de *Streptococcus* em alguns camundongos. Porém, apesar dessa similaridade, a diferença na intensidade das bandas de amplificação observada entre os camundongos TR e TS sugere que possa haver uma diferença quantitativa na composição da microbiota das duas linhagens, e isso poderia influenciar ainda mais a maneira como esses camundongos reagem à infecção por *T. gondii*. Recentemente, foi demonstrado que LPS derivado de *Escherichia coli* (família *Enterobacteriaceae*) e *Prevotella spp.* pode contribuir para a imunopatologia intestinal (Heimesaat *et al.*, 2006, 2007). Foi demonstrado também que a colonização do intestino de camundongos com *Prevotella copri* é capaz de aumentar a sensibilidade à colite quimicamente induzida (Scher *et al.*, 2013).

Mesmo na ausência de uma resposta Th1 exacerbada, a replicação do *T. gondii* no intestino pode levar à danos no epitélio, permitindo que bactérias comensais, inclusive Gram-negativas ricas em LPS, possam atravessar a barreira epitelial. Como resultado, essas bactérias podem entrar em contato com células dendríticas, macrófagos e células T da lamina própria (Buzoni-Gatel & Werts, 2006), estimulando a produção de IL-12 e ativação da resposta Th1 de maneira potencializada, levando à danos teciduais cada vez maiores devido ao efeito de auto-estimulação gerado. Neste estudo, foi mostrado que os camundongos TR apresentam um perfil de microbiota que sugere maior prevalência da família *Enterobacteriaceae*. Esse perfil, juntamente com a alta produção de citocinas pró-inflamatórias, reduzida capacidade regulatória e maior presença de macrófagos observados nesta linhagem, ajuda a explicar a elevada intensidade das reações inflamatórias e da imunopatologia observada no íleo. Esses fatores ajudam a criar um ambiente de potente resposta inflamatória que, sem a produção de citocinas anti-inflamatórias e baixa presença de células regulatórias, leva à maior eliminação do parasito, mas também causa a maior mortalidade observada para a linhagem TR.

Reforçando a tese da interação microbiota-parasito no estabelecimento da imunopatologia, *Enterobacteriaceae* derivadas de camundongos infectados com *T. gondii* foram transferidas para camundongos germ-free, sozinhas ou em conjunto com o parasito. Camundongos controle, também germ-free, foram colonizados com *Bacteroides fragilis*, também na presença ou ausência do *T. gondii*. Os isolados de *Enterobacteriaceae* resultaram em desenvolvimento de patologia intestinal na presença de *T. gondii*, enquanto os isolados de *B. fragilis* não foram capazes de causar patologia nas duas condições. Isto revela que a inflamação intestinal induzida

por *T. gondii* ocorreu em consonância com a expansão da população de *Enterobacteriaceae* no intestino (Raetz *et al.*, 2013).

Berry & Reinisch (2013) mostram que apesar de tanto *Enterobacteriaceae* como *Bacteroides* se apresentarem em altos níveis durante a inflamação em modelos murinos para IBD, cepas de *Bacteroides* isoladas de camundongos com inflamação intestinal foram capazes de induzir colite em camundongos saudáveis, fato que não se observou para as cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas da mesma forma, o que sugere que essa família está associada à inflamação intestinal, mas de maneira não causativa. Camundongos TS, aparentemente, possuem uma menor amplificação para *Enterobacteriaceae*, e coincidentemente, não exibem a imunopatologia intestinal apresentada pelos camundongos TR. Estudos mais específicos são necessários para demonstrar o quanto a baixa reatividade imunológica destes camundongos frente à infecção por *T. gondii* se deve somente à sua capacidade regulatória e perfil de citocinas, à sua menor quantidade de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, ou mesmo se o gênero *Prevotella* de alguma forma pode conceder proteção contra a imunopatologia intestinal, apesar de se tratar de uma Gram-negativa.

## 6 CONCLUSÕES

- A alta capacidade de resposta inflamatória dos camundongos TR causa aumento da mortalidade na fase aguda devido à necrose intestinal e complicações hepáticas, porém os camundongos sobreviventes conseguem controlar o número de parasitos e se recuperar da maior parte das lesões.
- O quadro de perda de arquitetura dos vilos e infiltração de células linfóides observado nos intestinos dos camundongos TR, em conjunto com a presença de macrófagos, bem como o perfil de citocinas local observado, indica o desenvolvimento de inflamação intestinal similar às IBDs causadas por agentes biológicos nesta linhagem.
- A atividade tolerogênica dos camundongos TS, através das citocinas antiinflamatórias e células regulatórias, é capaz de controlar a resposta imunológica contra *T. gondii*. Com isso, a quantidade de parasitos, que já é naturalmente mais alta que nos camundongos TS, apresenta uma tendência a aumentar conforme a infecção avança para o estágio crônico.
- Os camundongos TR possuem maior presença de macrófagos nos intestinos em relação aos camundongos TS, que funcionam como fonte de IL-12, e causam uma resposta imunológica contra o antígeno adquirido pela mucosa intestinal devido à baixa produção de IL-10 nessa linhagem. Contrariamente, os camundongos TS possuem uma maior população de células dendríticas no íleo, que pareada à produção de IL-10 elevada, leva essas células a favorecer o aumento da quantidade de parasitos, bem como a rápida migração destes para outros tecidos.
- Os camundongos TR e TS apresentam enterotipos similares em composição, porém ocorre maior presença de *Prevotella* spp nos camundongos TS e *Enterobacteriaceae* nos camundongos TR. O enterotipo das linhagens, que não apresentou mudanças significativas ao longo do período de infecção avaliado, é outro fator que corrobora a maior suscetibilidade dos camundongos TR à infecção, além de provável proteção dos camundongos TS contra a imunopatologia intestinal induzida por *T. gondii*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 1984;2:283-318.
- Arnaboldi PM, Roth-walter F, Mayer L. Suppression of Th1 and Th17, but not Th2, responses in a CD8(+) T cell-mediated model of oral tolerance. *Mucosal Immunol.* 2009;2(5):427-438.
- Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* 2002;195:1625-1633.
- Belkaid Y, Blank RB, Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev.* 2006;212:287-300.
- Benson A, Pifer R, Behrendt CL, Hooper LV, Yarovinsky F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe.* 2009;6(2):187-96.
- Bereswill S, Kühl AA, Alutis M, et al. The impact of Toll-like-receptor-9 on intestinal microbiota composition and extra-intestinal sequelae in experimental *Toxoplasma gondii* induced ileitis. *Gut Pathog.* 2014;6:19.
- Berry D, Reinisch W. Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases?. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27(1):47-58.
- Brandtzaeg P. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1996;778:1-27.
- Bueno V, Pacheco-Silva A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 1999;45: 79-85.
- Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* 2006;22(10):448-52.
- Castro-junior AB, Horta BC, Gomes-santos AC, et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cell Immunol.* 2012;280(2):171-81.

- Chirido FG, Millington OR, Beacock-sharp H, Mowat AM. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol*. 2005;35(6):1831-40.
- Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D *et al*. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 2006;107:309-316.
- Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai L *et al*. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol* 2010;16:176-183.
- De Faria AM, Ficker SM, Speziali E, *et al*. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev*. 1998;102(1):67-80.
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: phase conversion pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44:592-602.
- Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004;126:57-72.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375-1424.
- Dunay IR, Damatta RA, Fux B, *et al*. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2008;29(2):306-317.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2006;13(2-4):143-157.
- Fazzeli H, Arabestani MR, Esfahani BN, *et al*. Development of PCR-based method for detection of Enterobacteriaceae in septicemia. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2012;17(7):671-675.
- Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(1):71-80.

- Fouad AF, Barry J, Caimano M, *et al.* PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40(9):3223-3231.
- Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):155-159.
- Garside P. Cytokines in experimental colitis. *Clinical and Experimental Immunology* 1999;118(3):337-339.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A *et al.* In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1996;157:798–805.
- Ge YY, Zhang L, Zhang G, *et al.* In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+ -regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 2008;30(9):471-481.
- Geary RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:325-333.
- Halonen SK, Chiu FC, Weiss LM. Effect of Cytokines on Growth of *Toxoplasma gondii* in Murine Astrocytes. Mansfield JM, ed. *Infection and Immunity* 1998;66(10):4989-4993.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol.* 2013;114:125-45.
- Hansen BM, Leser TD, Hendriksen NB. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;202(2):209-213.
- Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, *et al.* Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2006;177(12):8785-8795.

- Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M *et al.* Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 2007;56:941-948.
- Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, *et al.* Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4. Aballay A, ed. *PLoS ONE* 2007;2(7):e662.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(1):79-94.
- Hildebrand F, Nguyen TLA, Brinkman B, *et al.* Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biology* 2013;14(1):R4.
- Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol.* 1995;25(4):994-1000.
- Johnson J, Suzuki Y, Mack D, Mui E, Estes R *et al.* Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 2002;32:179-185.
- Kasper L, Courret N, Darche S, *et al.* *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol.* 2004;34(3):401-409.
- Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:221–242.
- Ke Y, Kapp JA. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CTL, CD4+ T cells, and antibody responses while activating CD8+ suppressor T cells. *J Immunol.* 1996;156(3):916-921.
- Khan A, Fux B, Su C, *et al.* Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 2007;104(37):14872-14877.
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997;94(25):13955-13960.
- Khan MM. Immunopharmacology. Springer Science & Business Media; 2008. 266p.
- King MD, Lindsay DS, Holladay S, Ehrich M. Neurotoxicity and immunotoxicity assessment in CBA/J mice with chronic *Toxoplasma gondii* infection and multiple oral exposures to methylmercury. J Parasitol 2003;89:856-859.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 1993;75:263–274.
- Lambert H, Dellacasa-lindberg I, Barragan A. Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. Microbes Infect. 2011;13(1):96-102.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006;124(4):837-848.
- Lidar M, Langevitz P, Barzilai O, Ram M, Porat-Katz BS *et al.* Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. Ann N Y Acad Sci 2009;1173:640-648.
- Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? J Infect Dis 2002;185:S96-101.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV *et al.* TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected with *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol 1999;21:365–376.
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+T cell-dependent, IFN-g-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 1996;184:597–609.



- MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. 1998; Inflammatory Bowel Diseases 4(1):54-67.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, *et al.* Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. Applied and Environmental Microbiology 2002;68(11):5445-5451.
- McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. Gut 2007;56:1333-1336.
- Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. Nature. 1989;339(6219):27-30.
- 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 Infect. 2011;13(4):394-404.
- Mowat AM. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. Vaccine. 2005;23(15):1797-1799.
- Murray PJ. Macrophages as a Battleground for *Toxoplasma* Pathogenesis. Cell Host Microbe. 2011 June 16; 9(6): 445–447
- Nagineeni CN, Detrick B, Hooks JJ. Transforming growth factor- $\beta$  expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. Clinical and Experimental Immunology 2002;128(2):372-378.
- Nagy B, Bán Z, Beke A, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. Clin Chim Acta. 2006;368(1-2):131-137.
- Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. Dig Dis Sci 2005;50(Suppl 1):34-38.
- Quabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature

- plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol.* 2008;180(9):5862-5870.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009;39(12):1385-1394.
- Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol.* 2008;38:561-569.
- Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp.* 2003;252:92-98.
- Raetz M, Hwang S, Wilhelm C, *et al.* Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- $\gamma$ -dependent elimination of Paneth cells. *Nature immunology* 2013;14(2):136-142.
- Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008;28:546–558.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol.* 2003;4(1):10-1.
- Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* 2013;2:e01202.
- Schulthess J, Fourreau D, Darche S, *et al.* Mucosal immunity in *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite.* 2008;15(3):389-395.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
- Silva AC, Lopes LM, Tavares DA, Araújo LMM, Ribeiro OG. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. *Microbes Infect.* 2001;3:1-8.
- Silva AC, Souza KW, Machado RC, Silva MFS, Sant'Anna AO. Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. *Res Immunol* 1998;149:151-161.

- Silva MFS, Bianchi C, Nóbrega A, da Silva AC, Sant'Anna AO. Genetic selection for extreme phenotypes of oral tolerance is strongly associated with the atopic potential of the individual. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1-9.
- Silva MFS, Kamphorst A, Hayashi E, Bellio M, Carvalho C *et al.* Innate profiles of cytokines implicated on oral tolerance correlate with low- or high-suppression of humoral response. *Immunology* 2010;130:447-457.
- Silva MFS, Nóbrega A, Ribeiro RC, *et al.* Genetic selection for resistance or susceptibility to oral tolerance imparts correlation to both Immunoglobulin E level and mast cell number phenotypes with a profound impact on the atopic potential of the individual. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1399-407.
- Silva MFS, Silva, AC, Nóbrega A, Barja-Fidalgo TC, Cunha F. Genetic selection for susceptibility to oral tolerance leads to a profound reduction of the acute inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:398-401.
- Silver JS, Stumhofer JS, Passos S, Ernst M, Hunter CA. IL-6 mediates the susceptibility of glycoprotein 130 hypermorphs to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2011;187:350-360.
- Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY. CD25+, interleukin-10-producing CD4+ T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology* 2003;110:18-29.
- Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today*. 1998;19(4):173-181.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM *et al.* Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7(9):937-945.
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8:1363-1371.

- Sul SY, Kim HJ, Kim TW, Kim HY. Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using multiplex PCR. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17(3):490-495.
- Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Res Immunol* 1993;144:66-79.
- Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases.* 2002; 185(Suppl 1):S58–65.
- Tavares D, Ribeiro RC, Silva AC. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microbes Infect* 2006;8:957-964.
- Tedesco RC, Vitor RW, Brandão GP, Calabrese KS. Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. *Micron.* 2007;38(7):729-733.
- Tenorio EP, Olgúin JE, Fernández 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*. *J Biomed Biotechnol* 2010; ID 786078.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:1217-1258.
- Unno A, Suzuki K, Xuan X, *et al.* Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int.* 2008;57(4):515-8.
- Vaz NM, Maia LCS, Hanson DG, Lynch JM. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol* 1977;60:110-115.
- Vaz NM, Rios MJ, Lopes LM, *et al.* Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Braz J Med Biol Res.* 1987;20(6):785-790.
- Villegas EN, Lieberman LA, Carding SR, Hunter CA. Susceptibility of Interleukin-2-Deficient Mice to *Toxoplasma gondii* Is Associated with a Defect in the

Production of Gamma Interferon. *Infection and Immunity* 2002;70(9):4757-4761.

Weiner HL. Current Issues in the Treatment of Human Diseases by Mucosal Tolerance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004;1029:211–224.

Weiner HL, Faria AMC. Oral tolerance. *Immunological Reviews*.2005;206:232-259.

Williams DM, Grumet FC, Remington JS. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1978;19:416-420.

Worbs T, Bode U, Yan S, *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203(3):519-527.

Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 1998;90:86-94.

Zhao Y, Wu J, Li JV, Zhou NY, Tang H, Wang Y. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *J Proteome Res.* 2013;12(6):2987-2999.

## 8 ANEXO

RESEARCH ARTICLE

# *Toxoplasma gondii* Oral Infection Induces Intestinal Inflammation and Retinochoroiditis in Mice Genetically Selected for Immune Oral Tolerance Resistance

Raul Ramos Furtado Dias<sup>1,2</sup>, Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho<sup>3</sup>, Carla Cristina da Silva Leite<sup>1</sup>, Roberto Carlos Tedesco<sup>4</sup>, Katia da Silva Calabrese<sup>2</sup>, Antonio Carlos Silva<sup>5</sup>, Renato Augusto DaMatta<sup>1\*</sup>, Maria de Fatima Sarro-Silva<sup>1,5</sup>

1. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, 2. Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 3. Laboratório de Sanidade Animal, UENF, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, 4. Disciplina de Anatomia Topográfica e Descritiva, Universidade Federal de São Paulo, 04023-900, São Paulo, SP, Brazil, 5. Laboratório de Imunobiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 20550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\*[renato@uenf.br](mailto:renato@uenf.br)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Dias RRF, Carvalho ECQd, Leite CCdS, Tedesco RC, Calabrese KdS, et al. (2014) *Toxoplasma gondii* Oral Infection Induces Intestinal Inflammation and Retinochoroiditis in Mice Genetically Selected for Immune Oral Tolerance Resistance. PLoS ONE 9(12): e113374. doi:10.1371/journal.pone.0113374

**Editor:** Ira J. Blader, University at Buffalo, United States of America

**Received:** June 18, 2013

**Accepted:** October 27, 2014

**Published:** December 1, 2014

**Copyright:** © 2014 Dias et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Estadual do Norte Fluminense (FENORTE) and Oswaldo Cruz Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

## Abstract

Toxoplasmosis is a worldwide disease with most of the infections originating through the oral route and generates various pathological manifestations, ranging from meningoencephalitis to retinochoroiditis and inflammatory bowel disease. Animal models for these pathologies are scarce and have limitations. We evaluated the outcome of *Toxoplasma gondii* oral infection with 50 or 100 cysts of the ME-49 strain in two lines of mice with extreme phenotypes of susceptibility (TS) or resistance (TR) to immune oral tolerance. Therefore, the aim of this study was to evaluate the behaviour of TS and TR mice, orally infected by *T. gondii*, and determine its value as a model for inflammatory diseases study. Mortality during the acute stage of the infection for TR was 50% for both dosages, while 10 and 40% of the TS died after infection with these respective dosages. In the chronic stage, the remaining TS succumbed while TR survived for 90 days. The TS displayed higher parasite load with lower intestinal inflammation and cellular proliferation, notwithstanding myocarditis, pneumonitis and meningoencephalitis. TR presented massive necrosis of villi and crypt, comparable to inflammatory bowel disease, with infiltration of lymphoid cells in the lamina propria of the intestines. Also, TR mice infected with 100 cysts presented intense cellular infiltrate within the photoreceptor

layer of the eyes, changes in disposition and morphology of the retina cell layers and retinochoroiditis. During the infection, high levels of IL-6 were detected in the serum of TS mice and TR mice presented high amounts of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Both mice lineages developed different disease outcomes, but it is emphasized that TR and TS mice presented acute and chronic stages of the infection, demonstrating that the two lineages offer an attractive model for studying toxoplasmosis.

---

## Introduction

Infection with *Toxoplasma gondii* is acquired by direct contact with food through ingestion of undercooked or raw meat containing the parasite cysts, congenitally through the placenta [1], or from oocyst contamination of soil or water [2]. In natural oral infections, histopathological studies demonstrate parasite invasion of a variety of cell types in the gut and subsequently disseminating throughout the body [3,4]. After crossing the intestinal epithelium, *T. gondii* spreads into several tissues and traverses biological barriers to reach immunologically privileged sites such as the brain and eyes where it can cause severe pathologies [5].

A variety of pathological manifestations is observed in *T. gondii* infected murine models, ranging from meningoencephalitis to retinochoroiditis and inflammatory bowel disease (IBD) like [6,7,8]. Murine *T. gondii* oral infection is under polygenic control [9,10]. For some pathology, animal models are scarce and limited for biological reasons. In C57BL/6 mice infected with high *T. gondii* burdens, IBD – like is observed with similar morphopathologic characteristics of human IBD [7]. This inflammatory process results in early mortality of the susceptible hosts. One difficulty in intestinal inflammation studies in mice infected with high *T. gondii* inoculum is maintaining the animal alive during the later stages of the infection. The C57BL/6 develops inflammation and starts to die on the seventh day after infection. Moreover, BALB/c mice survive oral infection with high inoculums but do not develop intestinal inflammation [11]. A more sophisticated model such as TLR4-deficient mice (C57BL/10ScN, carrying a deletion of the TLR4) presents 60% survival after oral infection but reduced immunopathology [12]. This murine ileal immunopathology resembling acute episodes in human IBD [7,13] suggests that *T. gondii* is involved in the etiopathogeny, especially in human Crohn's disease [14]. Intestinal chronic pathology investigation in mice orally infected with *T. gondii* is therefore relevant.

The role of the commensal intestinal microbiota in colitis has been studied in a number of experimental models, but detailed knowledge on the gut microbiota composition in acute intestinal inflammation is still limited [15]. According to Liesenfeld [7], mice orally infected with 100 cysts of *T. gondii* and treated with ciprofloxacin and metronidazole starting on the day of infection did not develop pathologic changes in their ilea 7 days after infection. The author also states that markedly reduced numbers of intestinal aerobic and anaerobic microorganisms



and a shift from gram-negative toward gram-positive organisms were observed in treated mice, pointing toward a role of resident enteric bacteria in the development of intestinal pathology following oral infection with *T. gondii*. Thus it is relevant to probe into the intestinal microbiota in *T. gondii* oral infected mice to better understand the gut inflammatory response.

*Toxoplasma gondii* is the most common cause of retinochoroiditis worldwide in humans representing 28 to 55% of all the posterior uveitis cases [16]. Retinochoroiditis development was detected in histopathological analyses of *T. gondii* infected mice [17, 18]. Tissue cysts have been found in parts of the normal retina surrounding necrotic areas, and cyst rupture may lead to reinfection in addition to subsequent destruction of retinal cells [19]. These observations are mainly in mice infected intraperitoneally [17], inoculated intravitreally or by instillation [20], or congenitally via a mother whose primary infection is acquired during gestation [21, 22]. Although retinochoroiditis develops following oral ingestion in the Syrian Golden Hamster model [23], difficulties are encountered in obtaining an experimental murine model for the study of uveitis caused by *T. gondii* ingestion.

In this study, two lines of mice genetically selected for extreme phenotypes of oral tolerance [24] were infected with *T. gondii* for comparative inter-lineage study. Oral tolerance is a phenomenon that refers to the observation that the ingestion of a protein induces a state of systemic hyporesponsiveness to parenteral immunization with the previously ingested antigen [25]. From the genetic point of view, the oral tolerance character is under polygenic control, and the resistant (TR mice) and susceptible (TS mice) lines are genetically homogeneous at the relevant loci for the selected character and heterogeneous in terms of background genes [24]. As far as the immunological perspective is concerned, TR mice are characterized by the development of strong Th1 and Th2 immune responses and higher acute inflammatory and allergic responses with low CD4+Foxp3+ Treg cell frequency producing insufficient IL-10 levels, in contrast to TS mice [26, 27, 28]. In previous studies, the TR and TS mice proved to be good models when infected with intracellular parasites. *Sporothrix schenckii* and *Leishmania amazonensis* infected TR mice presented, respectively, greater mortality and inflammatory lesions than TS mice due to a more effective immune response [29, 30]. Another reason for adopting these mice is that the involvement of the mucosa with the myriad of antigens from microbial and food proteins may lead to immunogenic and tolerogenic responses [31]. Mucous membranes in general, the gastrointestinal mucosa in particular, are natural and effective ways for *T. gondii* to reach the immune system and disseminate throughout the host.

Considering the divergent TR and TS inflammatory and immuno-tolerogenic profiles produced by genetic selection for extreme phenotypes of oral tolerance, and for their influence on infections, we aimed to know if TR and TS mice orally infected by *T. gondii* may be useful models to study inflammatory diseases caused by this parasite.

## Materials and Methods

### Mice

For each experimental infection, 6 male C57BL/6 mice (5–6 week old) raised at the *Universidade Estadual do Norte Fluminense* and 46 male and female tolerance resistant (TR) and tolerance susceptible (TS) mice (same age) from the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* were used. No sex susceptible difference after *T. gondii* infection was observed between these mice lines. The original population, from which the TR and TS strains were derived, consisted of an equipoise intercross of eight different inbred mouse strains (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ, and C57BL/6J) [24]. The consequence of these crosses (F<sub>0</sub> population) was engaged to initiate bidirectional selective breeding (by assortative mating), developed during 20 consecutive generations of treatment with soluble ovalbumin via the oral route and later challenged with intraperitoneal injections of alum plus ovalbumin. These two lines were selected for extreme phenotypes of oral tolerance (resistant – TR - and susceptible – TS) by an ovalbumin-specific IgG antibody assay and were not isogenic [24]. Mice were housed in a conventional animal facility under controlled temperature, receiving food and water ad libitum.

### Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the Brazilian Law #11794/08. The protocol was approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the *Universidade Estadual do Rio de Janeiro*, Brazil, under n<sup>o</sup>: CEA/243/2008. Mice were euthanized with CO<sub>2</sub> in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health.

### ME-49 strain of *T. gondii*

*Toxoplasma gondii* was maintained in a parasite bank at *Universidade Estadual do Norte Fluminense*. Swiss mice were intraperitoneally inoculated with 20 cysts of ME-49 in 0.2 ml of PBS. When the mice were at the chronic stage (3 months), they were euthanized with CO<sub>2</sub>. Subsequently the brains were removed, homogenized in 1 ml of PBS and cysts without staining were morphologically defined and counted under a microscope (40× objective) on three aliquots of 20 μl.

### Experimental infection

Mice were orally infected by gavage with 50 or 100 ME-49 cysts in 0.2 ml of PBS. Control mice received 0.2 ml of PBS without cysts. Experimental groups were separated according to the following: 23 mice of each lineage (TR and TS); 6 of them used for survival evaluation, 12 used for pathological analysis and the remaining 5 used as controls. All of the C57BL/6 mice were used for survival evaluation. Experimental infection was done in triplicate. The mice were observed during an experimental window of 90 days, on a daily basis. Due to the rapid progression of

the disease mice died between monitoring sessions, but the ones found in a moribund state during the daily visit were euthanized with CO<sub>2</sub>. At the end of the experimental window, all the remaining mice were euthanized with CO<sub>2</sub>.

### Quantification of parasites on tissue culture

Parasitic burden evaluation was carried out in the liver and brain by a biological method using monkey kidney fibroblasts (VERO cells), modified from Zenner et al. [4], in triplicates. On the 21<sup>st</sup> day of infection, these organs from 3 TR and TS mice were collected, washed in PBS, weighed and macerated with a glass stick in PBS (2 ml of PBS for each 0.5 gram). The suspension was centrifuged (50 g, 10 min), and 200 µl of the supernatant was added to flasks (25 cm<sup>2</sup>) containing a monolayer of VERO cells in 5 ml of DMEM supplemented with 5% of FBS and 1% ciprofloxacin. After 48 h, the supernatants were collected, centrifuged (1000 g, 10 min), the pellet re-suspended in 1 ml and parasites counted in a Neubauer chamber. The number of parasites per gram of organ was calculated as follows: parasitic burden = parasite number per ml from tissue culture/organ weight (g). For each organ, the parasitic burden was expressed as a mean log value ± SD. The parasite burden was graphically represented on a linear scale versus the number of cysts used for infection (50 or 100 cysts).

### Quantification of brain cysts

Among the mice selected to evaluate the histopathology, unused survivors were chosen for evaluation of quantity and size of the cysts. 10 TR and 7 TS mice were used in total for this evaluation, 5 TR for each infection dosage, 4 TS mice for 50 cysts and 3 TS mice to 100 cysts infection. The number of brain cysts at the chronic phase of infection (90 days) was directly counted without staining. TR and TS mice brains were removed, homogenized in 1 ml of PBS and cysts were morphologically defined and counted under a microscope (40 × objective) on three aliquots of 20 µl.

### Immunofluorescence and quantification of parasites

Frozen sections, 6 µm thick, of liver, brain and ileum of mice infected for 14 days were fixed with acetone. Sections were rehydrated with incubation in a blocking solution (3% bovine serum albumin, 0,1% gelatin, 0,05% tween 20, 0,05% azide in distilled water) for 10 min. Sections were incubated with a polyclonal mice anti-*T. gondii* antibody for 60 min in a humid chamber, washed and further incubated with a secondary antibody conjugated with to Alexa 488 (Molecular Probes) for 60 min. Sections were washed and mounted with Prolong Gold containing DAPI (Molecular Probes), and cured for 24 h in the dark. Slides were observed in a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a HBO 100 W lamp and digital images were captured with the Axiovision software. Images were processed with similar linear adjustments in Photoshop (Adobe). Parasites in the captured images were quantified using the ImageJ free software

and ITCN plugin. The counting parameters were the following: Width – 7; MD – 3.5; Threshold 2.5. Parasites were evaluated in 3 images (20× objective) of 2 independent experiments of each organ and means  $\pm$  standard deviation values per mm<sup>2</sup> are given.

### *Toxoplasma gondii* quantification by quantitative real time PCR

Ileum sections of 0.5 cm of 3 infected mice at 7, 14 and 21 days post oral infection were collected, 5  $\mu$ l of extracted tissue DNA (described above) was added to a reaction mixture containing 10  $\mu$ l of MasterMix Real Time PCR – SYBR Green, 2  $\mu$ l of primers TOXO-F (5 mM, 5'-TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3') and TOXO-R (5 mM, 5'-AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG-3'), and 3  $\mu$ l of ultrapure water in a final volume of 20  $\mu$ l. PCRs were performed in a StepOnePlus System (Applied Biosystems). Amplification was performed on the 10 minute initial denaturation at 95°C, followed by denaturation at 95°C for 5 s, annealing at 60°C for 10 s and extension at 72°C for 15 s, 40 times. This was followed by melting curve analysis to check for the presence of primer dimers or other non-specific PCR products. The standard values of amplification were obtained using concentrations of isolated *T. gondii* with 10-fold serial dilutions, ranging from 10<sup>6</sup> to 1 parasite. This standard was then compared with the resulting fluorescence of the samples to calculate the number of parasites. Results are presented as means  $\pm$  standard deviation of a representative experimental out of three.

### Histopathology processing

At 7, 14 and 21 days of infection, 3 mice of each lineage were randomly chosen and euthanized with CO<sub>2</sub>. On the 7<sup>th</sup> day post infection, the ileum, spleen and liver were collected. At 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of infection, in addition to the organs mentioned above, eyes, brain, lungs and heart were also collected. The eyes were fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS for 24 h and sectioned in a sagittal plane, dividing the bulb into 2 hemispheres [20]. The other organs were fixed in 10% neutral buffered formaline in PBS for 24 h and processed for histopathology. Organs of infected mice were embedded in paraffin, sliced and stained with Hematoxylin-Eosin. The slides were observed in a Zeiss Axioplan light microscope, and digital images were captured with an AxioCam Mrc5 with the Axiovision system - Zeiss. Histopathological analysis was carried in all of the 3 experimental infections.

### Evaluation of cytokine production

The levels of cytokine production in the serum of non-infected mice or infected for 7, 14 and 21 days were evaluated in triplicates, using two Cytometric Bead Array kits from BD Biosciences: *Mouse Inflammation Kit* and *Mouse Th1/Th2 Kit*. The samples were prepared according to manufacturer's protocol. Data analysis was carried with the FCAP Array v2.0 software, by SoftFlow. Levels of cytokine are in pg/ml.

## Molecular characterization of the commensal intestinal microflora of mice

The ileum content of 3 non-infected mice was examined for the type of commensal microbiota using the primers listed at [Table 1](#). Luminal content was removed from the ileum of the mouse, resuspended in PBS, centrifuged (16,000 g for 10 min), pellet resuspended in lysis buffer (Tris 500 mM [pH 9.0], EDTA 20 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) and incubated with proteinase K (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) for 2 h at 56°C. Total DNA served as template for PCR amplification of bacterial 16S rRNA from different groups and genus (products size are indicated in [Table 1](#)). PCRs were performed in a final volume of 25 µl, consisting of 8.9 µl of ultrapure sterile water, 2 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.5 µl of reaction buffer (100 mM Tris-HCl, KCl 500 mM), 0.5 µl of dNTP mix, 0.5 µl of each primer, and 10 µl of extracted DNA (10 ng/µl). To these mixtures 0.1 µl of TaqDNA polymerase (Boehringer Mannheim) was added. Amplification cycles were performed in a Veriti DNA thermocycler (Applied Biosystems) according to [Table 2](#). 10 µl of the PCR amplification product were run in a 1.5% agarose gel, stained with GelRed, and images were captured in a UV transilluminator. Results are a representative independent experiment out of three.

## Statistical analysis

Statistical differences between the mice groups were determined by ANOVA and Student's *t* test; groups were considered statistically different if  $P \leq 0.05$ .

## Results

TR mice usually died in the initial phase of the disease and TS in the late phase, but TR that survived did so for 90 days

When infected with 50 cysts 100% of the C57BL/6 survived after the second week, while TS mice attained 95% survival and TR mice 60% ([Figure 1a](#)). In the late phase of the infection, after the third week, the TS mice infected with 50 ([Figure 1a](#)) or 100 cysts ([Figure 1b](#)) presented high sensitivity with 23 and 0% of

**Table 1.** Genus/groups, primers, size of the fragments and ATCC references of evaluated bacteria in the commensal intestinal microbiota of TR and TS mice.

Bacteria/Groups	Primer (F/R)	Fragments	Reference
<i>Bacillus</i> spp	TCGAAATTGAAAGGCGGC GGTGCCAGCTTATTCAAC	411 bp	ATCC 14579
<i>Bacteroides</i> (group)	ATAGCCTTTTCGAAAGRAAGAT CCAGTATCAACTGCAATTTTA	501 bp	ATCC 8482
<i>Clostridium</i> (group)	AAATGACGGTACTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	438-441 bp	ATCC 19403
<i>Enterobacteriaceae</i> (group)	CAGGTCGTACGGTAACAAG GTGGTTCAGTTTCAGCATGTAC	512 bp	ATCC 13048
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CACTTCGGTGATGACGTTGG CGATGCAGTTCCTCGGTTAAGC	575 bp	ATCC 4356
<i>Prevotella</i> spp	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTGCAGACC	527-529 bp	ATCC 49046
<i>Streptococcus</i> spp	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GTACCGTCACAGTATGAACCTTCC	500 bp	ATCC 25175

doi:10.1371/journal.pone.0113374.t001

**Table 2.** Genus/groups, number of cycles, and specific temperatures used to evaluate bacterial in the commensal intestinal microbiota of TR and TS mice.

Bacteria/Groups	Cycles	Denaturation	Annealing	Extension
<i>Bacillus</i> spp	35	Initial: 5 min 94°C/1 min	55°C/1 min	72°C/1 min Final: 4 min
<i>Bacteroides</i> (grupo)	40	Initial: 5 min 94°C/20 s	50°C/20 s	72°C/30 s Final: 5 min
<i>Clostridium</i> (grupo)	40	Initial: 5 min 94°C/20 s	50°C/20 s	72°C/30 s Final: 5 min
<i>Enterobacteriaceae</i> (grupo)	35	Initial: 5 min 94°C/30 s	60°C/30 s	72°C/1 min Final: 10 min
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	Initial: 5 min 95°C/30 s	63°C/30 s	72°C/30 s Final: 5 min
<i>Prevotella</i> spp	40	Initial: 5 min 94°C/20 s	55°C/20 s	72°C/30 s Final: 5 min
<i>Streptococcus</i> spp	30	Initial: 2 min 94°C/15 s	55°C/15 s	72°C/45 s Final: 5 min

doi:10.1371/journal.pone.0113374.t002

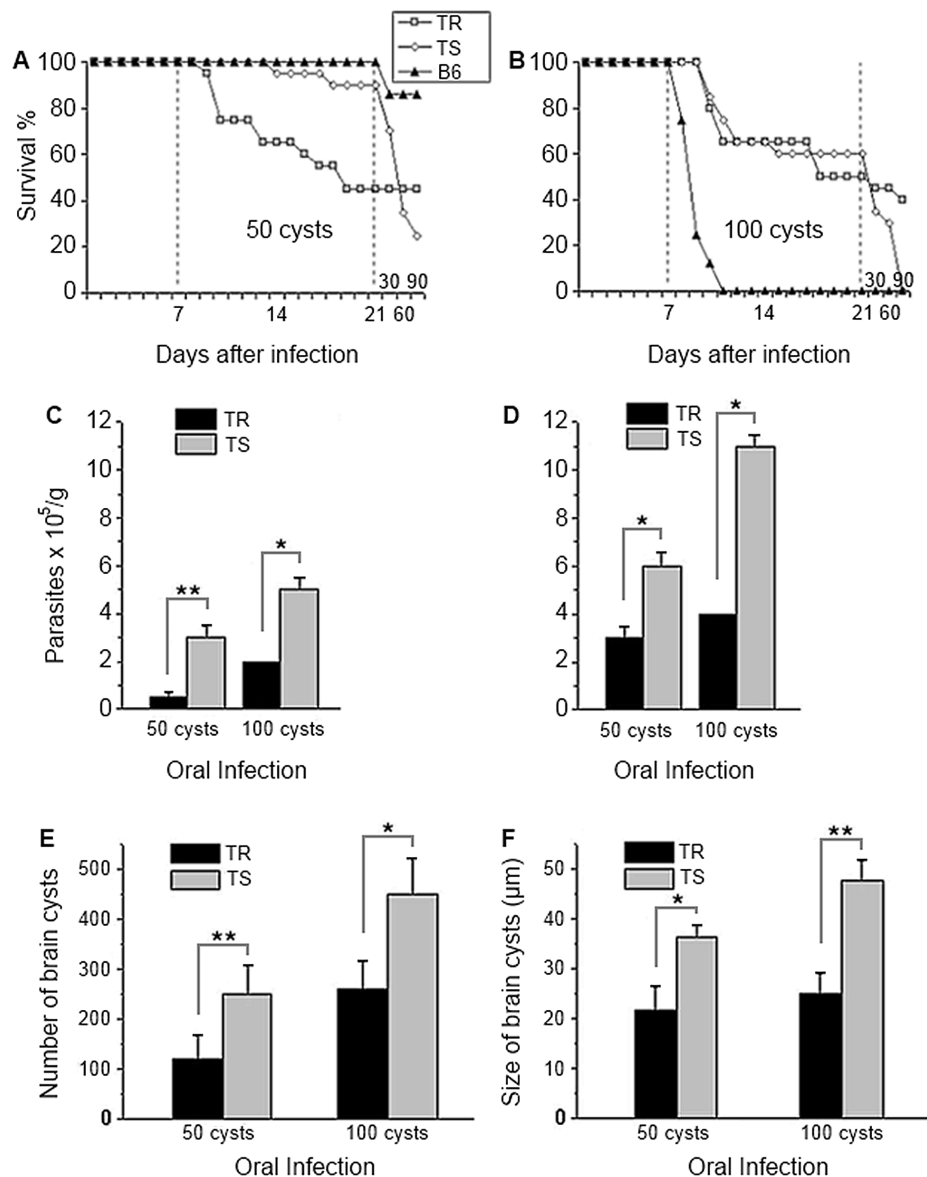
survival at the 90<sup>th</sup> day of infection, respectively. In this same period, there was no mortality of TR mice infected with 50 cysts (Figure 1a) while only 11% of the TR infected with 100 cysts died (Figure 1b).

As expected, C57BL/6 mice did not survive the 2<sup>nd</sup> week after the initial infection with 100 cysts (Figure 1b). In contrast to the C57BL/6 mice, both TR and TS mice responded similarly to the initial phase of the infection (until the end of the third week) presenting 50 and 60% of survival rate respectively (Figure 1b).

### Lower parasite burden in liver, brain and ileum of TR mice

The parasite burden was quantified in the liver and brain at 21 days of infection. When infected with 50 or 100 cysts, the TR presented significantly fewer parasites in both tissues than TS mice (Figure 1c and d). As expected, infection with 100 cysts resulted in greater parasite numbers than when infected with 50 cysts (Figure 1c and d). Cyst numbers and size were examined at 90 days of infection in the brain of mice. TS mice had more and larger cysts than TR mice regardless of the infection dosage (Figure 1e and f).

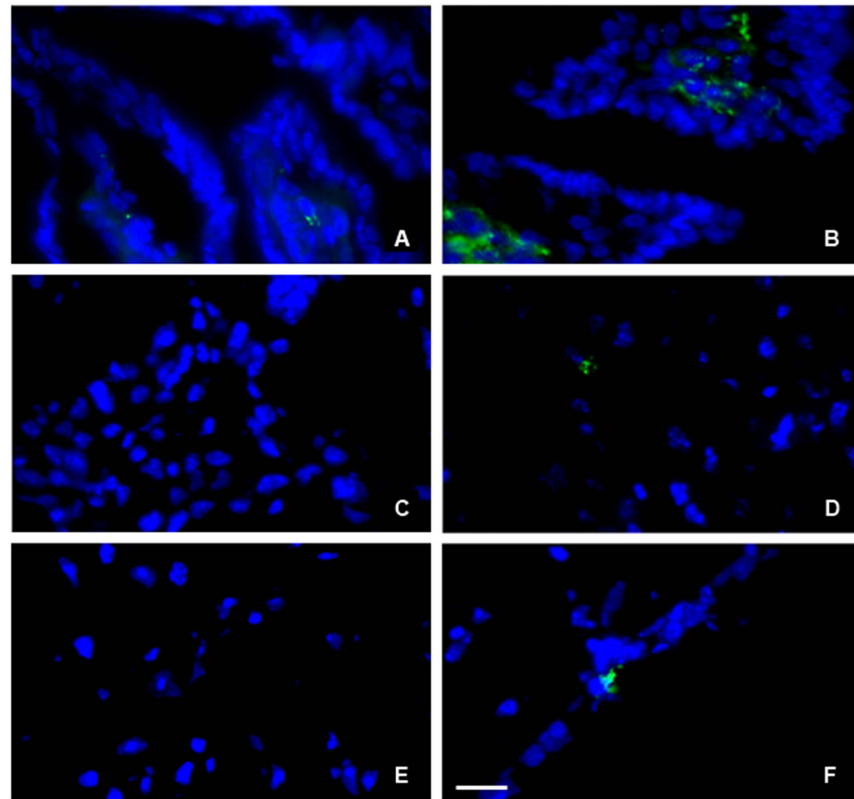
Immunofluorescence evaluation of parasite burden on ileum, liver and brain of infected mice with 100 cysts was done at 14 days of infection. TR mice displayed lower parasite burden in the ileum in relation to TS mice (Figure 2a and b). Quantification showed a mean of  $1580.3 \pm 404.35$  and  $361.3 \pm 90.16$  parasites per  $\text{mm}^2$  in the ileum of TS and TR mice, respectively. TS mice also presented parasites in the liver and brain (Figure 2d and f) and quantification showed a mean of  $160.9 \pm 45.63$  and  $260.8 \pm 95.62$  parasites per  $\text{mm}^2$ , respectively. Liver of TR mice were negative for anti-*T. gondii* and brain had  $28.98 \pm 40.98$  parasites per  $\text{mm}^2$  (Figure 2c and e). TR and TS control mice were negative for anti-*T. gondii* (not shown).



**Figure 1. Survival rates of TR, TS and C57BL/6 mice and parasite load on TR and TS after oral infection with *Toxoplasma gondii* cysts.** (A–B) The survival was evaluated during 90 days and is presented in percentage. C57BL/6 mice were used for comparative survival study with TR and TS mice. Representative data from three experiments, n=18 for TR, TS and C57BL/6. (C–D) Number of parasites  $\times 10^5$ /g of liver (C) and brain (D) of TR (black bar) and TS (gray bar) mice, 21 days after oral infection with 50 and 100 cysts of *T. gondii*. Data are from 3 independent experiments. Number (E) and size (F) of cysts evaluated in the brains of TR and TS mice at the chronic phase of the infection (90 days) after oral infection with 50 and 100 cysts of *T. gondii*. Means are from six mice per group in two independent experiments. Statistical differences by the Student *t* test are indicated by \* ( $p < 0.05$ ) or \*\* ( $p < 0.01$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g001

Quantitative real time PCR showed that after 7 days, TR mice had about 10 parasites per gram of tissue and TS mice almost five times more (Figure 3). After 14 days of infection, the amount of parasites in TR mice increased in relation to 7 days, as for TS with significant difference between both lineages (Figure 3). After



**Figure 2. Immunofluorescence analysis of parasite in the ileum, liver and brain of TR and TS mice.** Ileum of TR (A) and TS (B) mice. Note higher numbers of parasites in the TS ileum. Liver of TR (C) and TS (D) mice. Brain of TR (E) and TS (F) mice. The cells nuclei were stained by DAPI (blue); Green = Anti-*T. gondii*. Bar size: 25  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g002

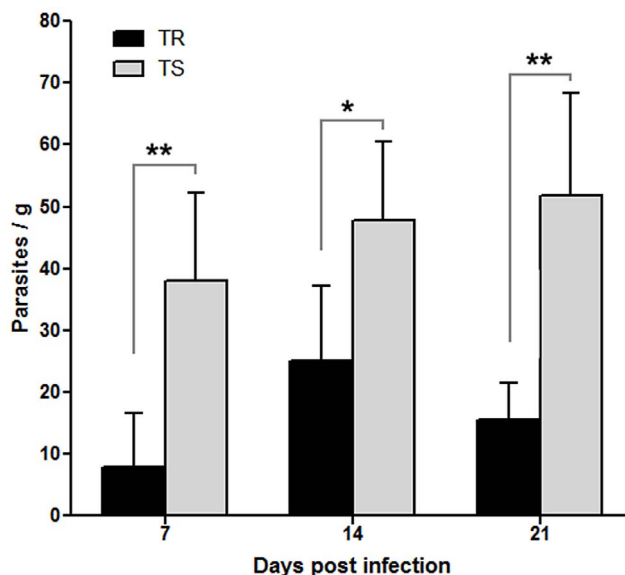
21 days, the number of parasites decreased in the TR mice, but TS mice showed a constant increase of parasites (Figure 3).

### Severe pathology in ileum, liver and spleen in TR mice in the early phase of infection

Severe necrosis of ileum villous of TR mice infected with 50 cysts was observed on the seventh day (Figure 4a). Intestinal alterations were not observed in the TS mice (Figure 4b) or in the non-infected control mice (not shown). The TR mice livers presented clear signs of inflammation at the beginning of the infection (7 days) such as numerous granulomas and hydropic degeneration. Focal fatty degeneration was also observed (Figure 4c). TS mice livers did not present granulomas or tissue degeneration at 7 days post-infection (Figure 4d).

The TR mice spleens presented general disorganization of the germinal centers at 7 days post-infection (Figure 4e) that persisted on the examined later time points. TS mice spleens exhibited no change in the organization of the germinal centers during the early phase of the infection (Figure 4f), similar to non-infected TR and TS mice.





**Figure 3. Parasite quantification in ileum of TR and TS mice, infected with 50 cists of ME-49, performed by real-time quantitative PCR.** Parasite burden in TR mice (black bar) reached a peak at 14 days of infection and lowered by 21 days, while TS mice (gray bar) showed a constant increase with infection. Values obtained by comparing the amount of fluorescence obtained from serial dilutions, ranging from 1 to  $10^6$  parasites. R2 value = 0.962. Results are from a representative experiment out of three.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g003

### Severe pathology in lung, brain and heart in TS mice in the later phase of infection

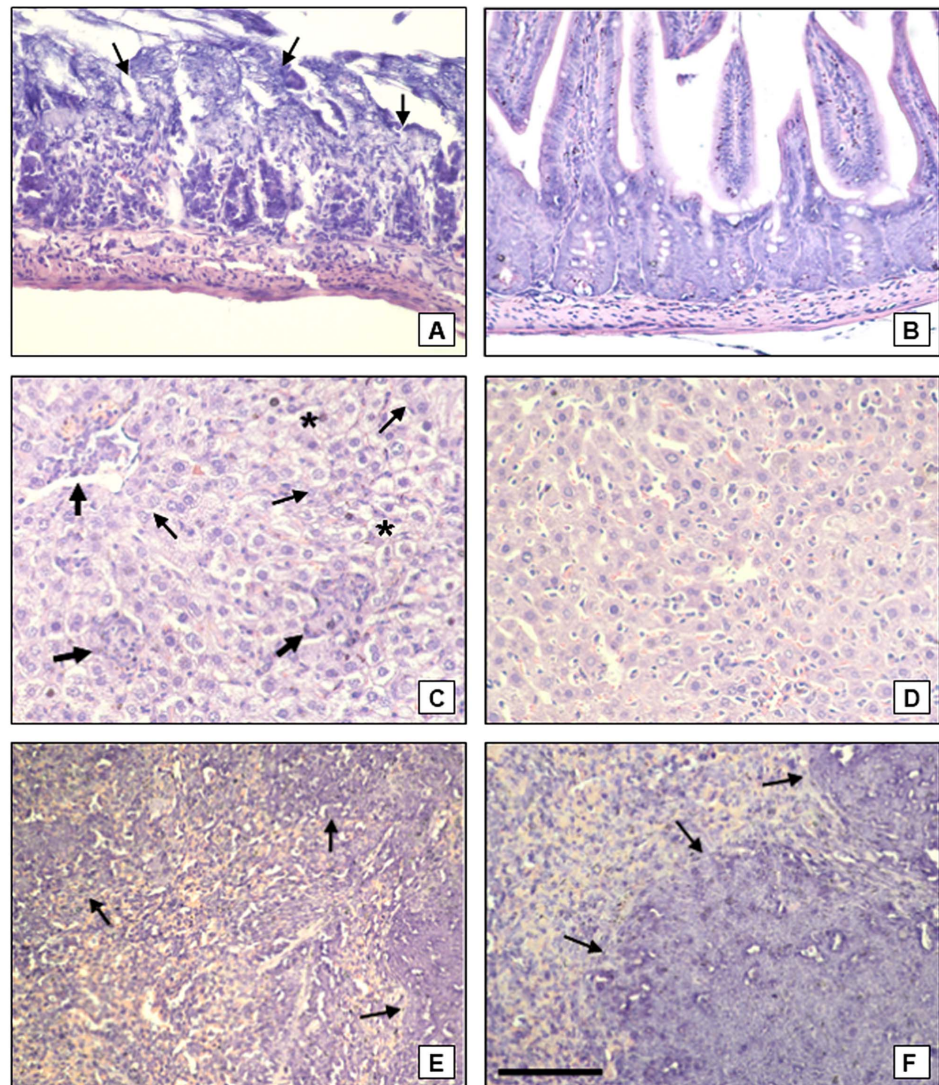
Lungs of TR mice displayed little thickening of the alveolar wall as well as few small lymphoid infiltrates (Figure 5a) compared to non-infected TR mice. Drastic modifications in lungs of TS mice were present in the chronic stage, such as general thickening of the alveolar wall and massive infiltration areas, as observed on the 21<sup>st</sup> day post-infection (Figure 5b).

TR mice brains presented small mononuclear infiltrates with no change during the infection period (Figure 5c). However, TS mice had mononuclear focal infiltrates, gliosis, perivascular cuffing (not shown) and meningitis (Figure 5d).

The heart evidenced pericarditis and sparse granulomas at 14 days of infection in TR mice (not shown). On the 21<sup>st</sup> day of infection, the TR mice showed no signs of inflammation (Figure 5e), but the TS mice had lymphoid infiltrates and granulomas of moderate density (Figure 5f).

### Inflammation of the ileum of TR mice caused by the infection resulted in surviving mice

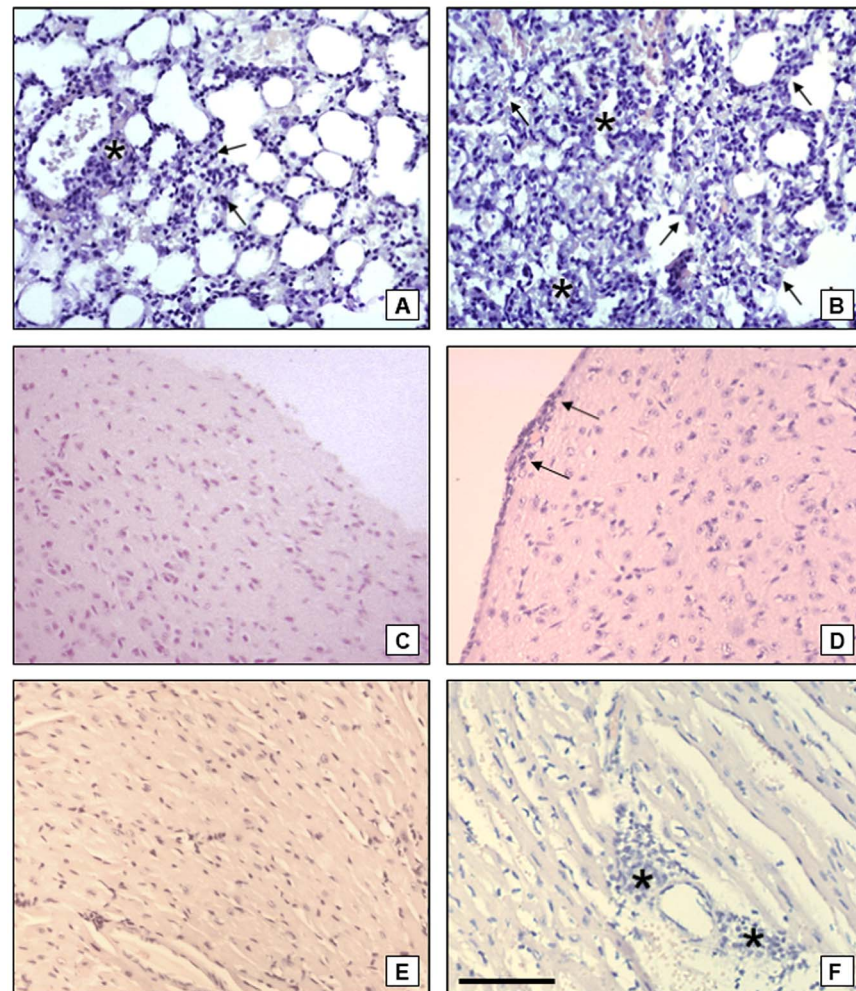
The TR mice displayed clear signs of ileal necrosis on incipient infection (Figure 6a), evolving to occasional areas of necrosis at day 14 (Figure 6c) and finally disappearing on day 21 (Figure 6e). TS mice had no classical ileal necrosis phenotype (Figure 6b, d and f). However, some mice exhibited small



**Figure 4. Representative figures of ileum, liver and spleen of TR and TS mice on the 7<sup>th</sup> day of infection with 50 cysts of *Toxoplasma gondii*.** (A) Ileum of TR mice. Severe necrosis of the villi (arrows) can be observed. (B) Ileum of TS mice with normal architecture of the villi and cripts; (C) Liver of TR mice. Severe hydropic degeneration present throughout the tissue (small arrows), associated with focal fatty degeneration (asterisks) and moderate dense granulomas, irregularly distributed (large arrows) can be seen. (D) Liver of TS. The tissues do not display any noticeable alteration. (E) Spleen of TR mice. The spleen shows disorganized germinal centers (arrows) with increased cellularity of the organ at day 7 post-infection. (F) Spleen of TS mice. Organized, well defined germinal centers (arrows), and characteristic lymphoid depletion can be observed at day 7 post-infection. Bar = 100  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g004

mononuclear infiltrates (not shown). The intestinal inflammation evaluation of TR mice until its resolution was possible by its longer survival, differently from isogenic mice.

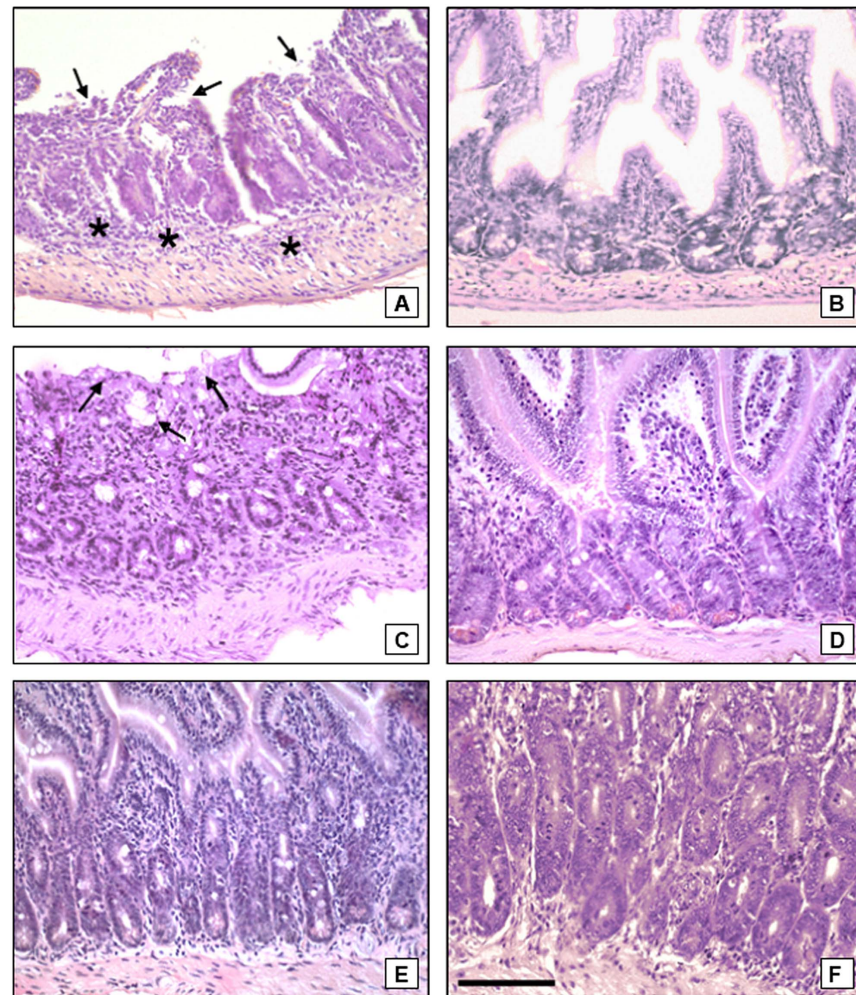


**Figure 5. Representative figure of lung, brain and heart of TR and TS mice on the late phase (21<sup>st</sup> day) of infection with 50 cysts of *Toxoplasma gondii*.** (A) Lung of TR mice. Little thickening of the alveolar wall (arrows) can be seen, with presence of few lymphoid infiltrates (asterisk). (B) Lung of TS mice. Areas of inflammation, indicated by the presence of granulomas (asterisks), and thickening of alveolar walls (arrows), caused by the migration of mononuclear cells are observed. (C) Brain of TR mice. There are no alterations throughout the tissue. (D) Brain of TS mice. Increased number of lymphoid cells can be seen in the meninges (arrows), suggesting the development of meningitis. (E) Heart of TR mice. Normal tissue structure can be seen. (F) Heart of TS mice. Mildly dense granulomas (asterisks) can be observed in some areas of the heart. Bar = 100  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g005

## Retinochoroiditis and other disorders in the retina in TR and TS mice at 21 days of infection

Histopathological data revealed that 80% of the TR mice showed ocular inflammatory infiltrates often observed in the inner plexiform layer, ganglion cell layer (Figure 7a) around the vessels and in the vitreous (Figure 7b). The lesions were characteristic of retinochoroiditis with changes in the disposition and morphology of the retina layers, such as the outer segments of the photoreceptors,



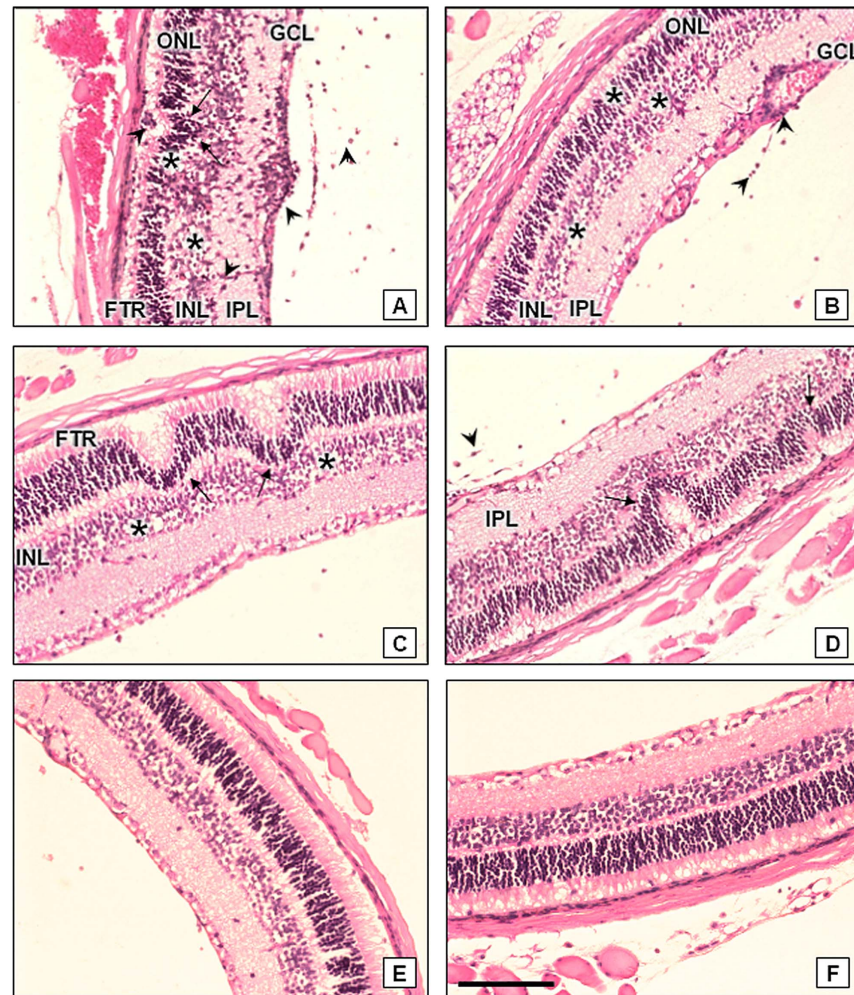
**Figure 6. Ileum inflammation kinetic of TR and TS mice caused by *Toxoplasma gondii* 100 cysts infection.** (A) TR mice, at 7 days of infection. Infiltration of lymphoid cells in the villi and lamina propria (asterisks) and necrosis of villi (arrows) can be seen. (B) TS mice, 7 days after infection. Preserved villi and lamina propria free of infiltrates are observed. (C) TR mice, 14 days after infection. Occasional areas of necrosis (arrow) are seen. (D) TS mice, at 14 days of infection. Preserved villi and lamina propria free of infiltrates can be observed. (E) TR mice, 21 days after infection. Healthy villi can be observed. (F) TS mice, 21 days after infection. Villi have normal appearance. Bar = 100  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g006

outer nuclear layer, outer plexiform layer and inner nuclear layer (Figure 7a and c). Only 33% of the TS mice had lesions in the retina, with a mild inflammatory infiltrate in the vitreous and inner plexiform layer (Figure 7d). Noninfected TR (Figure 7e) and TS (Figure 7f) mice display normal retina architecture.

### TR mice showed inflammatory cytokine profile

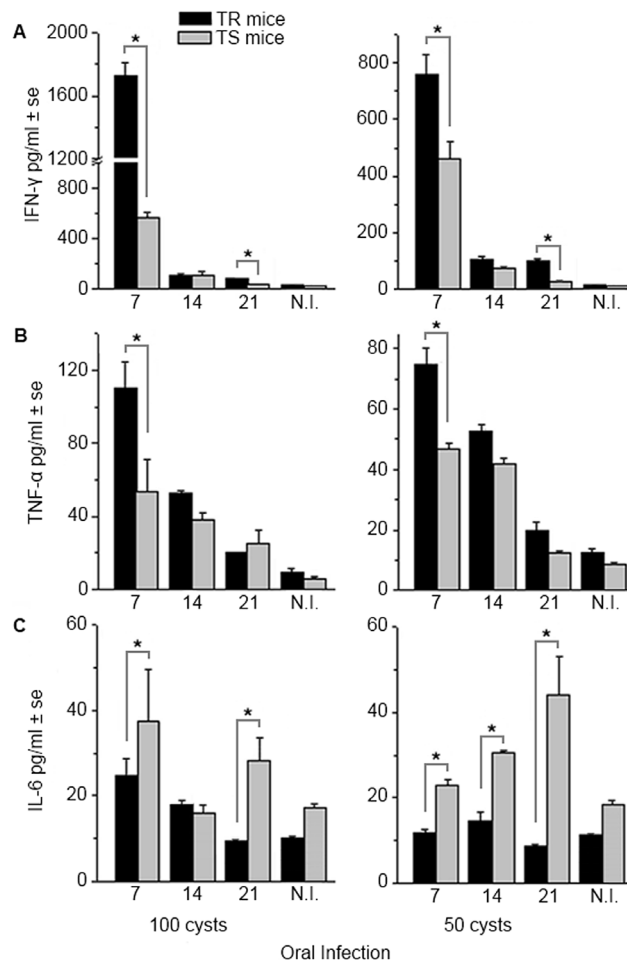
IFN- $\gamma$  production was higher in TR mice at the beginning (7 days) and later (21 days) at the infection independently if the 100 or 50 cysts were used (Figure 8a).



**Figure 7. Retinae of TR and TS mice during the course of oral infection with 100 cysts of *Toxoplasma gondii*.** (A) TR mice, at 21 days of infection. Note focal retinochoroiditis (arrows), with alterations in the disposition and cytoarchitecture of the layers of the retina; intense inflammatory infiltrate (arrowheads) in the outer segment of photoreceptors (FTR), inner plexiform layer (IPL), ganglion cell layer (GCL), and the vitreous body. Edema (asterisks) were frequently observed in the inner (INL) and outer nuclear layers (ONL). (B) TR mice, at 21 days of infection. Vasculitis (arrowheads) and inflammatory infiltrate in the IPL, GCL and vitreous and edema in ONL and INL (asterisks). (C) TR mice, at 21 days of infection. Multifocal retinochoroiditis (arrows), resulting in complete dissociation of the FTR, and frequent edema (asterisks) in the INL can be observed. (D) TS mice, after 21 days of infection. Retina showing multiple foci of retinochoroiditis (arrows), with mild inflammatory infiltrate in the IPL and in the vitreous (arrowhead). (E) Non infected TR mice. Preserved cytoarchitecture of retina. (F) Non infected TS mice. Absence of alterations in the layers of the retina. Bar = 100  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g007

TNF- $\alpha$  production had a similar production trend as IFN- $\gamma$  on the 7<sup>th</sup> day of infection; no difference between these mice was detected later on during the infection (Figure 8b). Both of these cytokines lowered the levels of production with infection time and 100 cyst infection resulted in higher production levels (Figure 8a and b). When 100 cysts were used to infect mice, IL-6 production was significantly higher in TS mice only at 7 and 21 days of infection (Figure 8c). IL-6



**Figure 8. Cytokines concentration in sera (pg/ml) of TR and TS mice measured on days 7, 14 and 21 after the oral infection with 100 and 50 cysts of *Toxoplasma gondii*.** (A) Concentration of IFN- $\gamma$ . The TR mice presented about 3 times higher concentrations than TS mice at 7 days of infection. The titers dropped at 14 and 21 day both in TR and TS mice, but TR mice presented higher values on the 21<sup>st</sup> day of infection compared with TS mice. (B) Concentration of TNF- $\alpha$ . The titer was higher in the TR mice than in TS mice, especially during the acute stage of toxoplasmosis. Along the course of the disease, concentration of TNF- $\alpha$  in both groups of mice displayed lower titers. (C) Concentration of IL-6. TS mice displayed higher titers of IL-6 during the course of infection compared with the TR mice. Both infected lineages presented higher concentrations, when confronted with non-infected mice. N.I. – non-infected. Bars represent the mean  $\pm$  SE of three experiments with five mice per group. Statistical differences by the Student *t* test are indicated by \* ( $p < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g008

production increased in TS mice with the course of the infection when 50 cysts were used; TR mice presented similar low levels of this cytokine (Figure 8c).

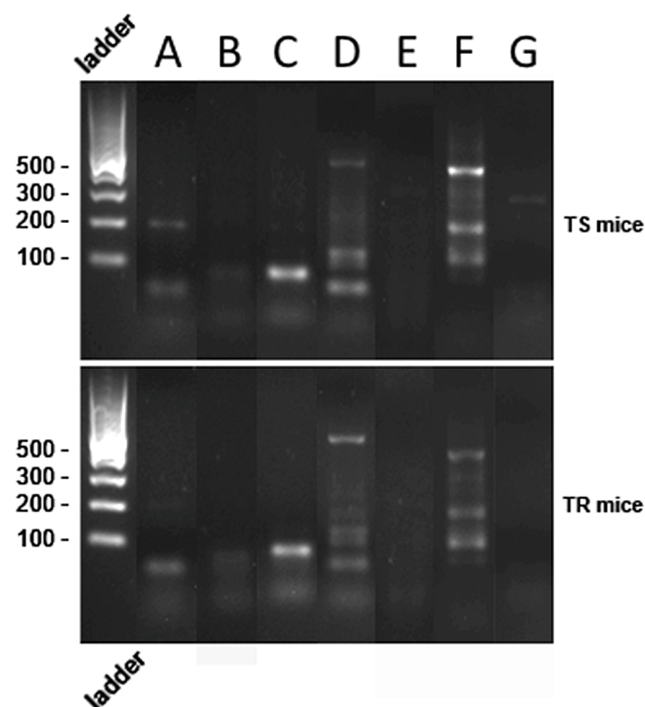
### TR and TS mice presented similar commensal intestinal microbiota profiles

Because the commensal intestinal microbiota determines the inflammatory result of *T. gondii* oral infection in mice [7, 15], the presence of classical groups and

genera of bacteria composed of Gram-positive and Gram-negative, aerobic and anaerobic, were evaluated in TR and TS mice (Table 1). PCR analysis showed that both mice lineages had a similar bacteria profile, mainly composed of *Enterobacteriaceae* and *Prevotella* spp. (Figure 9). The bands observed for *Bacillus* spp., *Bacterioides* and *Clostridium* (Figure 9) are outside the expected amplification size (Table 1) and, thus, are negative. The other genera showed no amplification products (Figure 9).

## Discussion

When infection is through the oral route, *T. gondii* enters the organism by first infecting epithelial cells in the intestine, crossing the basal membrane and migrating within the lamina propria [5]. There, dendritic cells (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) and macrophages (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>) are infected and are probably responsible for the dissemination of the parasite through blood to distant sites [32]. *Toxoplasma gondii* infection can cause different clinical manifestations and the immune response, both locally and systemically, vary among individuals by their diverse



**Figure 9. TR and TS mice have similar commensal ileal microbiota evaluated by PCR.** (A) *Bacillus* spp.; (B) *Bacterioides* group; (C) *Clostridium* spp.; (D) *Enterobacteriaceae*, PCR product around 500 bp; (E) *Lactobacillus acidophilus*; (F) *Prevotella* spp. PCR product around 500 bp; (G) *Streptococcus* spp. Non-infected TR and TS mice were at the same housing conditions. Bacteria were identified by comparative sequence analyses of 16S rRNA gene fragments amplified from reference species. Gel stained with GelRed, images captured under UV transilluminator. Note similar results for both mice lineages. Results are from a representative experiment out of three.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.g009

genetic backgrounds and immune status [33]. In this study, TS and TR mice were showed to be useful models for toxoplasmosis after oral infection. A summary of the results obtained with both mice lineages are in Table 3. TR mice demonstrated a high mortality rate in the early phase of the infection with both cysts dosage, maintaining about 40% of survival rate at 90 days of infection. TS mice presented lower mortality in the early phase of the infection, but only 23% survival after infection with 50 cysts, and 0% survival with 100 cysts at the 90<sup>th</sup> day post-infection. During the acute stage, the TR mice carried a lower parasite load in the ileum, liver and brain than TS mice. Extensive ileum necrosis was observed in TR mice, whereas TS mice presented less alteration, characterized as small points of sequelae. Moreover, TR mice had a clear pro-inflammatory cytokine profile based on elevated IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  profiles, and small IL-6 production. Thus, TR mice, due to their high inflammatory response, may die during the early stages of

**Table 3.** Summary of the results obtained with TR and TS mice after infection with *Toxoplasma gondii*.

	TR	TS
<b>Acute survival</b>	50 cysts infection, mice presented 61% survival at 14 <sup>th</sup> day, reaching 44% at 21 <sup>st</sup> day. 100 cysts infection, mice presented 61% survival rate at 14 <sup>th</sup> day, and 50% at 21 <sup>st</sup> day.	50 cysts infection 94% of mice survived until 14 <sup>th</sup> day, and 89% survived until 21 <sup>st</sup> day. 100 cysts for infection, mice presented 61% survival at 14 <sup>th</sup> day, and 55% at 21 <sup>st</sup> day.
<b>Chronic survival</b>	For 50 cysts infection, 44% of the mice survived until 90 <sup>th</sup> day. Using 100 cysts, mice presented 44% survival at 30 <sup>th</sup> and 60 <sup>th</sup> day, reaching 39% survival at 90 <sup>th</sup> day.	50 cysts infection, 72% survived at 30 <sup>th</sup> day, decreasing to 23% survival at 90 <sup>th</sup> day. 100 cysts infection, 38% of the mice survived at 30 <sup>th</sup> day, and none of them survived at 90 <sup>th</sup> day.
<b>Parasitic load</b>	Infected TR mice presented fewer parasites in both liver and brain, when compared to TS mice. Immunofluorescence quantification showed, in a similar manner, less parasites in ileum and brain. Quantification by qPCR demonstrated a small quantity of parasites in ileum at day 7, an increase by day 14, and decreased by day 21.	TS mice presented more parasites in the liver and brain after infection. Immunofluorescence quantification showed four times more parasites in the ileum, more parasites in the brain and presence of parasites in the liver. qPCR quantification showed almost five times more parasites than TR mice, and a continual increase in this number along the infection.
<b>Inflammation</b>	The ileum, liver and spleen of infected TR mice displayed signals of acute infection, mainly at 7 and 14 days of infection. In the ileum these inflammation signs reverted back to a normal state by 21 days of infection. Brain, lungs and heart showed little or no significant alterations.	TS mice ileum, spleen and liver did not show signs of inflammation in the 7 <sup>th</sup> day of infection. The ileum kept its normal appearance by 21 <sup>st</sup> day of infection. Lungs, brain and heart, at 21 <sup>st</sup> day, presented signs of inflammation, respectively.
<b>Retinitis</b>	33% of the mice presented inflammatory infiltrations in the vitreous and inner plexiforma layer, with edema.	80% of the mice presented alterations in the ocular cytoarchitecture, with vasculitis, edema, inflammatory infiltrates and dissociation of photoreceptor layer.
<b>Seric IL-6</b>	Mice infected with 50 cysts had no significant alteration in IL-6 production. Infection with 100 cysts caused an increase in IL-6 production at the 7 <sup>th</sup> day of infection, decreasing by the 14 <sup>th</sup> day with normal level at the 21 <sup>st</sup> day.	At 7 <sup>th</sup> day of infection with 50 cysts IL-6 increased, double the normal production by the 21 <sup>st</sup> day. 100 cysts infection highly increased the levels of IL-6 that decreased to normal level at the 14 <sup>th</sup> day.
<b>Seric IFN-<math>\gamma</math></b>	IFN- $\gamma$ was high at the 7 <sup>th</sup> day, decreasing at 14 <sup>th</sup> day and maintaining the same quantity at 21 <sup>st</sup> day post infection. At 7 <sup>th</sup> and 21 <sup>st</sup> days, the levels were higher than in TS mice.	IFN- $\gamma$ for TS mice increased to near 500pg at day 7 of infection, dropped at day 14, almost to the same as TR mice. In the 21 <sup>st</sup> day, the levels of IFN- $\gamma$ in TS mice were similar to normal levels.
<b>Seric TNF-<math>\alpha</math></b>	TNF- $\alpha$ at day 7 was high, at 14 days of infection the levels started to decrease and continued at 21 <sup>st</sup> day, although not to normal value.	TNF- $\alpha$ level in TS mice were always lower than in TR mice with similar decreasing behavior with infection.

doi:10.1371/journal.pone.0113374.t003



toxoplasmosis from intestinal necrosis. Moreover, TR mice survival at the late phases after infection may be explained by their intense inflammatory response controlling the proliferation of the parasite during the initial stages of infection, allowing the mice to have a milder illness and survive to late periods of infection. This is corroborated by the fact that TR mice possess few CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells, producing low anti-inflammatory cytokines levels which imply a high inflammatory potential [26, 28]. TS mice, on the other hand, carry high numbers of regulatory T cells CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, thus, better regulating the inflammatory response [26, 28]. The 100% mortality rate of C57BL/6 were expected, occurring after de second week after infection, due to the intense inflammatory responses in this mice line. This characteristic is due to the mouse single genome (no genetic variance), a hindrance for this animal as a model for human disease studies involving a complex genetic and environmental etiology [34, 35].

In the early infection, TR mice displayed intense lesions in the ileum, liver and eyes, as well as disorganization of the germinal centers of the spleen, suggesting a strong immune response in the pathogenesis. This gains further strength after detection of higher levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and lower level of pleiotropic cytokine IL-6 in these mice during the initial stage of infection. C57BL/6 also produce high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [7] leading to a similar outcome as TR mice, with notable exception of the eye infection that is not detected in the former mice line. For the TS mice, the production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  was lower than for TR mice during the acute stage, and in the early chronic stage these levels were almost the same as non-infected mice, but IL-6 levels were greater. It is known that increased levels of IL-6 antagonize IL-12 and IFN- $\gamma$  production, resulting in a profound anti-inflammatory signal that blocks the generation of protective Th-1-type immunity to *T. gondii* [36]. Similar results were observed after *L. amazonensis* infection, where TR mice presented intense inflammatory lesions and high cellular immune responses with low parasite load and low anti-inflammatory cytokine levels, in contrast to TS mice which had few inflammatory lesions and low cellular immune responses with high parasite load and high anti-inflammatory cytokine levels [30].

It is known that the composition of the commensal intestinal microflora is important in the inflammatory response outcome in mice after *T. gondii* oral infection [7, 15]. Both mice lineages used in this study presented similar composition of the commensal intestinal microflora. However, distinction on the size of the amplified bands of *Prevotella* spp and *Enterobacteriaceae* was observed between TR and TS mice suggesting that there may be a quantitative difference in these bacterial population. Colonization of mice intestine with *Prevotella copri* increases the sensitivity to chemical induced colitis due to its pro-inflammatory potential [37]. Thus, the inflammatory differences seen in TR and TS mice may be influenced by quantitative differences of intestinal microflora. Further experiments modulating the commensal intestinal microflora of these mice may be important to further probe into their inflammatory response after *T. gondii* infection.

Gazzinelli et al. [38] reported that IL-10 knockout (KO) mice inoculated with *T. gondii* of the ME-49 strain, succumbed within the first two weeks of the infection, presenting a massive generalized lymphocytic infiltration with extensive hepatic necrosis and no evidence of enhanced parasite proliferation and inflammation in the central nervous system. Half of TR mice died by the third week after oral infection with *T. gondii* exhibiting ileum and hepatic injury despite the lower parasite load. However, after this period there was a recovery and long survival of the remaining TR in contrast to the TS mice that presented massive infiltration of mononuclear cells in the lungs, heart and brain and increased parasite load, as well as larger cysts in the brain. The high survival of TS mice infected with 50 cysts during the initial stage of infection can be explained by low-inflammatory response. Even when infected with 100 cysts, although survival decreased, histopathological data of TS mice indicated low inflammatory response, which allowed the maintenance of tissue integrity. In both cases, higher levels of IL-6 were detected, suggesting that this cytokine plays a fundamental role in this system. Stumhofer et al. [39] identified a new pathway reporting that IL-27 and IL-6 induced T helper type 1 and 2 cells, as well as T helper cells that produce IL-17, to secrete IL-10. Low inflammatory activity of TS can be explained by its high production of IL-6, limiting inflammatory responses by induction of IL-10 production and by its inhibitory effects on IL-12 and IFN- $\gamma$  [36, 39, 40]. The high levels of IL-6 observed in TS mice infected with 100 cysts could be induced by the elevated number of parasites inoculated, leading to a strong inhibition of Th-1 response, and possible induction of IL-17 production via Th-17 cells, effectively limiting the ability of these mice to control the parasite replication [39]. The elevated levels of this cytokine could also be correlated with the pathology observed in the lungs and brain of the TS mice [36]. It is known that the TS mice submitted to different inflammatory and allergenic stimuli respond with a high level of IL-10 [26, 27, 30]. However, further studies on the evaluation of cytokines such as IL-10, IL-12 and IL-17 becomes necessary for the TR and TS mice.

Classical intestinal necrosis in TR mice infected with 50 or 100 cysts was observed not only early in infection but also at the 21<sup>st</sup> day when recovery was ensued. Similar intestinal inflammation caused by *T. gondii* oral infection was observed in C57BL/6 mice, but only after infection with high cysts numbers. However, in this later model, no mice survived to the 2<sup>nd</sup> week, limiting the study of inflammation as previously described by Liesenfeld et al. [41]. In TR mice, however, we observed the recovery of ileum after the second week of infection. This is supported by the reduction of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production at the end of the acute (14<sup>th</sup> days) and beginning of the chronic stage (21<sup>st</sup> days) of the infection, suggesting a resolution of the inflammatory reaction in TR mice that survived the acute phase of the infection. In humans, IBDs such as ulcerative colitis or Crohn's disease frequently cause epithelial damage in the intestine. In general, the intestinal epithelium is able to rapidly repair itself by restitution, proliferation and differentiation of epithelial cells when such tissue damage occurs [42]. It is also evident that IL-10 produced by T cells can inhibit inflammation in the gut and thus the development of severe enterocolitis [43, 44]. In

toxoplasmosis, Tregs are essential during protection in early phase of *T. gondii* infection. Depletion of CD25<sup>+</sup> led to a rise in mortality in resistant BALB/c mice infected with *T. gondii* [45]. Further experiments are necessary to determine if these cells are involved in the resolution of the inflammation in TR mice that survived the initial phase of the infection.

The immune privilege within the eye is maintained by a combination of anatomical, physiological and immuno-regulatory mechanisms, including immunosuppressive factors such as IL-10, produced by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells [46]. Considering that *T. gondii* infection is acquired through the oral route, potential mechanisms for parasite dissemination from the intestinal lumen to the brain and retina have been considered [19]. However, there is a lack of animal models for ocular toxoplasmosis after oral infection [23]. Our experimental results demonstrate that 80% of the TR mice infected with 100 cysts by the oral route developed lesions characteristic to retinochoroiditis. Merely 33% of the TS mice had lesions in the retina. Thus, TR mice orally infected constitute a suitable model for the study of retinochoroiditis and lesions in the retina. It was described in the literature that differences in gender have been shown to affect susceptibility to *T. gondii* infection in murine models using the intraperitoneal and peroral route of infection [47]. However no sex susceptible difference after *T. gondii* infection was observed in TR or TS model.

## Conclusions

We suggest that the tolerogenic activity of TS mice through the action of anti-inflammatory cytokines by regulatory cells is able to decrease inflammatory immune responses caused by *T. gondii* infection, promoting better survival of mice during the early phase of the infection with 50 cysts, but leading to poor parasite control and an increased number of cysts and growth of parasites in late stages of the infection with both doses of infection. This is further corroborated by the higher production of IL-6 by these mice, which has an indirect anti-inflammatory action against TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . The high mortality of TR mice in the early phase and low mortality in the late phase, together with the lower number of cysts and parasites, suggest that the higher immune capacity of TR mice enables control of parasite growth already upon incipient infection. Moreover, the immunogenic and inflammatory profile of TR mice may play a crucial role in the lesions, presence of inflammatory infiltrates and granulomas in the ileum, eyes, liver and spleen. In contrast to TS mice, the low level of pleiotropic cytokines like IL-6 (seen here) and regulatory cytokines like IL-10 [30] in TR mice may be pointed as a mechanism responsible for these lesions and render them unable to counteract the inflammatory effect induced by the infection. Hence, the mortality and pathology of orally infected TS and TR mice in this study is in accordance with their oral tolerance profiles provided by several generations of cumulating genes for high and low tolerogenicity, respectively, reinforcing their validity as a model for *T. gondii* infection studies.

## Acknowledgments

We are grateful to Ms. Rosemary Maciel and Mr. Fábio Oliveira (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, CBB, UENF), Mr. Luciano de Almeida (Laboratório de Sanidade Animal, CCTA, UENF), Ms. Juliana Azevedo da Silva (Laboratório de Biologia do Reconhecer, UENF) for the technical assistance, Mr. Cid Couto and Ms. Marcia Giesta for care of the animal colonies (Laboratório de Imunobiologia, DGen, UERJ). The authors express their appreciation to Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira and Dr. Oliver Liesenfeld. English review and revision by Mitchell Raymond Lishon, UCLA, Chicago, Illinois and Andrea Carvalho César. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Estadual do Norte Fluminense (FENORTE) and Oswaldo Cruz Institute.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KSC ACS RAD MFSS. Performed the experiments: RRFD CCSL. Analyzed the data: RRFD ECQC KSC RCT ACS RAD MFSS. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACS RAD. Wrote the paper: RRFD KSC ACS RAD MFSS.

## References

1. **Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM** (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217–1258.
2. **Dubey JP** (2004) Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126: 57–72.
3. **Dubey JP** (1997) Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: phase conversion pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44: 592–602.
4. **Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF** (1998) *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 90: 86–94.
5. **Barragan A, Sibley LD** (2002) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* 195: 1625–1633.
6. **King MD, Lindsay DS, Holladay S, Ehrich M** (2003) Neurotoxicity and immunotoxicity assessment in CBA/J mice with chronic *Toxoplasma gondii* infection and multiple oral exposures to methylmercury. *J Parasitol* 89: 856–859.
7. **Liesenfeld O** (2002) Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis* 185: S96–101.
8. **Tedesco RC, Vitor RWA, Brandão GP, Calabrese KS** (2007) Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. *Micron* 38: 729–733.
9. **Johnson J, Suzuki Y, Mack D, Mui E, Estes R, et al.** (2002) Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 32: 179–185.
10. **Williams DM, Grumet FC, Remington JS** (1978) Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 19: 416–420.

11. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y (1996) Association of CD4+T cell-dependent, IFN-g-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184: 597–609.
12. Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, et al. (2007) Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56: 941–948.
13. McGovern D, Powrie F (2007) The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 56: 1333–1336.
14. Lidar M, Langevitz P, Barzilai O, Ram M, Porat-Katz BS, et al. (2009) Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 640–648.
15. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, et al. (2007) Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4. *PLoS ONE* 2: e662.
16. Pavesio CE, Lightman S (1996) *Toxoplasma gondii* and ocular toxoplasmosis: pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 80: 1099–1107.
17. Calabrese KS, Tedesco RC, Zaverucha VT, Barbosa HS (2008) Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. *Micron* 39: 1335–1341.
18. Lu F, Huang S, Hu MS, Kasper LH (2005) Experimental ocular toxoplasmosis in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* 73: 5160–5165.
19. Wallace GR, Stanford MR (2008) Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Clin Exp Immunol* 153: 309–315.
20. Tedesco RC, Smith RL, Corte-Real S, Calabrese KS (2005) Ocular toxoplasmosis in mice: comparison of two routes of infection. *Parasitology* 131: 303–307.
21. Hay J, Lee WR, Dutton GN, Hutchison WM, Siim JC (1984) Congenital toxoplasmicroretinochoroiditis in a mouse model. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 109–116.
22. Lahmar I, Guinard M, Sauer A, Marcellin L, Abdelrahman T, et al. (2010) Murine neonatal infection provides an efficient model for congenital ocular toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 124: 190–196.
23. Gormley PD, Pavesio CE, Luthert P, Lightman S (1999) Retinochoroiditis is induced by oral administration of *Toxoplasma gondii* cysts in the hamster model. *Exp Eye Res* 68: 657–661.
24. Silva AC, Souza KW, Machado RC, Silva MFS, Sant'Anna AO (1998) Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. *Res Immunol* 149: 151–161.
25. Vaz NM, Maia LCS, Hanson DG, Lynch JM (1977) Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol* 60: 110–115.
26. Silva MFS, Silva AC, Nóbrega A, Barja-Fidalgo TC, Cunha F (2004) Genetic selection for susceptibility to oral tolerance leads to a profound reduction of the acute inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 1029: 398–401.
27. Silva MFS, Bianchi C, Nóbrega A, da Silva AC, Sant'Anna AO (2006) Genetic selection for extreme phenotypes of oral tolerance is strongly associated with the atopic potential of the individual. *Clin Exp Allergy* 36: 1–9.
28. Silva MFS, Kamphorst A, Hayashi E, Bellio M, Carvalho C, et al. (2010) Innate profiles of cytokines implicated on oral tolerance correlate with low- or high-suppression of humoral response. *Immunology* 130: 447–457.
29. Silva AC, Lopes LM, Tavares DA, Araújo LMM, Ribeiro OG (2001) Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. *Microbes Infect* 3: 1–8.
30. Tavares D, Ribeiro RC, Silva AC (2006) Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microbes Infect* 8: 957–964.
31. Brandtzaeg P (1996) History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* 778: 1–27.

32. Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâté D, et al. (2006) CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309–316.
33. Suzuki Y, Remington JS (1993) Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Res Immunol* 144: 66–79.
34. Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, et al. (2010) Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol* 16: 176–183.
35. Geary RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML (2010) Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* 25: 325–333.
36. Silver JS, Stumhofer JS, Passos S, Ernst M, Hunter CA (2011) IL-6 mediates the susceptibility of glycoprotein 130 hypermorphs to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 187: 350–360.
37. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, et al. (2013) Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2: e01202. doi: 10.7554/eLife.01202.
38. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Schariton-Kersten T, Cheever A, et al. (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157: 798–805.
39. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, et al. (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8: 1363–1371.
40. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ (2007) Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25: 221–242.
41. Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, et al. (1999) TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 21: 365–376.
42. Okamoto R, Watanabe M (2005) Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci (Suppl 1)*: 34–38.
43. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263–274.
44. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, et al. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28: 546–558.
45. Tenorio EP, Olguín JE, Fernández J, Vieyra P, Saavedra R (2010) Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol* ID 786078.
46. Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY (2003) CD25+, interleukin-10-producing CD4+ T cells are required for suppressor cell production and immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Immunology* 110: 18–29.
47. Roberts CW, Cruickshank SM, Alexander J (1995) Sex determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infection and Immunity* 63: 2549–2555.