

**Marta Marques Maia**

**Expressão gênica de citocinas em pacientes com  
toxoplasmose sintomática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientadora:** Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chiocola.

**Coorientadora:** Profa. Dra. Cristina da Silva Meira-Strejevitch.

**SÃO PAULO**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Maia, Marta Marques.

Expressão gênica de citocinas em pacientes com toxoplasmose sintomática / Marta Marques Maia. – 2017.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola.

1. Toxoplasmose ocular. 2. Expressão gênica. 3. Citocinas.

SES/CCD/CD-345/2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu foco e força para seguir em frente, para não desistir do meu objetivo, que me deu coragem para sair da minha cidade e me mudar para São Paulo.

Aos meus pais Maria Aparecida e Milton pelo amor e compreensão, aos meus irmãos Milton e Murilo pelo companheirismo sempre, e ao meu noivo Matheus pelo amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que estiveram caminhando ao meu lado nesta jornada. Acredito que nossas conquistas não são somente nossas, mas de todos aqueles que nos incentivam, nos apoiam e confiam em nosso trabalho.

Agradeço a Deus por ter me colocado onde estou, por ter atendido as minhas preces, me acalmando nos momentos difíceis, oferecendo conforto e força para chegar até aqui.

Agradeço aos meus amados irmãos Neto e Murilo pela amizade, companheirismo e compreensão. Sou muito feliz por tê-los como irmão e por nos divertimos tanto juntos.

Ao meu amado noivo Matheus pela paciência, tolerância, amor e carinho sabendo respeitar os horários de estudo, me apoiando, acreditando sempre no meu futuro profissional e dividindo os sonhos.

À minha querida, competente e talentosa orientadora Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola que foi fundamental para o meu crescimento profissional, acreditou no meu potencial e me orientou. A você Vera os meus eternos agradecimentos. Você é minha inspiração. Sou sua fã e levarei um pedacinho de você comigo.

A Dra. Cristina da Silva Meira-Strejevitch minha estimada coorientadora e responsável pela minha escolha profissional a quem admiro pela competência, carisma, coragem e profissionalismo. Você é minha inspiração e levarei comigo todos os seus ensinamentos.

Aos meus amigos e eternos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos Amanda Águiar, Cida Perez, Daise Damaris Gabriela Motoie, Inara Bastos, Jefferson Rodrigues, Lilian Muniz, Luís Fernando Gonçalves, Kate Brighente, Margarete Pereira, Marilena dos Anjos, Melissa Gonçalves, Ricardo Gava e Valéria Oliveira pelos momentos desafiadores, alegres e que me senti em família estando com vocês. Vocês se tornaram minha família nesses anos em que estive fora de casa.

Um agradecimento especial a Valéria que sempre demonstrou ser uma grande companheira trabalhando ao meu lado até tarde no laboratório.

Um agradecimento especial também a Daise que sempre me ajudou com os experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Thaís Alves da Costa Silva (IAL-SP), Prof<sup>o</sup>. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr (IMT-SP), e Prof. Dr. Cyro Alves de Brito (IAL-SP), integrantes da banca de qualificação, pelas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Gabriela Motoie (IAL-SP) e ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr (IMT-SP), integrantes da banca de defesa, pelas sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas maravilhosas que conheci nesses cinco anos de Instituto Adolfo Lutz, que passaram a fazer parte da minha vida e que vou me recordar para sempre.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Marta Marques Maia teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas que dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

## RESUMO

Este estudo avaliou os níveis de expressão de mRNA de 9 citocinas em pacientes com toxoplasmose ocular e disseminada. Foram analisadas 77 amostras clínicas divididas em 4 Grupos. Foram incluídos no estudo amostras de autopsias parafinadas de cérebro e pulmão provenientes de 11 pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada e AIDS (Grupo I). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas de 23 pacientes com toxoplasmose ocular (Grupo II) e 9 indivíduos com toxoplasmose crônica) (Grupo III). A seguir, as amostras de PBMC foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *Toxoplasma gondii*. Os controles negativos (Grupo IV) foram constituídos por 7 amostras de PBMC de indivíduos soronegativos para toxoplasmose e 16 amostras de tecido parafinado (cérebro e pulmão) de pacientes negativos para toxoplasmose e HIV. A expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e, IL-27 foi determinada por qPCR. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de expressão de mRNA de IL-6 e IL-10 nos pacientes com toxoplasmose ocular. Esses pacientes também apresentaram menor expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  do que os indivíduos crônicos. Nos pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada e AIDS foram detectados níveis de expressão de mRNA de TGF- $\beta$  e IL-6 no cérebro e pulmão. IL-6 foi significativamente menor do que o TGF- $\beta$ . Até o momento, este é o primeiro estudo a investigar a resposta imune de pacientes com toxoplasmose sintomática através do perfil de expressão de mRNA das citocinas de interesse.

**Palavras-chave:** toxoplasmose ocular, toxoplasmose disseminada, expressão gênica, citocinas.

## ABSTRACT

This study evaluated levels of mRNA expression of 9 cytokines from patients with ocular and disseminated toxoplasmosis. A total of 77 clinical samples was analyzed and they were divided into 4 Groups. The Group I was constituted of autopsy samples (cerebral and pulmonary paraffin tissues) from 11 patients with disseminated toxoplasmosis and AIDS. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 23 patients with ocular toxoplasmosis (Group II) and 9 individuals with chronic toxoplasmosis (Group III). Next, PBMC samples were stimulated with *in vitro* with a crude *Toxoplasma gondii* antigen. Negative controls (Group IV) consisted of 7 PBMC from patients seronegative for toxoplasmosis and 16 paraffin tissue samples (brain and lung) from patients negative for toxoplasmosis and HIV. mRNA expression for IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 and IL-27 was determined by qPCR. The results showed a significant increase in levels of mRNA expression for IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  in patients with ocular toxoplasmosis. These patients also had lower mRNA expression for IFN- $\gamma$  than those chronic individuals. In patients with disseminated toxoplasmosis and AIDS, levels of mRNA expression for TGF- $\beta$  and IL-6 were detected in the brain and lung. IL-6 was significantly lower than TGF- $\beta$ . To date, this is the first study to investigate an immune response of patients with symptomatic toxoplasmosis through the mRNA expression profile of the cytokines of interest.

**Keywords:** ocular toxoplasmosis, disseminated toxoplasmosis, gene expression, cytokines.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIDS** - “acquired immunodeficiency syndrome” - Síndrome da imunodeficiência adquirida

**ALT** - Antígeno lisado de *Toxoplasma gondii*

**CD4** - “Cluster of Differentiation” - Grupamento de diferenciação 4

**CDC** - “Centers for Disease Control” - Centro de Controle de Doenças

**cDNA** - DNA complementar

**CT** - “Cycle threshold” - Limiar do ciclo

**DEPC** - “Diethylpyrocarbonate” - Pirocarbonato de dietila

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**D.O.** - Densidade ótica

**EDTA** - “Ethylenediamine tetraacetic acid” - Ácido etilenodiamino tetra - acético

**ELISA** - “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” - Ensaio imunoenzimático

**et al.** - e colaboradores

**FFPE** - “Formalin-fixed, paraffin-embedded” - Fixados em formalina e embebidos em parafina

**g** - Aceleração da gravidade terrestre ( $9,8\text{m/s}^2$ )

**g** - grama(s)

**HIV** - “human immunodeficiency virus” - Vírus da imunodeficiência humana

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gamma

**IgA** - imunoglobulina da classe A

**IgE** - imunoglobulina da classe E

**IgG** - Imunoglobulina da classe G

**IgM** - Imunoglobulina da classe M

**IL** - Interleucina

**mg** - miligrama(s)

**mL** - mililitro(s)

**mM** - milimolar

**NK** - "*Natural Killer Cell*" - Células exterminadoras naturais

**pb** - Pares de base

**PBMC** - "*Peripheral blood mononuclear cell*" - Células mononucleares do sangue periférico

**PBS** - "*Phosphate buffered saline*" - Tampão fosfato-salino

**PCR** - "*Polimerase chain reaction*" - Reação em cadeia da polimerase

**pH** - Concentração de hidrogênio iônico

**PHA** - Fito-hemaglutinina

**qPCR** - PCR em tempo real

**RIFI** - Reação de imunofluorescência indireta

**RIN** - "*RNA integrity number*" - Número de integridade do RNA

**RM** - Ressonância magnética

**SFB** - Soro fetal bovino

**SNC** - Sistema nervoso central

**Taq** - *Thermophilus aquaticus*

**TBE** - Tris/ Borato/ EDTA

**TC** - Tomografia computadorizada

**TGF- $\beta$**  - "*Transforming growth factor-beta*" - Fator beta transformador decrescimento

**Th1** - Resposta celular do tipo 1

**Th2** - Resposta celular do tipo 2

**TNF- $\alpha$**  - "*Tumor necrosis factor-alpha*" - Fator de necrose tumoral alfa

**$\mu\text{L}$**  - Microlitro

**$\mu\text{m}$**  - Micrometros

**$\mu\text{M}$**  - Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura interna de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>2</b>
<b>Figura 2</b> - Taquizoítos em fibroblastos humanos.....	<b>3</b>
<b>Figura 3</b> - Cisto retirado do cérebro do camundongo por homogeneização em solução salina. Observe a parede fina do cisto (seta) envolvendo muitos bradizoítos.....	<b>4</b>
<b>Figura 4</b> - Esquema do processo de diferenciação dos taquizoítos nos vacúolos em bradizoítos encontrados em cistos teciduais.....	<b>5</b>
<b>Figura 5</b> - Oocisto esporulado com uma parede fina (seta grande) e dois esporocistos (pontas da seta). Cada esporocisto tem quatro esporozoítos (pequena seta).....	<b>6</b>
<b>Figura 6</b> - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>6</b>
<b>Figura 7</b> - Ciclo de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 8</b> - Situação Global da soroprevalência de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 9</b> - Tomografia computadorizada de um paciente com toxoplasmose cerebral (TC) com contraste/ressonância magnética (RM).....	<b>13</b>
<b>Figura 10</b> - Padronização da concentração de RNA total.....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b> - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em PBMC por gene testado. Quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. As setas indicam o gene mais estável.....	<b>50</b>
<b>Figura 12</b> - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em pulmão por gene testado. Quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. As setas indicam o gene mais estável.....	<b>50</b>
<b>Figura 13</b> - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em cérebro por gene testado. Quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. As setas indicam o gene mais estável.....	<b>51</b>

<b>Figura 14</b> - Expressão dos genes codificadores para citocinas IL-6, IL-10 e TGF – $\beta$ de PBMC.....	<b>52</b>
<b>Figura 15</b> - Expressão dos genes codificadores para citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17 e IL-4 de PBMC.....	<b>53</b>
<b>Figura 16</b> - Expressão dos genes codificadores para citocinas de IFN – $\gamma$ e IL- 27 de PBMC.....	<b>54</b>
<b>Figura 17</b> - Expressão dos genes codificadores para citocinas TGF- $\beta$ e IL-6 IL-10 em cérebro de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.....	<b>55</b>
<b>Figura 18</b> - Expressão dos genes codificadores para citocinas TGF- $\beta$ e IL-6 IL-10 em pulmão de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.....	<b>55</b>
<b>Figura 19</b> - Expressão de genes codificadores para as citocinas TGF- $\beta$ e IL-6 em cérebro de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.....	<b>56</b>
<b>Figura 20</b> - Expressão de genes codificadores para as citocinas TGF- $\beta$ e IL-6 em pulmão de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.....	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Genes endógenos humanos utilizados para a análise da expressão gênica.....	<b>39</b>
<b>Tabela 2.</b> Genes codificadores de citocinas humanas utilizadas para a análise da expressão gênica.....	<b>41</b>
<b>Tabela 3.</b> Resultados clínicos e laboratoriais dos 23 pacientes com toxoplasmose ocular.....	<b>44</b>
<b>Tabela 4.</b> Resultados clínicos e laboratoriais dos 11 pacientes com toxoplasmose disseminada.....	<b>46</b>
<b>Tabela 5.</b> Padronização da concentração de RNA total para síntese de cDNA.....	<b>47</b>

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Histórico.....	1
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.3. Taquizoítos.....	3
1.4. Bradizoítos.....	4
1.5. Oocistos.....	5
1.6. Ciclo de vida.....	6
1.7. Transmissão.....	7
1.8. Epidemiologia.....	9
1.9. Toxoplasmose humana.....	10
1.9.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....	11
1.9.2. Toxoplasmose cerebral.....	12
1.9.3. Toxoplasmose congênita.....	14
1.9.4. Toxoplasmose ocular.....	14
1.9.5. Toxoplasmose disseminada.....	16
1.10. Diagnóstico da toxoplasmose.....	17
1.10.1. Diagnóstico Clínico.....	17
1.10.2. Diagnóstico Laboratorial.....	17
1.10.2.1 Diagnóstico Sorológico.....	18
1.10.2.2. Diagnóstico Molecular.....	20
1.11. Resposta imune na toxoplasmose.....	21
1.12. Análise da Expressão Gênica.....	24
1.13. Justificativa.....	25

<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Objetivos Específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Delineamento Experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Considerações Éticas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Pacientes e amostras clínicas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Coleta de amostras clínicas.....</b>	<b>29</b>
3.4.1. Sangue Periférico.....	29
3.4.2. Tecidos Parafinados.....	29
<b>3.5. Diagnóstico clínico e histopatológico nos tecidos incluídos em parafina.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6. Diagnóstico Sorológico e Molecular.....</b>	<b>30</b>
3.6.1.ELISA.....	30
3.6.2.Extração de DNA em tecidos incluídos em blocos de parafina.....	31
3.6.3.Extração de DNA de sangue em EDTA.....	32
3.5.4.qPCR.....	33
<b>3.7. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC).....</b>	<b>34</b>
<b>3.8. Extração de RNA das PBMCs.....</b>	<b>35</b>
<b>3.9. Extração de RNA de Tecidos Parafinados.....</b>	<b>35</b>
<b>3.10. Digestão com DNase e Quantificação do RNA.....</b>	<b>36</b>
<b>3.11. Integridade do RNA.....</b>	<b>37</b>
<b>3.12. Padronização da síntese/quantidade de DNA complementar (cDNA) para qPCR.....</b>	<b>37</b>

<b>3.13. Padronização da estabilidade de expressão dos genes endógenos.....</b>	<b>38</b>
<b>3.14. Análise da expressão dos genes codificadores das citocinas IFN-<math>\gamma</math>, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27 TGF-<math>\beta</math>, e TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>40</b>
<b>3.15. Análise dos dados.....</b>	<b>42</b>
3.15.1. Estabilidade de expressão dos genes endógenos e codificadores das citocinas.....	42
3.15.2. Análise Estatística.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose.....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Pacientes com toxoplasmose ocular.....	43
4.1.2. Pacientes com toxoplasmose disseminada e AIDS.....	45
4.1.3. Grupo Controle.....	47
4.1.4. Grupo Negativo.....	47
<b>4.2. Padronização da extração de RNA de tecidos parafinados.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Quantificação e Integridade de RNA total.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4. Padronização da síntese e quantidade de cDNA utilizada na qPCR.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5. Padronização e análise da expressão dos genes endógenos em PBMC.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6. Padronização e análise da expressão dos genes endógenos em tecidos parafinados.....</b>	<b>49</b>
<b>4.7. Análise da expressão dos genes codificadores de IFN-<math>\gamma</math>, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF-<math>\beta</math> e TNF- <math>\alpha</math> em PBMC.....</b>	<b>51</b>
<b>4.8. Análise da expressão dos genes codificadores de IFN-<math>\gamma</math>, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF-<math>\beta</math> e TNF- <math>\alpha</math> em tecidos parafinados .....</b>	<b>54</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo 1 - Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo 2 - Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, Carnietto de Hipólito DD, Wang HL, Motoie G, et al. Selection of reference genes in five types of human tissues for normalization of gene expression studies in infectious diseases. Gene Reports. 2017; 7:98-105.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 3 - Maia MM, Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, de Hippólito DDC, Silva VO, Brandão de Mattos CC, et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. Parasite Immunol. 2017;39.....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa. *T. gondii* infecta vários hospedeiros incluindo o homem e é um dos parasitos mais bem estudados devido à sua importância médica e veterinária.

### 1.1. Histórico

Foi descrito no Brasil por Afonso Splendore em 1908 parasitando coelhos da Faculdade de Medicina de São Paulo e simultaneamente por Nicolle e Manceaux no Instituto Pasteur da Tunísia (Rey, 2001).

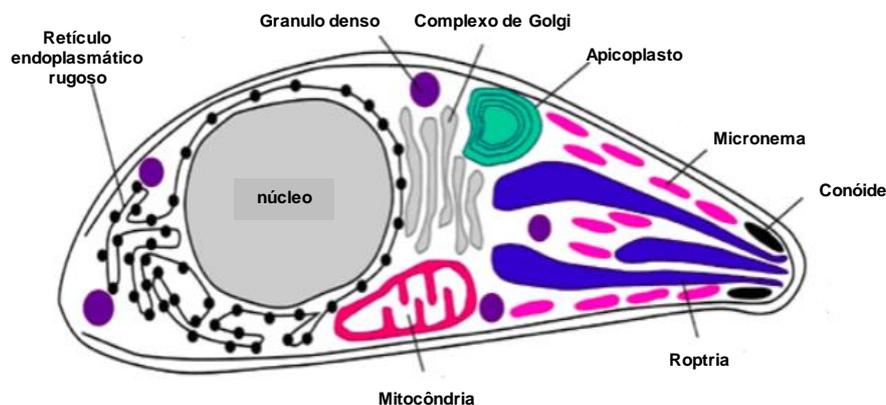
O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito por Janku, em 1923, em uma criança de 11 anos de idade que apresentava hidrocefalia e lesões oculares. Em 1937, Wolf e Cowen relataram casos em que a transmissão congênita havia ocorrido. Em seguida os primeiros casos clínicos de toxoplasmose foram confirmados no mundo, devido à transmissão da mãe para feto via placenta (Coutinho e Vergara, 2005).

No Brasil importantes contribuições foram feitas, principalmente por Torres, em 1927, quando fez as primeiras descrições anatomopatológicas da doença e por Delásio, em 1956, com detalhadas informações sobre a forma congênita. Sabin e Feldman, em 1948, desenvolveram o teste sorológico do corante, permitindo o estudo de aspectos clínicos e epidemiológicos da doença (Coutinho e Vergara, 2005). Somente na década de 1970 o ciclo biológico do parasito foi elucidado ao demonstrar os estágios infecciosos de *T. gondii* nas fezes de gatos (Dubey et al., 1970).

## 1.2. *Toxoplasma gondii*

Pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Sub-Classe Coccidia, Ordem Eucoccidea, Família Sarcocistidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (Levine et al., 1980).

É um protozoário intracelular obrigatório que se multiplica em células nucleadas de animais de sangue quente (Montoya et al, 2004; Dubey, 2008). Parasita de preferência macrófagos teciduais, mas são encontrados também em secreções, células endoteliais, nervosas e musculares. Possui uma única espécie *T. gondii*, com numerosas cepas e com uma estrutura celular característica do filo Apicomplexa. Possui um complexo de organelas secretoras bem características os micronemas, as rôptrias e os grânulos densos e uma organela denominada apicoplasto, característica desse grupo, envolto por quatro membranas e localizado na região anterior ao núcleo como mostra a Figura 1 (Dubey et al., 1998).

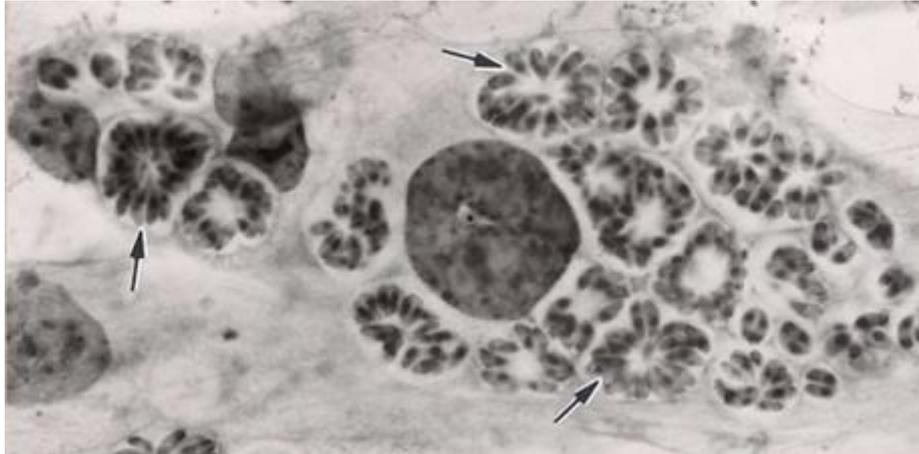


**Figura 1** - Estrutura interna de taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.  
Fonte: Ajioka et al., 2001

*T. gondii* apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do habitat e do estado evolutivo em que se encontra. Exibe três formas evolutivas. Os taquizoítos, bradizoítos e oocistos contendo esporozoítos (Dubey et al., 1998).

### 1.3. Taquizoítos

O termo taquizoíto vem do grego onde *taqui* significa rápido devido a rápida multiplicação dos parasitos em diversos tipos celulares. Exibem formato de meia lua e medem cerca de 2 µm de largura e 6 µm de comprimento, como mostra a Figura 2.



**Figura 2** - Taquizoítos em fibroblastos humanos.  
Fonte: Hill e Dubey, 2016

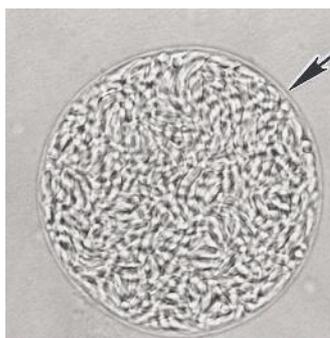
Quando corado por Giemsa seu citoplasma apresenta-se azulado e seu núcleo vermelho. São intracelulares obrigatórios de células nucleadas e são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos (Hill et al., 2002). Entram em células hospedeiras por penetração ativa e, após a entrada, se tornam ovóides e envoltos pelo vacúolo parasitóforo. Assim, os taquizoítos ficam protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro e multiplicam-se assexuadamente por repetidas endodiogenias, onde dois taquizoítos originam-se dentro da célula-mãe, que se degenera ao final do processo de divisão celular (Blader et al., 2015). Depois de várias replicações, os parasitos rompem a membrana da célula hospedeira e se disseminam pela corrente sanguínea para vários tecidos. Este processo continua até o desenvolvimento de imunidade do hospedeiro ao parasito. A infecção é estabelecida após algumas divisões (Dubey et al, 1998). Taquizoítos são responsáveis pela fase aguda da infecção, causando intensa inflamação, destruição tecidual e manifestações clínicas (Frenkel,1974). Devido à sua eficiente capacidade reprodutiva podem causar

infecção generalizada, normalmente fatal se não forem controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro (Blader et al., 2009).

Ultra estruturalmente os taquizoítos apresentam diversos grânulos densos, micronemas, anéis apicais e polares e cinco a oito róptrias. O núcleo localiza-se na região central do corpo do parasito (Dubey et al., 1998).

#### 1.4. Bradizoítos

Após algumas divisões os parasitos formam os cistos teciduais que se alojam no interior dos tecidos por longos períodos ou pela vida toda do hospedeiro, sem que cause resposta inflamatória ou dano tecidual (Figura 3).



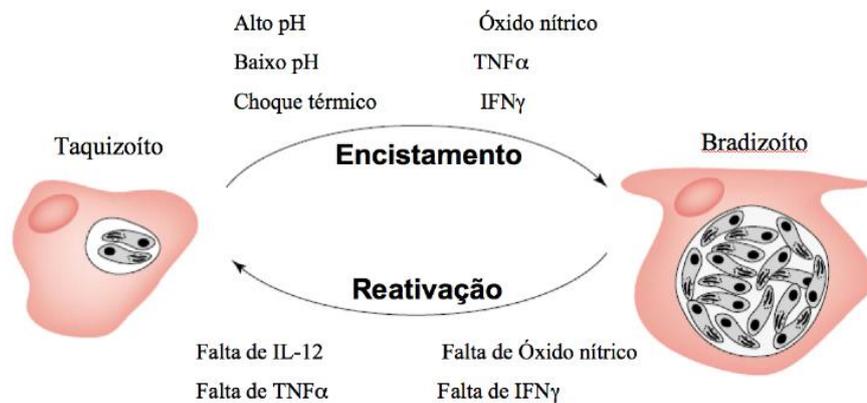
**Figura 3** - Cisto retirado do cérebro do camundongo por homogeneização em solução salina. Observe a parede fina do cisto (seta) envolvendo muitos bradizoítos.

Fonte: Hill e Dubey, 2016

Possuem vários bradizoítos em seu interior que são as formas de replicação mais lentas, “*brad*” no grego significa lento. Reproduzem lentamente no interior do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira por endodiogenia. Modificam a membrana do vacúolo para a formação da parede cística dando origem ao cisto tecidual, que são encontrados na fase crônica da infecção (Tenter et al., 2000).

Os núcleos dos bradizoítos situam-se na extremidade posterior, enquanto que nos taquizoítos estão na posição central (Dubey, 1998; Montoya et al., 2004; Hill et al., 2005). Embora cistos teciduais contendo bradizoítos possam se desenvolver no pulmão, fígado e rim, são mais prevalentes em

tecidos como o cérebro e musculares como coração, músculo esquelético e retina (Hill et al., 2005). Cistos teciduais variam de tamanho, os jovens podem medir cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e os mais velhos podem conter centenas de organismos alcançando em média cerca de 60  $\mu\text{m}$  (Dubey et al., 1993). O tamanho do cisto depende de sua idade, do tipo da célula hospedeira e da cepa de *T. gondii*. A parede cística e a matriz protegem os bradizoítos do sistema imune do hospedeiro promovendo uma barreira física (Weiss, 2000). Cistos teciduais podem se romper, e com a transformação de bradizoítos em taquizoítos (interconversão), invadem outras células hospedeiras e novamente se transformam em bradizoítos formando um novo cisto tecidual, como mostra a Figura 4 (Tenter et al., 2000).

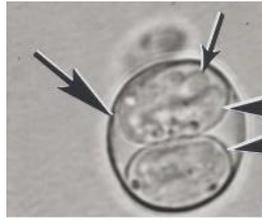


**Figura 4** - Esquema do processo de diferenciação dos taquizoítos nos vacúolos em bradizoítos encontrados em cistos teciduais.

Fonte: Lyons et al., 2002.

## 1.5. Oocistos

Os oocistos (Figura 5) são as formas infectantes resultantes do ciclo sexuado e ocorrem somente no trato gastrointestinal dos felídeos. São liberados para o meio ambiente pelas fezes durante a infecção aguda por cerca de 7 a 10 dias, podendo esporular em até 6 meses. Os oocistos esporulados podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses. Cada oocisto forma em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Dubey, 1998; Hill et al., 2002; Montoya et al., 2004).

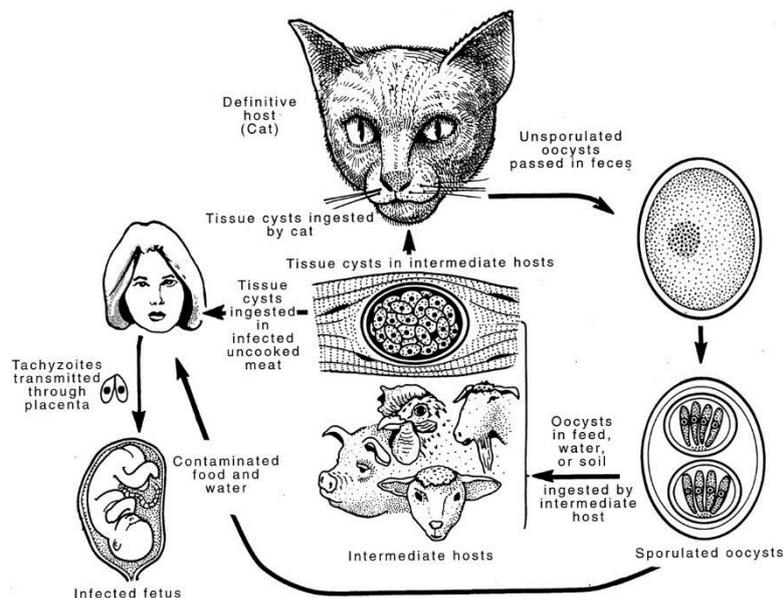


**Figura 5** - Oocisto esporulado com uma parede fina (seta grande) e dois esporocistos (pontas da seta). Cada esporocisto tem quatro esporozoítos (pequena seta).

Fonte: Hill e Dubey, 2016

## 1.6. Ciclo de vida

*T. gondii* apresenta um complexo ciclo de vida, que foi descrito somente em 1970 por Dubey et al., demonstrado na Figura 6. O ciclo é heteroxênico tendo os felídeos, incluindo o gato doméstico, como hospedeiros definitivos e mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (Dubey et al., 1970).



**Figura 6** - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: Hill et al., 2002.

Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a reprodução assexuada do parasito, enquanto nos hospedeiros definitivos ocorrem as reproduções sexuada e assexuada. Os hospedeiros definitivos são considerados a principal

fonte de contaminação da doença, uma vez que a formação e liberação de oocistos nas fezes acontecem com grande facilidade.

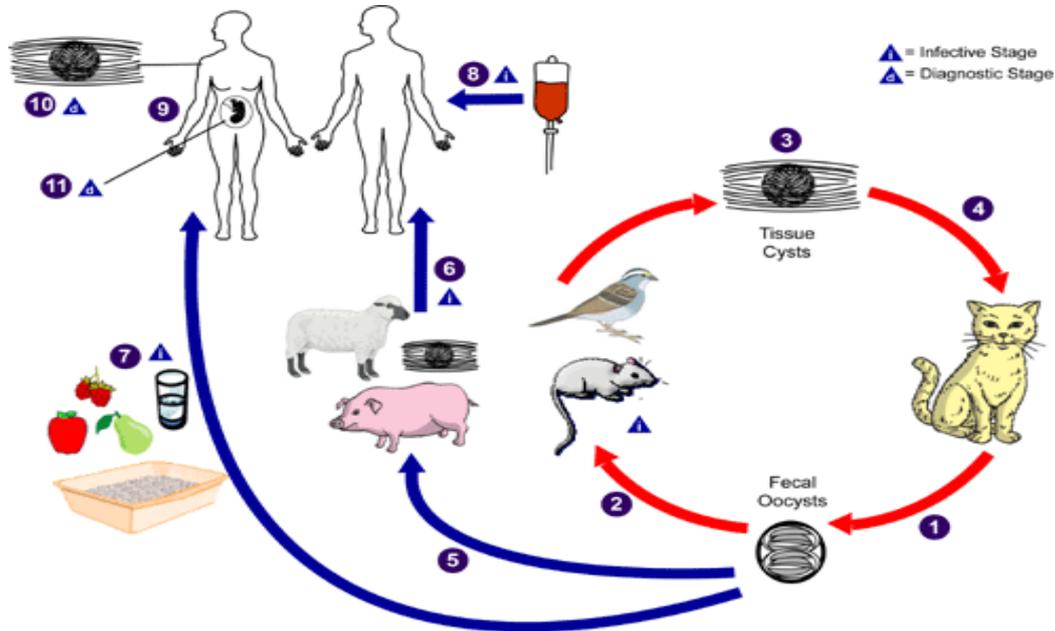
A fase sexuada ocorre no felídeo não imune que adquire a infecção pela ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos. O ciclo sexual ocorre nas células intestinais com formação e fertilização dos gametócitos e formação do zigoto. Este origina o oocisto imaturo que posteriormente é liberado após o rompimento celular, sendo eliminado nas fezes após uma ou duas semanas de infecção. Os oocistos imaturos, não infectantes, sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, como as que ocorrem em regiões de clima tropical, esporulam e podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo desde que mantidas tais condições, sem a luz solar direta (Rey, 2001). São eliminados milhares de oocistos após a ingestão de taquizoítos. A transmissão é assegurada pela enorme quantidade de oocistos eliminados nas fezes de felídeos para o meio ambiente (Hill et al., 2002).

Os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão de oocistos maduros encontrados no solo, verduras, água contaminada ou ingerindo cistos com taquizoítos em carnes cruas ou mal cozidas (Hill et al., 2002; Montoya et al., 2004). Os parasitos penetram no intestino do hospedeiro, invadem as células epiteliais e inicia-se um processo de multiplicação assexuada dentro do vacúolo parasitóforo por endodiogenia. Estes se multiplicam rapidamente até a ruptura da célula hospedeira liberando os taquizoítos que se disseminam pela corrente sanguínea invadindo novas células nucleadas. Em seguida os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos (Dubey et al., 1972; Kime Weiss, 2008).

## **1.7. Transmissão**

A transmissão do parasita ocorre pela ingestão de água e alimentos infectados com oocistos, ou pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos (Hill e Dubey, 2002; Hill et al., 2005, Kim e Weiss, 2008). A transmissão pode ocorrer também por via transplacentária, pela amamentação

durante a fase aguda da infecção, por transplante de órgãos e por transfusão sanguínea, como mostra a Figura 7.



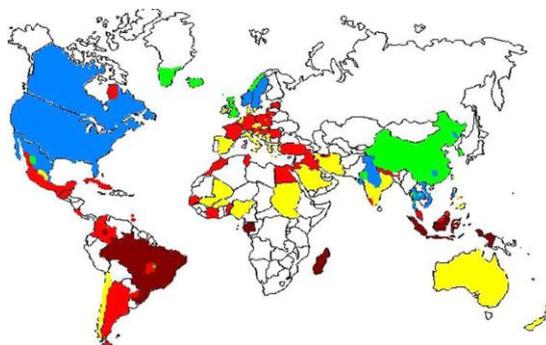
**Figura 7** - Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*. Descrição do ciclo de vida: 1 - Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes do gato, demoram em média cinco dias para esporular no ambiente tornando-se infeccioso. Os hospedeiros intermediários, incluindo aves e roedores, se infectam depois de ingerir solo, água ou alimentos contaminados com oocistos. 2 - Os oocistos se transformam em taquizoítos logo após a ingestão, vão para o tecido neural e muscular e desenvolvem-se em cistos contendo bradizoítos. 3 - Os gatos infectados após consumir hospedeiros intermediários que abrigam cistos contendo bradizoítos no tecido. 4 - Os gatos também podem se infectar diretamente pela ingestão de oocistos esporulados. 5 - Animais criados para consumo humano também podem ser infectados com cistos teciduais após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente. Os seres humanos podem ser infectados por qualquer uma das vias. 6 - Comendo carne crua ou mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais. 7 - Consumindo alimentos ou água contaminada com fezes de gato ou por amostras ambientais contaminadas (como terra contaminada). 8 - Transfusão sanguínea ou transplante de órgãos. 9 - Congênita passando da mãe ao feto. 10 - No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais, mais comumente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos. Estes cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. 11 - O diagnóstico da infecção congênita pode ser realizado através da detecção de DNA de *T. gondii* em líquido amniótico utilizando métodos moleculares como a PCR.

Fonte: <http://www.cdc.com>

## 1.8. Epidemiologia

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita e a soro prevalência pode variar de região para região. Na forma aguda é assintomática em 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes apresentando evolução benigna (Montoya et al., 2004). A maioria dos estudos envolvendo países da América Latina revelam altas taxas de soro positividade. No Brasil, a prevalência sorológica de infecção por *T. gondii* é alta, variando em torno de 50 a 80% na população adulta como mostra a Figura 8 (Pappas et al., 2009) e na grande São Paulo a prevalência é de aproximadamente 69% (Amendoeira et al., 1999). Os felídeos são considerados os animais mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose e são os responsáveis pela contaminação do meio ambiente através da eliminação de oocistos. A alta prevalência de infecção por *T. gondii* na América Central e do Sul é provavelmente devida a altos níveis de contaminação do meio ambiente com oocistos (Neto et al., 2000).

As condições gerais do clima tropical permitem a sobrevivência prolongada dos oocistos do parasita no ambiente. Os oocistos esporulados são as formas infectantes de transmissão mais importantes pela facilidade de contaminação do solo e pela capacidade de resistência a processos de congelamento e ambientes não favoráveis, permanecendo viáveis por até dezoito meses, facilitando sua disseminação com a capacidade de infectar animais de consumo (Dubey, 2004).



**Figura 8** - Situação Global da soro-prevalência de *Toxoplasma gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual à ausência de dados.

Fonte: Pappas et al., 2009.

A água é considerada uma importante via de disseminação da toxoplasmose. Vários surtos foram relatados tendo essa via de transmissão. No norte do estado do Rio de Janeiro, águas de poços, de lagos e de riachos foram consumidas pela população e incriminadas como fonte de infecção (Bahia-Oliveira et al., 2003). Na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, 113 indivíduos apresentaram sintomas da doença com possível transmissão pela água, visto que 200 gatos habitavam o local no qual ocorreu a infecção humana (Gattás et al., 2000). Em Santa Isabel do Ivaí, estado do Paraná, em um total de 2884 indivíduos foi detectado anticorpos IgG anti-*T. gondii* e em 1255, anticorpos IgM e IgG. Este surto foi relacionado à ingestão de água de um dos reservatórios da cidade (De Moura et al., 2006).

Surtos relacionados à ingestão de carne mal cozida também foram relatados no país (Coutinho et al., 2005). Na região de Erechim no Rio Grande do Sul, o manuseio de carne crua para confecção de linguiça e similares foi responsável pela elevada prevalência da doença, incluindo casos de retinocoroidite (Glasner et al., 1992). A presença de gatos e roedores em cerca de 90% das propriedades de criação de suínos em Erechim foi um fator importante para se correlacionar com os elevados índices da toxoplasmose nesse local (Araújo et al., 2000). Nos seres humanos, a ingestão de carne mal cozida contendo cistos com bradizoítos é considerada a principal via de exposição ao *T. gondii* (Cook et al., 2000; Munoz-Zanzi et al., 2010).

### **1.9. Toxoplasmose humana**

*T. gondii* no hospedeiro humano comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade. A fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), assim como o tamanho do inóculo, o estado imunológico do hospedeiro e, provavelmente a linhagem da cepa são fatores que influenciam na determinação do quadro mais ou menos severo da doença (Dubey et al., 2012). Tradicionalmente a toxoplasmose adquirida é considerada uma doença autolimitada em indivíduos saudáveis, sendo o tratamento

considerado desnecessário, uma vez que muitos pacientes não desenvolvem complicações mais severas.

Porém, trabalhos mostram que indivíduos com toxoplasmose adquirida apresentam o risco de desenvolver tardiamente lesões oculares que comprometem de forma irreversível a visão (Silva, 2008). Sendo assim, a toxoplasmose, enquanto doença pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida em pacientes imunocompetentes; a reativada em indivíduos imunocomprometidos, a forma congênita e a doença ocular (Amato et al.,1995; Remington et al.,1995).

### **1.9.1. Toxoplasmose em imunocompetentes**

Em imunocompetentes, formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos e figuram como acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea (Mele et al., 2002). Contudo, cerca de 10-20% dos indivíduos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia. A manifestação clínica mais típica consiste em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, não supurados e discretos podendo ocorrer febre. A doença é geralmente autolimitada, observando-se em poucas semanas o desaparecimento dos sintomas (Montoya et al., 2004).

### **1.9.2. Toxoplasmose cerebral**

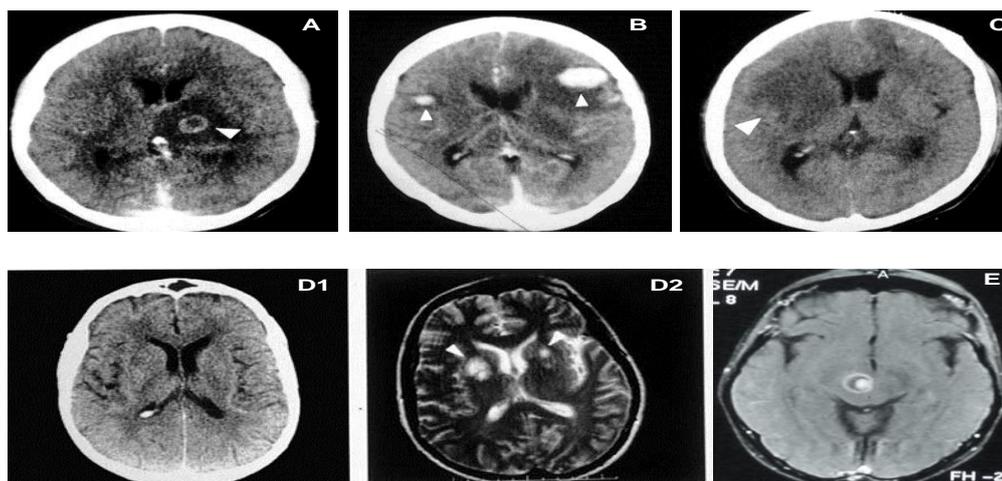
Devido ao caráter oportunista do parasita, outro grupo seriamente afetado pela doença é o de indivíduos submetidos ao uso de drogas imunossupressoras como os transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas e com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Luft et al., 1992; Liesenfeld et al., 1999; Ferreira, 2000).

Em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a toxoplasmose costuma ser a infecção oportunista mais comum do sistema nervoso central (SNC) e as lesões neurológicas são evidenciadas em até 90% dos casos de AIDS submetidos à necropsia, sendo a toxoplasmose cerebral a causa de óbito com muita frequência (Camara et al, 2003; Pereira-Chiocola et al., 2009).

A reativação da infecção latente se observa em pessoas com deficiência imunológica, o que acontece em pacientes soropositivo para HIV, que foram parasitados previamente com *T. gondii*. Isso ocorre quando a imunodepressão celular é intensa, cuja contagem de linfócitos T CD4 é inferior a 100/mm<sup>3</sup>, podendo ocorrer à toxoplasmose cerebral como primeira manifestação da AIDS (Hernández- González et al, 2002).

O SNC é o local mais afetado pela infecção, no qual a encefalite é a mais importante manifestação da doença, causando severos danos ao paciente (Luft, 1992; Ferreira, 2000; Pereira-Chiocola et al., 2009; Dubey et al., 2012). A apresentação clínica da encefalite toxoplásmica classicamente apresenta-se como um processo subagudo, porém cerca de 10% dos casos pode se manifestar agudamente. Manifestações clínicas incluem mudanças no estado mental, apreensões, déficits motores focais, distúrbios de nervos cranianos, anomalias sensoriais, desordens de movimento e achados neuropsiquiátricos. O achado focal mais típico é hemiparesia e alterações de fala (Franzen et al., 1997; Ferreira, 2000; Montoya et al., 2004). Cerca de 95% da encefalite causada por *T. gondii* deve-se à reativação da infecção latente pela perda progressiva da imunidade celular (Luft et al., 1992). A Figura 9 apresenta resultados de tomografia e ressonância cerebral, mostrando as formas mais comuns da toxoplasmose cerebral (Bertolli et al., 1995; Frenkel et al., 1995; Pereira-Chiocola et al., 2009).

No estado de São Paulo, 25,4% de 71 pacientes soropositivos, morreram devido à toxoplasmose, durante os anos de 1998 a 2002 (Nogueira, 2005).



**Figura 9** - Tomografia computadorizada de um paciente com toxoplasmose cerebral (TC) com contraste/ressonância magnética (RM). Lesões expansivas com realce anelar (A); com realce nodular (B); sem realce após injeção do contraste (C); múltiplas lesões focais nos gânglios basais com alta intensidade de sinais (TC e RM) (D1, D2) e lesão cerebral com realce anelar com um nódulo assimétrico ao longo da parede da lesão (E).

Fonte: Pereira-Chioccola et al., 2009.

### 1.9.3. Toxoplasmose congênita

A infecção congênita se caracteriza pela transmissão do parasita ao feto via placenta. Esta forma de infecção ocorre via de regra quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação, que apesar da parasitemia temporária, raramente tem sintomas (Hill et al., 2005). Entretanto, quando este contato se efetua num período anterior ao acontecimento da concepção, anticorpos são formados e dificilmente o feto será infectado (Kravetz e Federman, 2005).

A gravidade da toxoplasmose congênita está relacionada com o período de infecção. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre é mais severa do que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre (Remington et al., 1995). Um grande espectro de doenças clínicas pode ocorrer em crianças infectadas congenitamente, levando a um conjunto de manifestações, variando entre coriorretinite branda, que pode se apresentar muitos anos após o nascimento, a quadros mais severos com o aparecimento da tétrede de sabin. A clássica tétrede de Sabin, composta por alterações do volume craniano (hidrocefalia ou

microcefalia), coriorretinite (geralmente bilateral, macular ou perimacular, simétrica), calcificações intracranianas e retardamento mental. A toxoplasmose congênita pode permanecer latente por vários anos e mais adiante reativar. Destas, a doença ocular é a seqüela mais comum e a hidrocefalia a mais rara, porém, mais significativa (Carruthers, 2002; Kravetz e Federman, 2005; Petersen, 2007).

#### **1.9.4. Toxoplasmose ocular**

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida, como resultado da infecção aguda ou reativação, e em ambas o acometimento ocular pode ser precoce ou tardio (Montoya e Liesenfeld, 2004). A infecção ocular acomete primariamente a retina e leva a um quadro de uveíte posterior (retinocoroidite) acompanhada frequentemente de uveíte anterior, sendo que no Brasil, tais sintomas são responsáveis por 70% dos casos (de Amorim Garcia et al., 2004). A toxoplasmose ocular é, também, uma doença comum na Região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Estudos anteriores mostram que cerca de 27% dos pacientes tratados em um ambulatório de oftalmologia apresentaram sintomas clínicos de toxoplasmose ocular (Previato et al., 2015).

O grave impacto social da toxoplasmose ocular deve-se ao fato de levar à perda acentuada da visão. A lesão mais frequente é a retinocoroidite focal, granulomatosa, necrosante, de coloração branco-amarelada e de bordas mal definidas. Frequentemente encontra-se lesão satélite e outras cicatrizes antigas hiperpigmentadas e atróficas, sendo este achado característico da toxoplasmose ocular. Os sintomas primordiais incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas frequentes decorrem, provavelmente, da ruptura do cisto e liberação dos parasitas (Amato et al., 1995; Remington et al., 1995). Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Villard et al., 2003; Copeland et al., 2006). Algumas complicações da toxoplasmose ocular incluem catarata, glaucoma, edema macular cistoideo, desprendimento de retina, atrofia do nervo

óptico e neovascularização coroidal em estádios avançados (Garweg e Candolfi, 2009).

Os fatores que controlam a ocorrência, a gravidade e a recorrência da doença ocular não são bem compreendidos, embora uma variedade de componentes, incluindo a susceptibilidade genética do hospedeiro, o estado do sistema imune, a carga parasitária e o genótipo do parasita têm sido sugeridos como possivelmente envolvidos na infecção. Os parâmetros imunológicos e genéticos podem desempenhar papéis significativos na patogênese da doença ou na eliminação do *T. gondii* dos tecidos infectados. (Holland, 2008; Cordeiro et al., 2008).

#### **1.9.5. Toxoplasmose disseminada**

Uma das formas mais graves das formas sintomáticas é a toxoplasmose disseminada, que é definida quando a infecção acomete mais de dois sistemas de órgãos (Medeiros et al., 2001). Como múltiplos sistemas são envolvidos, qualquer órgão pode ser acometido e podem ocorrer quadros semelhantes à sepse ou choque séptico (Barbosa et al., 2007). Apesar de infrequente, está associada a um pior prognóstico (Schmidt, 2013). A disseminação geralmente ocorre devido à exposição aguda a *T. gondii* e pode ocorrer em grupos de pacientes com diferentes causas de imunossupressão (Medeiros, 2001; Botterel et al., 2002; Weiss et al., 2009). Entretanto, os óbitos causados pela toxoplasmose disseminada são atribuídos ao acometimento SNC (Al-Kassab et al., 1995). Formas fulminantes são descritas e com diagnóstico muitas vezes confirmado apenas na autópsia. Os órgãos mais acometidos incluem o cérebro, os pulmões, o coração e o sistema músculo esquelético (Medeiros et al., 2001; Schmidt, 2013).

O cenário clínico pode incluir sintomas gripais, linfadenomegalias, febre, artralgia, mialgia, fadiga, hepatoesplenomegalia e rash maculopapular. O paciente apresenta inicialmente rash maculopapular e 15 dias depois tosse não produtiva, com estertores crepitantes bilaterais e sinais de insuficiência

respiratória aguda. Pode haver ainda mialgia e aumento de creatinofosfoquinase, aumento do lactato desidrogenase e plaquetopenia (Bossi et al., 2000).

Pacientes infectados com HIV que apresentem quadros sépticos com febre de origem indeterminada e com as características apresentadas devem ser investigados quanto à possibilidade de quadro de disseminação de *T. gondii* (Albrecht et al., 1995). Poucos dados são disponíveis sobre a magnitude da toxoplasmose disseminada em pacientes infectados com HIV, nem dos doentes com toxoplasmose cerebral, que também apresentavam comprometimento de outros órgãos por *T. gondii* (Gadea et al., 1995; Bastos da Silva et al., 2016).

Nos pacientes com HIV, a maioria dos casos são diagnosticados apenas por autópsias, que se tornam ferramenta essencial para o melhor entendimento da evolução natural da doença e da acurácia do diagnóstico clínico estabelecendo-se diagnóstico diferencial com outras infecções oportunistas (Albrecht et al., 1995; Arnold et al., 1997; Barbosa et al., 2007). O diagnóstico depende de um conjunto de sintomas clínicos, radiológicos e laboratoriais. Todavia, requer um alto índice de suspeição devido à inespecificidade do quadro clínico, laboratorial e a possível confusão com outras doenças oportunistas (Mastroianni et al., 1997).

Estudos de séries de autópsias demonstraram a relevância e gravidade da apresentação desta patologia nos pacientes com HIV/Aids. Estudos mostram que grande parte dos pacientes com HIV/Aids que foram à óbito por toxoplasmose possuíam também comprometimento pulmonar (Liu et al., 1995; Gadea et al., 1995). Estes dados sugerem que pacientes inicialmente diagnosticados como toxoplasmose cerebral podem ter quadros disseminados da doença. Muitos desses casos de acometimento pulmonar não tinham sintomas clínicos respiratórios evidentes (Gadea et al., 1995). Após o envolvimento do SNC, os órgãos mais frequentemente danificados são os pulmões e o miocárdio (Rabaud et al., 1994; Liu et al., 1995). Existem ainda casos descritos de doença disseminada com acometimento do fígado, estômago, cólon, pâncreas, rins e testículos (Rabaud et al., 1994).

## **1.10. Diagnóstico da toxoplasmose**

### **1.10.1. Clínico**

Na toxoplasmose adquirida, a manifestação clínica mais comum na criança e/ou adulto imunocompetente é um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, com adenopatias acompanhadas de febre baixa e o quadro é de evolução benigna na maioria dos casos, com resolução espontânea (Frenkel, 2002). Os sintomas da toxoplasmose aguda em gestantes podem ser transitórios, inespecíficos e subclínicos. A possibilidade de transmissão fetal é remota quando a toxoplasmose é adquirida antes da concepção. Os distúrbios oculares e neurológicos são exemplos comuns observados neste tipo de reativação clínica (Amato et al., 1995). Em imunodeprimidos, essas manifestações clínicas são encontradas com frequência, provavelmente pela reativação das formas latentes dos cistos contendo bradizoítos. Tal processo revela ser *T. gondii* um agente de caráter oportunista.

### **1.10.2. Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito por testes sorológicos e pela detecção do DNA do parasito.

#### **1.10.2.1. Diagnóstico Sorológico**

A resposta imune de um hospedeiro à toxoplasmose pode ser natural ou adquirida. Quando um hospedeiro se infecta com o parasito, após a multiplicação, segue-se a sua disseminação por todo o organismo por vasos

sanguíneos e linfáticos. Durante este período inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos celulares de defesa. Portanto os exames sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. Estes se baseiam principalmente na detecção de anticorpos específicos e a presença desses anticorpos durante a infecção permite a análise de perfis sorológicos característicos quer seja na infecção recente (fase aguda) ou infecção tardia (fase crônica) (Contreras et al., 2000).

O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi à reação de Sabin-Feldman ou o clássico teste do corante, mundialmente conhecido como “dye test” (Sabin et al., 1948). Cinquenta anos depois da sua descrição, ainda era considerado como teste de referência com altas taxas de sensibilidade e especificidade. Entretanto, a sua utilização gerou graves problemas de biossegurança pelo uso obrigatório de parasitas vivos.

Recentemente, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico sorológico da toxoplasmose são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) (Montoya et al., 2004).

O ELISA trouxe um grande avanço para o diagnóstico da doença. Além de elevada sensibilidade e especificidade, tem como vantagem a rapidez, simplicidade da técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Sanchez, 2001; Camargo, 2001).

O diagnóstico da toxoplasmose aguda é baseado na demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e/ou a presença de anticorpos IgM. Entretanto a elevada prevalência de anticorpos IgG entre indivíduos normais na maioria da população e a persistência de anticorpos IgM por longos períodos em algumas pessoas tem complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Remington et al., 1995).

Hedman et al. (1989) introduziram o teste ELISA-avidez de IgG com objetivo de diagnosticar uma infecção recentemente adquirida. Para a avaliação da avidez, a técnica se baseia na maior ou menor facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigênicos específicos. Essa dissociação resulta da ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, utilizadas para diluir o soro teste ou adicionadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo. O tratamento com ureia é considerado o mais simples e eficiente na medida da avidez dos anticorpos IgG. É um método altamente sensível e específico na identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* durante a gravidez (Jenum et al., 1998).

A RIFI é considerada de boa especificidade e sensibilidade. Tem sido empregada para amplificar o sinal de fluorescência e aumentar a sensibilidade. Essa reação tem a vantagem de utilizar parasitos preservados, fixados em lâminas de microscopia, tornando-a muito mais prática e segura para a rotina laboratorial. Esse teste permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas. Pode apresentar resultados falsos-positivos de anticorpos IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro. Para minimizar esses resultados falsos, são indicados os métodos que usam o princípio de captura de IgM (Camargo et al., 2001).

#### **1.10.2.2. Diagnóstico Molecular**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos. Estudos sobre o genoma de *T. gondii*, tornou possível a utilização da PCR para a detecção do parasito (Bastien, 2002). A PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, uma vez que limita o uso de métodos invasivos no feto (Remington et al., 2004). Também tem a capacidade de amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluídos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano,

humor aquoso, fluído de lavado bronco-alveolar, dentre outros (Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005). Esse fato é de alto valor diagnóstico, especialmente nos imunocomprometidos, seja por imunodepressão ou por imunoimaturidade como no feto e no recém-nascido.

### **1.11. Resposta imune na toxoplasmose**

A resposta imune a um microrganismo pode ser inata ou adquirida. A imunidade inata é responsável pela proteção inicial contra as infecções, estando preparada para bloquear a entrada de microrganismos e eliminar rapidamente aqueles que conseguem entrar nos tecidos do hospedeiro. As células que representam a imunidade inata são os macrófagos, células natural killer (NK) e os polimorfonucleares. A imunidade adquirida se desenvolve mais lentamente e proporciona uma defesa mais especializada e mais eficaz contra as infecções, pois requer a expansão e a diferenciação de linfócitos em resposta a microrganismos antes que ela possa oferecer uma defesa eficaz, isto é, ela se adapta à presença dos invasores microbianos. A imunidade inata é filogeneticamente mais antiga, e o sistema imunológico adaptativo mais especializado evoluiu posteriormente (Abbas, 2001).

*T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório que induz uma resposta imune consistente e duradoura buscando o controle da proliferação dos taquizoítos. As vias mais comuns de infecção por *T. gondii* são a ingestão de oocistos esporulados ou de cistos contendo bradizoítos. Após a digestão do oocisto ou da parede do cisto contendo bradizoítos, os parasitas são liberados no lúmen do intestino delgado. Esporozoítos ou bradizoítos invadem os enterócitos do intestino delgado, onde se diferenciam em taquizoítos e replicam rapidamente. A adesão e invasão na célula hospedeira são eventos cruciais para o estabelecimento da infecção. Inicialmente, por meio do polo anterior (conoíde) o parasito estabelece contato com a superfície da célula hospedeira desencadeando a invaginação da membrana celular, o processo de invasão se inicia por meio de adesão sobre a superfície da célula hospedeira e a exocitose

de proteínas presentes nos micronemas e nas róptrias (Carruthers et al., 1997; Alexander et al., 2005).

Após a invasão dos enterócitos, quimiocinas são liberadas pelos enterócitos infectados, resultando no recrutamento de uma variedade de leucócitos em resposta à infecção parasitária (Buzoni-Gatel et al., 2001; Mennechet et al., 2002). Uma vez que *T. gondii* chega à lâmina própria, os parasitos encontram tanto as células imunes residentes como as recrutadas que auxiliam na produção de citocinas e apresentação de antígenos (Buzoni-Gatel et al., 2006).

Os mecanismos de defesa ativados nesta fase precoce da infecção são inespecíficos, porém importantes para a organização da resposta específica. Algumas citocinas tem um papel importante nessa fase. A interleucina-12 (IL-12) tem uma variedade de efeitos nas células imunes, incluindo a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), citotoxicidade mediada por células NK, proliferação e diferenciação celular (Kobayashi et al., 1989). Os neutrófilos e os monócitos inflamatórios são as primeiras células que vão para o lúmen do intestino delgado de camundongos infectados (Gregg et al., 2013; Coombes et al., 2013). No local da infecção os monócitos inflamatórios podem se diferenciar em macrófagos ou em células dendríticas (Muller et al., 1999). Estas células ajudam na eliminação do parasita fagocitando, recrutando e estimulando a apresentação de antígenos (Reis e Sousa et al., 1997; Bliss et al., 2000). IL-12 estimula as NK a produzirem IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimulam a atividade microbicida dos macrófagos (Cordeiro et al, 2008).

A imunidade celular mediada pelos linfócitos T atua como mecanismos de defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de células infectadas, onde estão protegidos de anticorpos. Em resposta a estimulação antigênica, os linfócitos TCD4 liberam citocinas que estimulam a proliferação e a diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Os linfócitos T citotóxicos eliminam células infectadas por microrganismos intracelulares. Os linfócitos Th são divididos em Th1 e Th2. Linfócitos T CD4 são essenciais em ambas às respostas, as quais medeiam tanto à resposta imune celular, quanto a humoral respectivamente e diferem de acordo com as citocinas que

sintetizam. Células Th1 produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . As células de perfil Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e são responsáveis pela defesa contra infecções por helmintos, artrópodes e por reações alérgicas (Cordeiro et al., 2008). Na toxoplasmose, a citocina chave para a resistência é a IFN- $\gamma$  envolvendo as atividades das células T CD4 e T citotóxicas, caracterizando resposta tipo Th1.

As células dendríticas controlam a magnitude e a qualidade da resposta Th1 com a produção de IL-12 (Scott e Hunter, 2002). A IL-27 também induz a produção de IFN- $\gamma$ , podendo atuar em sinergia com a IL-12, aumentando essa atividade. Tanto parasitas íntegros quanto antígenos solúveis são capazes de induzir a produção de IL-12 e, desta forma estimular células efetoras como linfócitos T e NK a produzir IFN- $\gamma$  (Buzoni-Gatel et al., 2006).

A secreção de IL-6 representa importante fator de resistência contra a infecção precoce (Jebbari et al., 1998). Células Th2 participam da regulação da resposta imune pela secreção de IL-4 (Roberts et al., 1996) e IL-10 que modulam a síntese tanto de IL-12 quanto de IFN- $\gamma$ . Assim respostas imunes excessivas que predisõem a sérias inflamações e as lesões teciduais podem ser evitadas (Neyer et al., 1997). Por outro lado, o fator beta transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e IL-10 podem diminuir a atividade de macrófagos e células NK levando a exacerbação da infecção (Hunter et al., 1995).

Dessa forma a ativação do sistema imune acontece por vários mecanismos. Além do reconhecimento de antígenos de *T. gondii*, a lesão celular e citólise geram sinais não específicos que alertam as células fagocitárias da presença do agressor (Scott et al., 2002). Como parasito intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é a principal defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii*.

## 1.12. Análise da expressão gênica

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida em um gene é traduzida em estruturas presentes em um determinado tipo celular (mRNA ou proteínas). Nos microrganismos o controle da expressão gênica serve principalmente para permitir que o seu crescimento e divisão sejam otimizados e, no caso dos microrganismos patogênicos, para que a infecção se estabeleça. Assim, a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos pode ser útil para caracterizar a resposta do estado do hospedeiro (Desroche et al., 2005).

A PCR em tempo real (qPCR) é considerada ideal para quantificar a expressão do gene, e é comumente empregada para validar as técnicas com maior rendimento, mas menor sensibilidade em geral, como à análise por microarray. qPCR depende da utilização de corantes fluorescentes para quantificar a transcrição do gene alvo, com o número do ciclo de amplificação em que estes corantes/transcrições são detectados, apresentando uma indicação quanto à abundância relativa ou absoluta das moléculas-alvo. A sensibilidade da qPCR constitui uma poderosa ferramenta para medição da expressão gênica, sobretudo quando as quantidades de amostra são limitadas ou a transcrição é expressa em um nível baixo. No entanto, essa sensibilidade também significa que uma grande dose de cuidado é necessária com relação ao desenho experimental e realização do procedimento (Walker et al., 2009).

Na literatura científica existem diversos estudos mostrando a importância da caracterização e identificação de genes endógenos adequados para análises em qPCR (Vandesompele et al., 2002; Maloukh et al., 2009; Nieto et al., 2009; Silveira et al., 2009; Kheirelseid et al., 2010; Maroufi et al., 2010). O propósito é padronizar as diferentes etapas para minimizar eventuais variações do procedimento experimental como: diferenças na quantidade inicial de amostra; integridade do RNA; eficiência na síntese do cDNA; e diferenças na atividade transcricional nos tecidos e células analisados. Considerando que tanto as sequências do gene endógeno como a sequência do gene de interesse estarão presentes na amostra testada, ambos apresentarão o mesmo

padrão de variação dentro do experimento, exceto em relação ao nível de expressão (Expósito-Rodríguez et al., 2008).

### **1.13. Justificativa**

Perante o cenário descrito, observa-se que a maioria dos casos de toxoplasmose são assintomáticos, porém alguns indivíduos apresentam a forma ocular, podendo levar a cegueira e aqueles com coinfeção toxoplasmose/ AIDS, podem apresentar uma forma grave disseminada. Deste modo é importante que diferentes parâmetros da toxoplasmose sejam estudados para o melhor entendimento da imunopatogenia da doença.

De acordo com Meira et al. (2014), pacientes que desenvolveram a toxoplasmose cerebral ou a forma ocular apresentam altos índices de TNF- $\alpha$  e baixos de IFN- $\gamma$  comparados ao grupo controle, sugerindo que baixos níveis de IFN- $\gamma$  favorece o desenvolvimento de lesões oculares pela baixa produção desta citocina no controle da infecção. Estes dados indicam ainda que altos níveis de TNF- $\alpha$  encontrados refletem a alta resposta inflamatória desencadeada pelo parasito e que a pequena produção de IL-10 indicaria uma suscetibilidade à infecção.

Dando continuidade ao estudo, foram acompanhados os níveis de citocinas ao longo do tratamento em outro grupo de pacientes que desenvolveram a toxoplasmose cerebral. Os resultados revelaram um aumento gradual na produção de IFN- $\gamma$  e diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 em alguns pacientes (Meira et al., 2015).

Nestes estudos foi analisada a produção das citocinas liberadas por células e posteriormente dosadas por ELISA. Os resultados gerados nestes estudos nos levaram a investigar se pacientes são capazes ou não de expressar genes codificadores de algumas citocinas primordiais para o controle da infecção. Assim foram investigadas a forma assintomática e as duas formas sintomáticas da doença, a ocular e a forma mais grave e mortal da infecção, a

disseminada. Para este estudo foi utilizada outra abordagem metodológica a expressão de genes codificadores para citocinas.

## **2. Objetivo Geral**

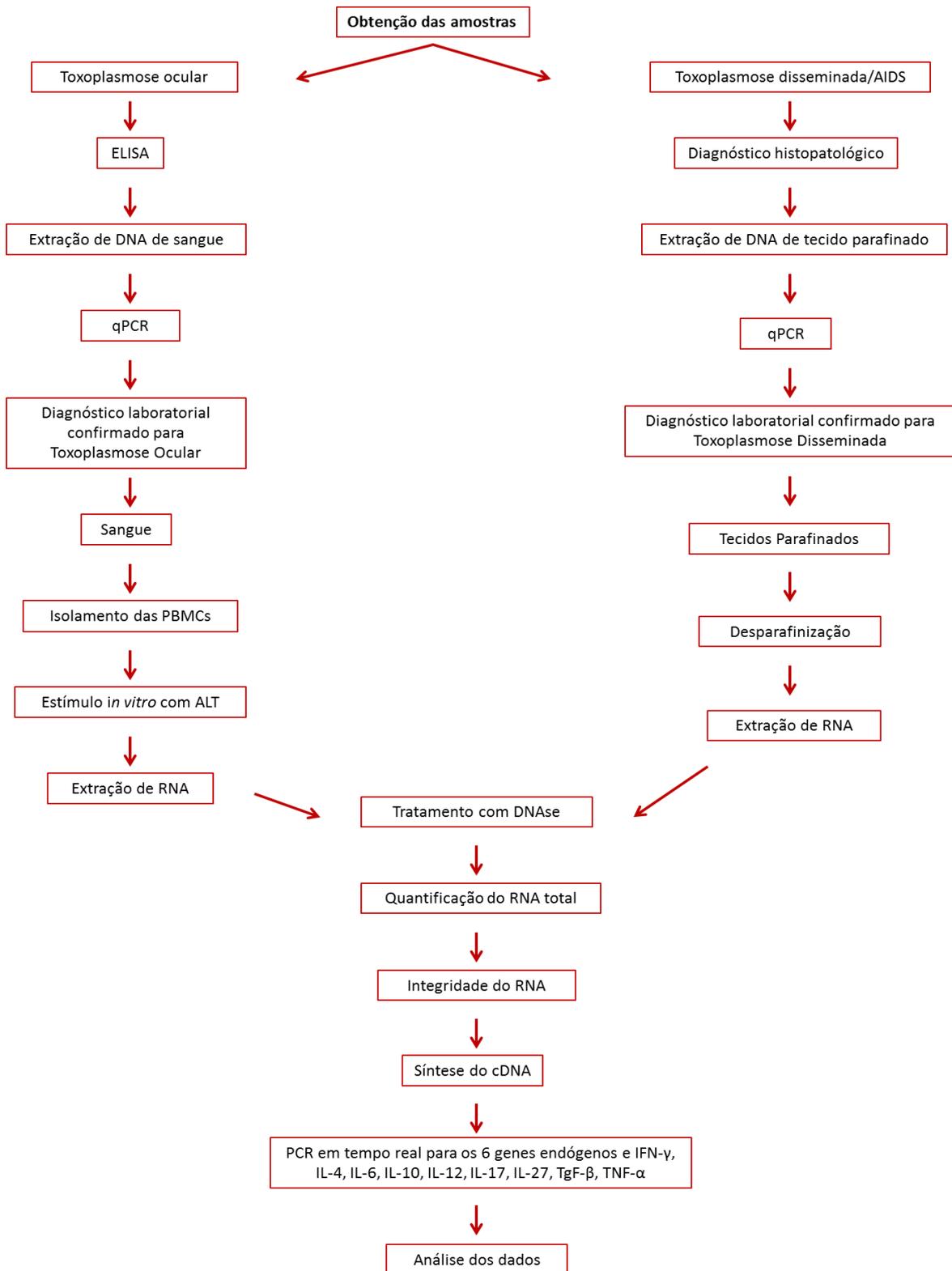
Avaliar a expressão dos genes codificadores das citocinas relacionadas às respostas Th1, Th2 e Th17 em amostras de células mononucleares do sangue periférico e tecido parafinado de pacientes com toxoplasmose sintomática.

### **2.1. Objetivos Específicos**

1. Padronização da extração de RNA de células mononucleares do sangue periférico e de tecidos parafinados de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para toxoplasmose;
2. Avaliar a expressão dos genes endógenos GAPDH, 18S, B2M, MT-ATP, UBC, TBP em células mononucleares do sangue periférico e de tecidos parafinados de pacientes com toxoplasmose, a fim de se estabelecer o gene endógeno adequado a ser utilizado como normalizador nos ensaios de expressão gênica pela qPCR;
3. Avaliar a expressão dos genes codificadores de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e, IL-27, relacionadas às respostas Th1, Th2 e Th17 em células mononucleares do sangue periférico e de tecidos parafinados de pacientes com toxoplasmose.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento Experimental



### **3.2. Considerações éticas**

Este trabalho foi aprovado no comitê de ética humana do Instituto Adolfo Lutz, sob o número: 1034567(Anexo 1).

### **3.3. Pacientes e amostras clínicas**

Foram analisadas 77 amostras clínicas divididas em 4 Grupos. O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose (descrito abaixo) foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Instituto Adolfo Lutz.

O Grupo I foi constituído de 22 amostras de autópsias fixadas em formol e incluídas em parafina (11 amostras de pulmão e 11 amostras de cérebro) provenientes de 11 pacientes que foram a óbito com a coinfeção AIDS/toxoplasmose disseminada, durante o período de janeiro de 2005 a dezembro de 2011. Estas amostras foram provenientes de um banco de autópsias formolizadas e emblocados em parafina e pertencentes ao arquivo do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

O Grupo II foi constituído de 23 amostras de sangue de pacientes com toxoplasmose ocular provenientes do Ambulatório de Retinopatia, Fundação Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base de São José do Rio Preto. Estes pacientes foram diagnosticados clinicamente e por imagem com retinocoroidite toxoplásmica pela visualização das características da retina, como o local e o tamanho das lesões exsudativas ou cicatrizes.

O Grupo III foi constituído de 9 amostras de sangue de indivíduos com toxoplasmose crônica (assintomáticos e imunocompetentes). Estas amostras foram coletadas de voluntários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

O Grupo IV, denominado “controle negativo”, foi constituído de 18 amostras negativas, sendo 8 amostras de tecido cerebral e 8 de tecido pulmonar de pacientes que foram a óbito de etiologia não infecciosa, provenientes de um banco de autópsias formolizadas e emblocados em parafina e pertencentes ao arquivo do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. O grupo IV também foi constituído de 7 amostras de sangue negativas para toxoplasmose, provenientes de voluntários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

### **3.4. Coleta de amostras clínicas**

#### **3.4.1. Sangue Periférico**

As amostras de sangue coletadas dos pacientes dos Grupos II, III e IV consistiram em 10 mL de sangue periférico coletados com heparina sódica para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e extração de RNA, e 5 mL de sangue periférico coletados com EDTA para a extração de DNA e realização da PCR.

#### **3.4.2. Tecidos Parafinados**

As amostras de tecidos estavam formalizadas e parafinadas e foram provenientes de pacientes que foram a óbito no Instituto de Infectologia Emílio Ribas com diagnóstico de toxoplasmose disseminada grave. As autópsias foram encaminhadas para o Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico anatomopatológico e histopatológico, a seguir foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Instituto Adolfo Lutz, onde foi realizado o diagnóstico molecular.

Foram utilizados fragmentos de autópsias de tecido cerebral e pulmonar incluídas em parafina de 11 pacientes com toxoplasmose disseminada. Foram retirados de cada bloco, com auxílio de um micrótomo, alíquotas de 5-10 micrometros para a extração do DNA e RNA.

### **3.5. Diagnóstico clínico e histopatológico nos tecidos incluídos em parafina**

O diagnóstico da toxoplasmose disseminada foi determinado por médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e foi baseado em características clínicas, radiológicas e laboratoriais. Todos os pacientes tinham o diagnóstico prévio de HIV. O diagnóstico clínico foi definido de acordo com as “*definições de diagnóstico clínico-radiológico de toxoplasmose em pacientes com AIDS*” (CDC, 1993; Potergies et al., 2004). As reações de imunohistoquímica e histopatológica foram realizadas pelos pesquisadores do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. A presença de taquizoítos nos cortes histológicos foi determinada por microscopia ótica após coloração pela hematoxilina-eosina e pelo método imunohistoquímico.

### **3.6. Diagnóstico Sorológico e Molecular**

#### **3.6.1. ELISA**

O antígeno utilizado no ELISA foi produzido pela sonicação de taquizoítos da cepa RH, que é rotineiramente mantida no Instituto Adolfo Lutz por inoculações em camundongos ou por replicações em culturas celulares (Meira et al., 2008). As reações foram realizadas em placas de poliestileno (96 orifícios), onde o antígeno foi diluído em bicarbonato de sódio e distribuído nos orifícios. Os plasmas (1/200) foram diluídos em PBS-leite desnatado 5% e

incubados a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente incubadas com o segundo anticorpo IgG conjugado à peroxidase, na diluição de 1/20.000 por igual período. A revelação ocorreu com a adição de 100 µL do substrato enzimático contendo 0,5 mg/ml de OPD (orto-fenilenodiamina) diluído em fosfato de sódio dibásico 0,1M pH 4.5; ácido cítrico 0,1M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% por 30 minutos em câmara escura, a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N. Os resultados foram avaliados por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492 nm. Este ensaio foi realizado para a definição dos grupos II, III e IV.

### **3.6.2. Extração de DNA em tecidos incluídos em blocos de parafina**

As extrações de DNA dos tecidos parafinados foram realizadas como descrito previamente (Bastos da Silva et al., 2016) e pelo kit comercial DNA QIAamp® DNA FFPE Tissue conforme instruções do fabricante. Inicialmente retirou-se o excesso de parafina das amostras de tecidos com bisturi estéril. A parte onde continha o tecido foi cortada em pedaços de 5 a 10 µm. A seguir, os fragmentos foram colocados em tubos de 1,5 a 2 mL com 1 mL de xilol, agitados em vórtex por 10 segundos e centrifugados na 11.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram removidos. Os tubos contendo os sedimentos foram abertos e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, para que os resíduos de xilol evaporassem completamente. Os precipitados foram utilizados para extração de DNA com o Kit de extração. Primeiramente, os sedimentos foram diluídos em 180 µL de “Buffer ATL” e 20 µL de proteinase K, agitados em vórtex por 10 segundos e centrifugados por 1 minuto a 11.000 g. A seguir, as amostras foram incubadas a 56°C por 60 minutos ou até completa lise do tecido. A seguir, as amostras foram incubadas a 90°C por mais 60 minutos. Uma nova centrifugação por 1 minuto, o conteúdo da parte de baixo do tubo (fase limpa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e adicionados 200 µL do Buffer AL, agitado no vortex, incubado por 5 minutos a 56°C. Em seguida foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%), homogeneizado em vortex e centrifugado a 11.000g. Cuidadosamente, o lisado

foi transferido para uma coluna QIAamp MinElute, com um tubo de coleta de 2 mL, e centrifugado a 6.000 g por 1 minuto. A seguir, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. As lavagens foram realizadas com 500 µL do Buffer AW1 e 500 µL do “Buffer AW2” seguidas das centrifugações de 6.000g por 1 minuto. Após uma nova centrifugação de 11.000g por 3 minutos, as moléculas de DNA foram eluídas com 50 µL do Buffer ATE, incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e, centrifugadas a 11.000 g por 1 minuto.

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (Thermo Fischer Scientific®). As concentrações de DNA foram determinadas pelas leituras realizadas a 260 nm. A pureza das moléculas de DNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorvância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de cerca de 1.8 é interpretada como DNA livre de impurezas. A seguir, as amostras de DNA foram armazenadas -20°C até o momento do uso.

### **3.6.3. Extração de DNA de sangue em EDTA**

As amostras de sangue foram coletadas em EDTA e centrifugadas a 2.000 g por 15 minutos para a separação do plasma. O plasma foi retirado e congelado a -20°C para a realização do ELISA. A seguir, em cada papa de hemácias foram adicionados cerca de 8 mL de PBS e a mistura centrifugada a 2.000 g por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados tampão ACK (três vezes o volume da papa de hemácias), incubadas até a lise total das hemácias e centrifugadas a 2.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado transferido para um tubo de 1.5 mL. (Colombo et al., 2005). A seguir, foram adicionados à amostra, 20 µL de Protease Qiagen (Proteinase K) e 200 µL do tampão AL. A mistura foi agitada vigorosamente no vórtex e incubada a 56°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 200 µL de etanol 100% e o conteúdo foi transferido cuidadosamente para a coluna QIAamp Mini Spin, sem molhar a borda, e foi centrifugado a 6.000 g por um minuto. Depois da centrifugação a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi desprezado. Na sequência foram adicionados 500 µL do

tampão AW1 e novamente centrifugado a 6.000 g por um minuto. Posteriormente a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, adicionados 500 µL do tampão AW2 e centrifugada a 12.000 g por três minutos. Após a centrifugação a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionado 50 µL do tampão AE, incubada por cinco minutos a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada a 6.000 g por um minuto.

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (Thermo Fischer Scientific®). As concentrações de DNA foram determinadas pelas leituras realizadas a 260 nm. A pureza das moléculas de DNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorbância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de cerca de 1.8 é interpretada como DNA livre de impurezas. A seguir, as amostras de DNA foram armazenadas -20°C até o momento do uso.

#### 3.6.4. qPCR

As amplificações em qPCR foram realizadas utilizando um controle positivo, a partir de DNA extraído de taquizoítos mantidos em cultura e um controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura que substituiu o DNA. O primer ou iniciador utilizado foi o REP-529, que amplifica uma região de *T. gondii* altamente repetitiva (REP-529) (Robert-Gangneux et al., 2010; Belaz et al., 2015). O desenho do ensaio incluiu o marcador molecular “forward” (5'AGAGACACCGGAATGCGATCT3'); “reverse” (5'TTCGTCCAAGCCTCCGACT3'); e a sonda de hibridização (5'TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA3') marcada com FAM (6-carboxyfluorescein) e BHQ1 (Black Hole Quencher 1) nas terminações 5' e 3' respectivamente. Para confirmar a qualidade das amostras de DNA, juntamente com as reações foram incluídas mais uma reação para amplificar uma região 18S de eucariotos “Eukaryotic 18S rRNA gene” (GenBank accession code X03205.1) (Applied Biosystems). As reações foram realizadas num volume final de 20 µL. As amostras de DNA (3 µL de cerca de 100 ng/µL), DNA de *T. gondii* - controle (5 ng/µL) foram misturadas com 10 µL do 2X

TaqMan Universal PCR Master Mix e 1,25  $\mu$ L do ensaio (18  $\mu$ M do marcador “forward” e “reverse”; e 5  $\mu$ M da sonda de hidrólise. As amplificações foram realizadas no equipamento 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) ou no equipamento AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies) usando o ciclo termal que incluiu: 2 minutos, 50°C, e 95°C por 10 min. A seguir, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O diagnóstico molecular da toxoplasmose foi realizado pelo biólogo Ricardo Gava (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos). O diagnóstico sorológico foi realizado para complementar o diagnóstico.

### **3.7. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)**

Para o isolamento de PBMC de sangue periférico, todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar estéril. As amostras de sangue heparinizadas foram diluídas volume/volume em PBS (pH 7.4) e homogeneizadas delicadamente. A seguir foram adicionadas delicadamente em um tubo de 15 mL contendo 3 mL de Ficoll-1077 (Sigma) e posteriormente centrifugadas a 2.000 *g* por 20 minutos. Após a centrifugação quatro fases distintas foram formadas: Plasma, PBMC, Ficoll, Eritrócitos e Granulócitos. Com auxílio de uma pipeta pasteur estéril as PBMCs foram retiradas e colocadas em tubo de 15 mL. Após a adição de PBS até completar 10 mL, as amostras foram centrifugadas a 2.000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As PBMCs foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a contagem em câmara de Neubauer as PBMCs foram cultivadas em placas de culturas estéreis na concentração de  $1 \times 10^6$ /poço (Meira et al., 2014). As PBMCs então foram estimuladas com 1  $\mu$ g / mL de antígeno lisado de *T. gondii* (ALT). Como controle positivo, um poço de células da placa foi estimulado com 2  $\mu$ g / mL de fito-hemaglutinina (PHA). Outro poço da placa, contendo somente o meio de cultura, foi utilizado como controle negativo. As culturas de PBMC foram mantidas a 37 °C numa atmosfera de 5%

de CO<sup>2</sup> e as células foram retiradas cuidadosamente após 48 h de estimulação. Nestas células, 200 µL de RNAlater® Stabilization Solution (Ambion™) foram adicionados para proteger o RNA celular de degradação. As células foram armazenadas a -70 ° C até o isolamento de RNA.

### **3.8. Extração de RNA das PBMCs**

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen) segundo as recomendações do fabricante. As PBMCs ( $1 \times 10^6$ /mL) foram centrifugadas por 5 minutos a 2.000 g para retirar o excesso do meio de cultura e o sobrenadante descartado e, em seguida, adicionou-se 350 µL do tampão RLT e as células agitadas por 2 minutos no vórtex. A seguir, foram acrescentados 350 µL de etanol 70%, homogenizadas e os 700 µL da amostra foram transferidos para a coluna RNeasy spin e centrifugados por 15 segundos a 8.000 g tendo seu filtrado descartado. Logo, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 a coluna e centrifugados por 15 segundos a 8.000 g. Seguiu-se uma nova etapa onde foram acrescentados 500 µL do tampão RPE na coluna e centrifugado novamente por 15 segundos a 8.000 g. Depois, outros 500 µL do tampão RPE foram novamente adicionados a coluna RNeasy spin e centrifugados por 2 minutos a 8.000 g para lavar a membrana. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e centrifugada a velocidade máxima durante 1 minuto. Em seguida a coluna foi colocada em um novo tubo de 1.5 mL, foi adicionado 30 µL de água livre de RNase para a eluição do RNA total após centrifugação de 1 minuto a 8.000 g.

### **3.9. Extração de RNA de Tecidos Parafinados**

As extrações de RNA foram realizadas com um kit comercial (RNeasy FFPE-Qiagen). Com um micrótomo histológico foram cortados seis fragmentos de cada tipo de tecido com espessura de 5 µm e colocados em

tubo de 1,5 mL. A seguir, os fragmentos foram tratados com 1 mL de xilol e centrifugados a 11.000 g por 2 minutos (por 2 vezes) e os sobrenadantes descartados. Em seguida, para a remoção do xilol foi adicionado 1 mL de etanol 100% e os tubos centrifugados a 11.000 g por 2 minutos e os sobrenadantes descartados. Na sequência, os tubos foram colocados com as tampas abertas em um dessecador (Speedvac) por 5 minutos para evaporar totalmente os resíduos de etanol nos tecidos. Logo após foram adicionados 240 µL de tampão PKD e 10 µL de proteinase K aos tubos e incubados a 56 °C até a completa lise do tecido e, em seguida, a 80°C por 15 minutos. Depois as amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo por 2 minutos e centrifugadas a 11.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 250 µL do tampão RBC. Depois foram adicionados 720 µL de etanol 100% e homogeneizado imediatamente e transferidos 600 µL da amostra para a coluna (RNeasy MinElute Spin column), centrifugados a 11.000 g por um minuto. Após a centrifugação o filtrado foi desprezado e o procedimento repetido até terminar toda a solução. Em seguida foram adicionados 500 µL de tampão RPE nas colunas e centrifugadas a 8.000 g por 1 minuto. As moléculas de RNA foram eluídas com 30 µL de água livre de RNase (DEPC) e as colunas centrifugadas a 8.000 g por um minuto. Em seguida as amostras foram tratadas com DNase para evitar eventual contaminação com DNA.

### **3.10. Digestão com DNase e Quantificação do RNA**

Após as extrações de RNA de FFPE e PBMC foram realizadas as digestões com o kit DNase (Ambion™), adicionando 3 µL do Turbo DNase Buffer 10x e 0,5 µL do Turbo DNase aos 30 µL de RNA e incubados a 37°C por 20 minutos. As reações foram inativadas com 3 µL do Reagente de Inativação da DNase, incubados a temperatura ambiente por 2 minutos, sendo centrifugados posteriormente a 8.000 g por 1,5 minutos. As moléculas de RNA, localizadas no sobrenadante foram transferidas para um novo tubo e imediatamente armazenadas a -70°C até o momento do uso.

A concentração de RNA total foi determinada pela análise no fluorímetro Quantus™ Fluorometer (Promega) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando 2 µL de amostra. A partir dessas quantificações foi realizada a síntese do DNA complementar.

### **3.11. Integridade do RNA**

As concentrações e a pureza de moléculas de RNA extraídas foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (Thermo Fischer Scientific®). As concentrações foram determinadas pelas leituras realizadas a 260 nm e a pureza das moléculas de RNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorvância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de cerca de 1.8 é interpretada como RNA livre de impurezas.

A partir desses dados foi realizada a avaliação da integridade do RNA total utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer com o Agilent RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) conforme instruções do fabricante. O Nano Chip foi escolhido a partir dos resultados das análises no Nanodrop, onde as concentrações de RNA foram acima de 5 ng/µL e abaixo de 500 ng/ µL. A qualidade foi expressa pelo número de integridade do RNA (RIN), que varia de 1 a 10, onde 1 indica a pior e 10 a melhor qualidade (Schroeder, et al., 2006).

### **3.12. Padronização da síntese de DNA complementar (cDNA) para qPCR**

As fitas de cDNA foram sintetizadas a partir de 100 ng de RNA total utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) conforme instruções do fabricante. Foram utilizados 2 µL do Buffer RT 10X, 0.8µL do Mix de dNTP (100mM), 2 µL de Random Primers RT 10 X, 1 µL da transcriptase reversa, 1 µL do inibidor de RNase, 3.2 µL de água nucleasse-

free e 10 µL do RNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: Etapa 1: 25°C por 10 minutos; Etapa 2: 37°C por 120 minutos; Etapa 3: 85°C por 5 minutos e uma etapa final a 4°C.

A concentração ideal de RNA utilizada na síntese de cDNA foi previamente padronizada testando-se quatro concentrações (em duplicata) 25; 50; 100 e 200 ng/µL de RNA total.

### **3.13. Padronização da estabilidade de expressão dos genes endógenos**

O gene endógeno ideal a ser utilizado como normalizador nos ensaios de expressão gênica de citocinas foi determinado utilizando-se 10 amostras de PBMCs de pacientes com toxoplasmose ocular; 22 amostras de RNA extraídos de tecido parafinado, sendo 11 de tecido cerebral e 11 de tecido pulmonar de pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS.

A análise da expressão gênica dos genes endógenos foi realizada no equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando parâmetros de amplificação recomendados pelo fabricante. As reações foram realizadas em duplicata num volume final de 20µL. Para avaliação da expressão dos genes endógenos utilizamos os ensaios TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

Como não há um gene endógeno universal para todos os tipos celulares, foi avaliado a expressão de 6 genes constitutivos: GAPDH (Gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase), 18S (subunidade do RNA ribossomal), B2M (beta-2 microglobulina), MT-ATP (ATP mitocondrial), UBC (Ubiquitina C), TBP (TATA Box Binding Protein). As características dos genes e marcadores molecular e estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1. Genes endógenos humanos utilizados para a análise da expressão gênica.**

Gene	Nome	Número de Acesso	Função Biológica	Ensaio ID <sup>1</sup>	Produto	Localização no Cromossomo
18S rRNA	Subunidade do RNA ribossomal	[GenBank: X03205.1]	Formação do ribossomo	Hs99999901_s1	187	Nd <sup>2</sup>
GAPDH	Glyceraldeído-3-fosfato desidrogenase	[RefSeq: NM002046.4]	Envolvido na glicólise	Hs02758991_g1	93	12
TBP	TATA box-binding protein	[RefSeq: NM003194.3]	Fator de transcrição	Hs00427620_m1	91	6
B2M	Beta-2-microglobulina	[RefSeq: NM004048.2]	Ligação de proteína	Hs00984230_m1	81	15
UBC	Ubiquitina C	[RefSeq: NM021009.5]	Envolvido na degradação de proteínas	Hs00824723_m1	71	12
MT-ATP6	ATP mitocondrial	[GenBank: NC_012920.ATP6.0]	Participação na fosforilação oxidativa	Hs02596862_g1	150	10

**Fonte:** Meira-Strejovich et al., 2017.<sup>1</sup> adquiridos da Applied Biosystems. <sup>2</sup> não determinado.

### **3.14. Análise da expressão dos genes codificadores para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27 TGF- $\beta$ , e TNF- $\alpha$**

Para a análise da expressão dos genes codificadores para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF- $\beta$ , e TNF- $\alpha$  de pacientes com toxoplasmose sintomática a reação foi padronizada e os marcadores moleculares testados quanto à eficiência segundo a fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Todos os marcadores utilizados apresentaram eficiência maior ou igual a 89%. As características dos genes, marcadores moleculares e a eficiência estão descritos na Tabela 2. O estudo foi realizado com um total de 77 amostras clínicas descritas em detalhes no item 3.3. A expressão de cada gene foi determinada por qPCR em duplicata.

**Tabela 2. Genes codificadores para citocinas humanas utilizadas na análise da expressão gênica.**

<b>Gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Função Biológica</b>	<b>Ensaio ID<sup>a</sup></b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Localização no cromossomo</b>	<b>Eficiência</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Gamma Interferon	[RefSeq: NM_000619.2]	Codificação de proteína	Hs00989291_m1	73	12	94 %
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento e Transformação Beta	[RefSeq: NM_000660.5]	Codificação de proteína	Hs00998133_m1	57	19	93 %
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral	[RefSeq: NM_000594.3]	Codificação de proteína	Hs01113624_g1	143	6	92 %
<b>IL-4</b>	Interleucina 4	[RefSeq: NM_000589.3]	Codificação de proteína	Hs00174122_m1	70	5	91 %
<b>IL-6</b>	Interleucina 6	[RefSeq: NM_000600.4]	Codificação de proteína	Hs00985639_m1	66	7	91 %
<b>IL-10</b>	Interleucina 10	[RefSeq: NM_000572.2]	Codificação de proteína	Hs00961622_m1	74	1	95 %
<b>IL-12</b>	Interleucina 12	[RefSeq: NM_002187.2]	Codificação de proteína	Hs01011518_m1	72	5	91 %
<b>IL-17</b>	Interleucina 17	[RefSeq: NM_002190.2]	Codificação de proteína	Hs00174383_m1	80	6	89 %
<b>IL-27</b>	Interleucina 27	[RefSeq: NM_145659.3]	Codificação de proteína	Hs00377366_m1	75	16	98 %

### 3.15. Análise dos dados

#### 3.15.1. Estabilidade de expressão dos genes endógenos e codificadores para as citocinas

Para a estabilidade de expressão dos genes endógenos, os resultados gerados na qPCR foram analisados no programa geNorm (versão 3.5, <http://genorm.cmgg.be>) promovendo a comparação aos pares da expressão dos genes testados. Desta forma, um índice M foi gerado para cada gene, e este índice foi utilizado para determinar o gene que apresentou expressão mais estável. O programa geNorm recomenda índice M abaixo do limite de 1.5, e quanto menor o índice M, mais estável é a expressão do gene. Para confirmar os resultados do geNorm, foi realizada uma análise no programa NormFinder (Meira-Strejevich et al., 2017).

Para a análise das citocinas, os valores da expressão do mRNA foram mostrados como mediana através do  $\Delta CT$  segundo a fórmula:

$$\Delta CT = (\text{gene de referência} - \text{gene alvo})$$

Quanto maior o  $\Delta CT$ , maior é a quantidade de amplificação do alvo (Nai et al., 2016).

#### 3.15.2. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparação entre diferentes grupos no software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose**

#### **4.1.1. Pacientes com toxoplasmose ocular**

Os 23 pacientes com toxoplasmose ocular, foram admitidos e tratados no Ambulatório de Oftalmologia da Fundação Faculdade Regional de Medicina do Hospital de Base, em São Paulo. Foram clinicamente diagnosticados como portadoras de cicatrizes de retinocoroidite toxoplásmica, e a avaliação clínica foi realizada sob exame fundoscópico utilizando oftalmoscopia binocular indireta, lente 20D (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon Corporation, EUA). O diagnóstico clínico de toxoplasmose ocular foi baseado na visualização da retina e na descrição da característica, do local e do tamanho das lesões ou cicatrizes exsudativas (Mattos et al., 2011; Ferreira et al., 2014). Para determinar o diagnóstico laboratorial minimamente invasivo, conforme definido anteriormente (Mattos et al., 2011), amostras de sangue foram coletadas antes ou até o terceiro dia da terapia antiparasitária para toxoplasmose.

O estudo foi retrospectivo e realizado por sessenta meses, de maio de 2012 a maio de 2016. Foram analisadas amostras de sangue de 27 indivíduos com idade entre 15 a 76 anos, sendo 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3. Resultados clínicos e laboratoriais dos 23 pacientes com toxoplasmose ocular**

<b>Pacientes com toxoplasmose ocular</b>	<b>n= 23</b>
<b>Data da coleta das amostras (ano)</b>	2014-2016
<b>Média de idade</b>	63 (15-76)
<b>Gênero</b>	12M-11F
<b>Diagnóstico clínico<sup>1</sup></b>	RtC ativa (14%) <sup>2</sup> RtC ativa e cicatriz (2%) Cicatriz RtC (84%)
<b>PCR positivo no sangue (DNA de <i>T. gondii</i>)</b>	39% (9/23)
<b>Anticorpo IgG Anti-<i>T. gondii</i></b>	
<b>ELISA</b>	100% (23/23)

<sup>1</sup> O diagnóstico foi definido por dados clínicos, de imagens e laboratoriais, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. <sup>2</sup> Cicatrizes ativas e retinocoroidíicas (RtC) nos olhos direito e esquerdo, respectivamente. Pos, positivo.

#### **4.1.2. Pacientes com toxoplasmose disseminada e AIDS**

Os 11 pacientes que foram a óbito com coinfeção toxoplasmose disseminada severa e AIDS tiveram o diagnóstico confirmado pelos dados clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos nos fragmentos de autópsias.

Os fragmentos tinham numerosos cistos de *T. gondii* especialmente nas amostras de tecido cerebral e pulmonar usadas neste estudo. Da mesma forma, as amostras de DNA extraídas das autópsias foram todas positivas (Bastos-Silva et al., 2016). Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4. Resultados clínicos e laboratoriais dos 11 pacientes com toxoplasmose disseminada.**

Paciente – Código	Idade (Anos)	Sexo	Diagnóstico <sup>1</sup>	PCR/ <i>T. gondii</i>	HIV (Sorologia)	Histopatológico p/ <i>T. gondii</i> em autopsia	Status do paciente
			(Clínico, imagem e laboratorial)				
Paciente 1 A04/05	39	M	Toxoplasmose disseminada e CMV	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 2 A13/05	31	F	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 3 A21/05	24	F	Toxoplasmose disseminada e neurotuberculose	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 4 A6/06	40	M	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 5 A21/07	50	M	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 6 A11/08	38	F	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 7 A12/09	30	M	Toxoplasmose disseminada e amebíase generalizada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 8 A39/09	40	M	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 9 A02/10	43	M	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 10 A6/11	30	F	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito
Paciente 11 A21/11	59	M	Toxoplasmose disseminada	Pos	Pos	Pos	Óbito

**Fonte:** Bastos da Silva et al., 2016.<sup>1</sup> O diagnóstico foi definido por dados clínicos, de imagens e laboratoriais, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. Pos, positivo.

#### **4.1.3. Grupo Controle**

O Grupo Controle foi composto por 9 amostras de indivíduos crônicos para toxoplasmose (44% do sexo masculino e 56% do sexo feminino). Foi realizado o teste ELISA para confirmar a positividade para toxoplasmose e todas as amostras se mostraram positivas (presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*). As amostras foram cedidas por voluntários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

#### **4.1.4. Grupo Negativo**

Foi composto por 8 amostras de tecido cerebral e 8 amostras de tecido pulmonar de pacientes que foram a óbito de etiologia não infecciosa e 7 amostras de sangue negativas para toxoplasmose.

### **4.2. Padronização da extração de RNA de tecidos parafinados**

Para a padronização da extração de RNA foram testados cinco tempos de incubação a 56°C: 15, 30 minutos, 1, 3 e 18 horas, sendo que o tempo de 18 horas foi o que apresentou melhores resultados após quantificação no fluorímetro. Nos outros tempos não se obteve quantificação satisfatória.

### **4.3. Quantificação e Integridade de RNA total**

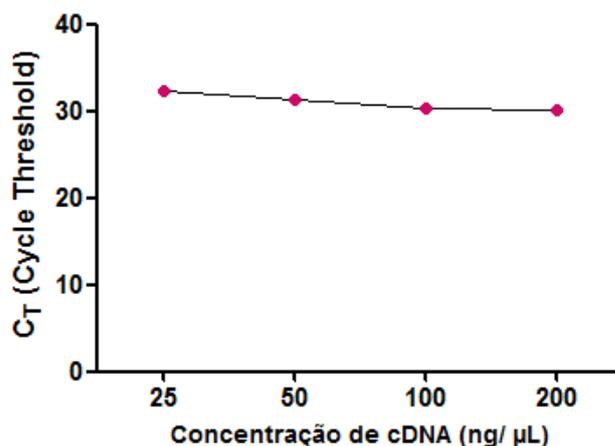
As quantificações de RNA total, de PBMC e FFPE, determinadas pelo fluorímetro Quantus<sup>TM</sup> Fluorometer (Promega) variaram de 15 a 109 ng/μL. A

partir dessa quantificação foi realizado o cálculo para a síntese do DNA complementar.

Os RINs das amostras de PBMC foram acima de 7.0, sendo considerados de ótima qualidade. Os RINs de FFPE variaram de 1.9 a 5.1. Estes valores foram considerados satisfatórios. O RIN a partir de 1.4 para amostras FFPE é adotado como limite para se considerar o RNA como de qualidade aceitável para a qPCR (Mandabusi et al., 2006).

#### 4.4. Padronização da síntese e concentração de cDNA utilizada na qPCR

Todas as concentrações foram suficientes para ocorrer as amplificações na qPCR, como mostra a Figura 10 e a Tabela 5. A comparação entre os Cycle threshold ( $C_T$ ) mostram que as concentrações de 100 e 200 ng/ $\mu$ L variaram apenas 0.3  $C_T$ , assim a de menor concentração foi escolhida por utilizar menos RNA para a reação.



**Figura 10** - Padronização da concentração de RNA total para síntese de cDNA.

**Tabela 5.** Padronização da concentração de RNA total para síntese de cDNA.

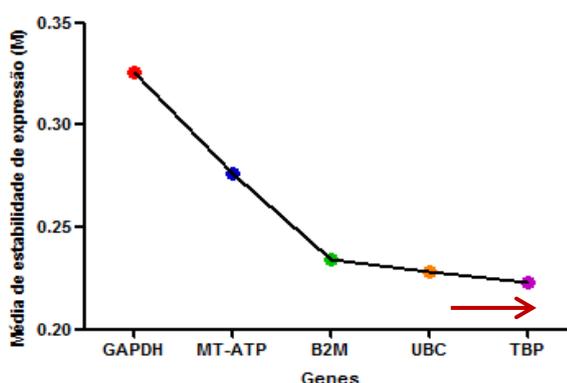
Concentração de cDNA ng/ $\mu$ L				
	25	50	100	200
$C_T$	32,41	31,25	30,34	30,07

#### 4.5. Padronização e análise da expressão dos genes endógenos em PBMC

TBP foi o gene endógeno que apresentou menor variação em PBMC. Os índices M (Figura 11) e as médias de  $C_T$ , respectivamente foram: 26.73 e 0.045 nas amostras dos pacientes do Grupo II; 29.45 e 0.219, nas do Grupo III; e 30.05 e 0.136.

Os genes que apresentaram maior variação entre os Grupos (média de  $C_T$  e índice M) foram: MT-ATP (32.13 e 0.110 no Grupo II e de 28.10 e 0.282 no Grupo III); e UBC (24.19 e 0.266 no Grupo III).

Os resultados mostraram que gene endógeno ideal a ser utilizado para ensaios de expressão gênica em PBMC é o TBP por apresentar maior estabilidade e menor variabilidade entre as amostras. Os genes MT-ATP, GAPDH e UBC foram altamente variáveis, não sendo bons candidatos a serem utilizados como normalizadores em PBMC.

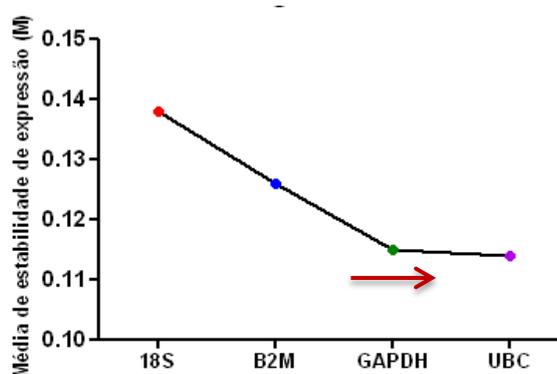


**Figura 11** - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em PBMC por gene testado. Quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. A seta indica o gene mais estável.

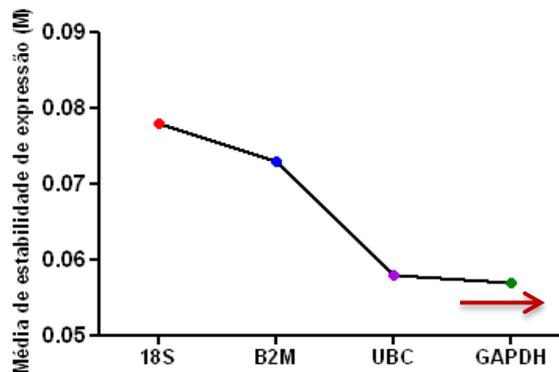
#### 4.6. Padronização e análise da expressão dos genes endógenos em tecidos parafinados

Foram analisadas 22 amostras de tecido parafinado, 11 de cérebro e 11 de pulmão. A figura 12 mostra os índices M dos genes endógenos testados em pulmão. Os resultados foram: 34.08 e 0.138 para o gene 18S; 34.40 e 0.115 para GAPDH; 30.59 e 0.114 para UBC; 33.23 e 0.126 para B2M.

A figura 13 mostra o índice M dos genes endógenos testados em cérebro. Os resultados foram: 34.26 e 0.078 para 18S; 33.75 e 0.057 para GAPDH; 30.49 e 0.058 para UBC; 33.34 e 0.073 para B2M. Para o cérebro o gene mais estável foi o GAPDH. Para o pulmão o gene mais estável foi o UBC, porém optou-se pelo GAPDH por ser o segundo mais estável e foi utilizado junto com as amostras de cérebro. Portanto para ambos tecidos, o gene de escolha foi o GAPDH. O mais variável foi o 18S. Os marcadores moleculares para os genes TBP e MT-ATP não foram positivos em nenhuma das amostras.



**Figura 12** - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em pulmão por gene testado. Quanto, onde quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. A seta indica o gene mais estável.

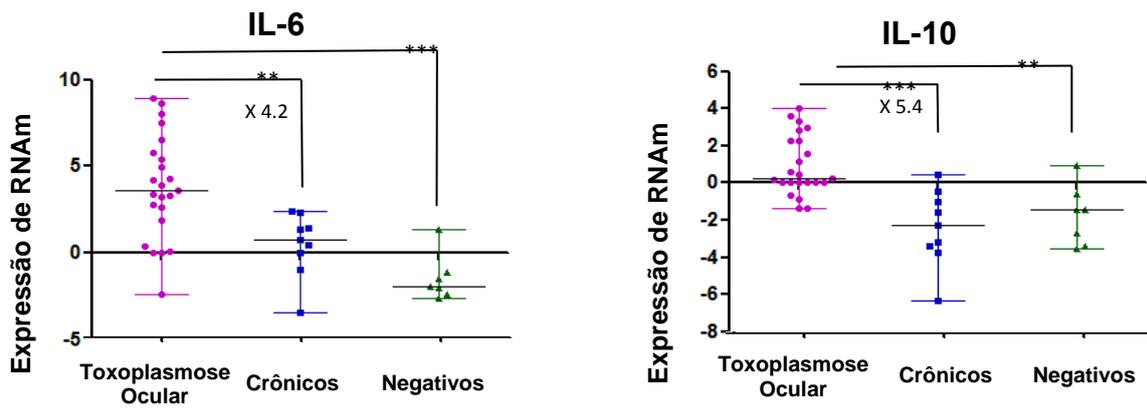


**Figura 13** - Média de estabilidade de expressão (Índice M) em cérebro por gene testado. Quanto, onde quanto menor o valor de M, mais estável é o gene. A seta indica o gene mais estável.

#### 4.7. Análise da expressão dos genes codificadores para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF- $\beta$ e TNF- $\alpha$ em PBMC de pacientes com toxoplasmose ocular

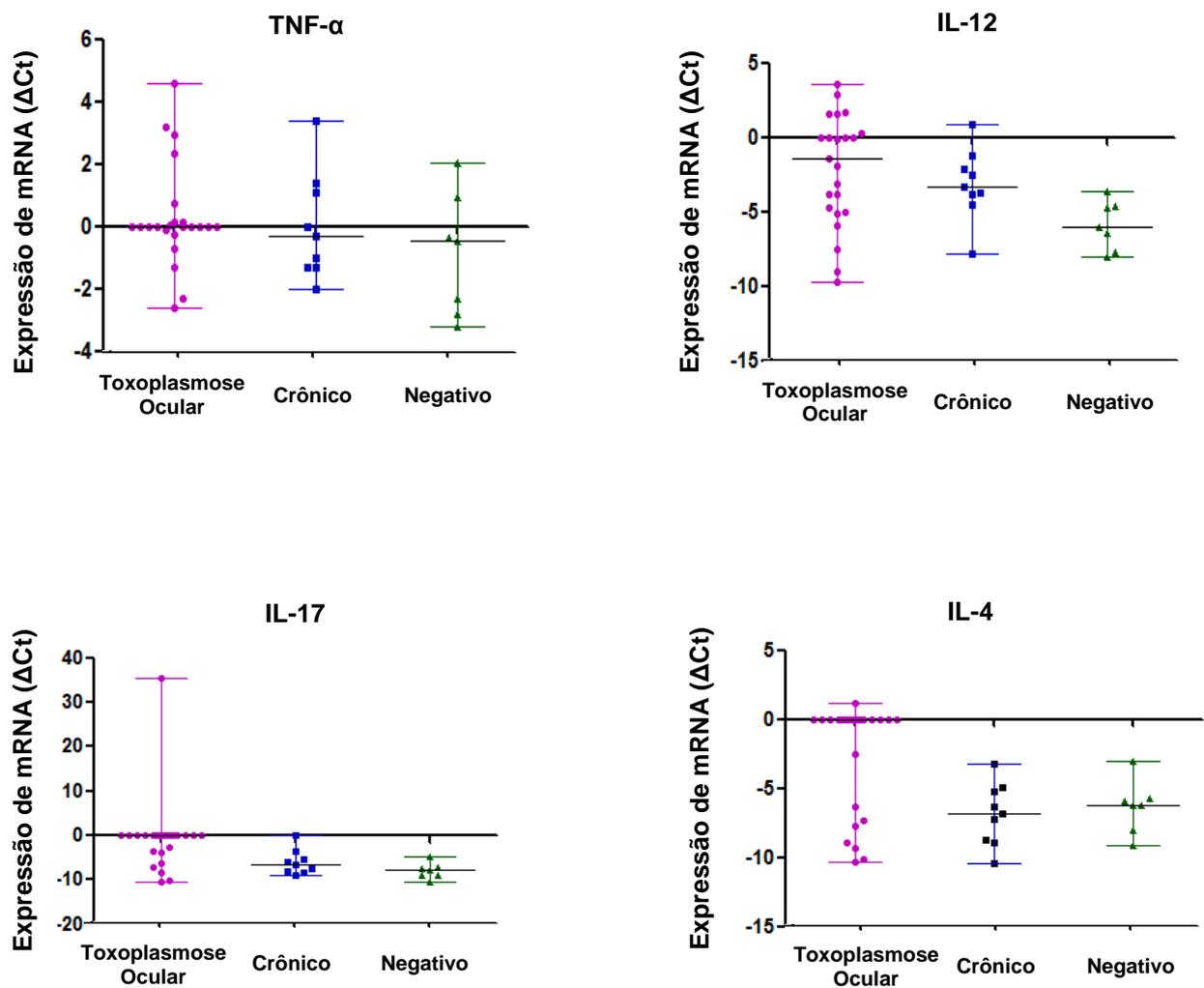
Em resposta ao ALT, os níveis de mRNA para IL-6 foram mais expressos em pacientes com toxoplasmose ocular, quando comparados aos indivíduos com toxoplasmose crônica e negativos, com resultados estatisticamente significantes ( $p < 0.005$  e  $p < 0.0005$ , respectivamente).

Para IL-10, os níveis de mRNA foram mais expressos em pacientes com toxoplasmose ocular, quando comparados aos indivíduos com toxoplasmose crônica e negativos, com resultados estatisticamente significantes ( $p < 0.0005$  e  $p < 0.005$ , respectivamente), como mostra a Figura 14.



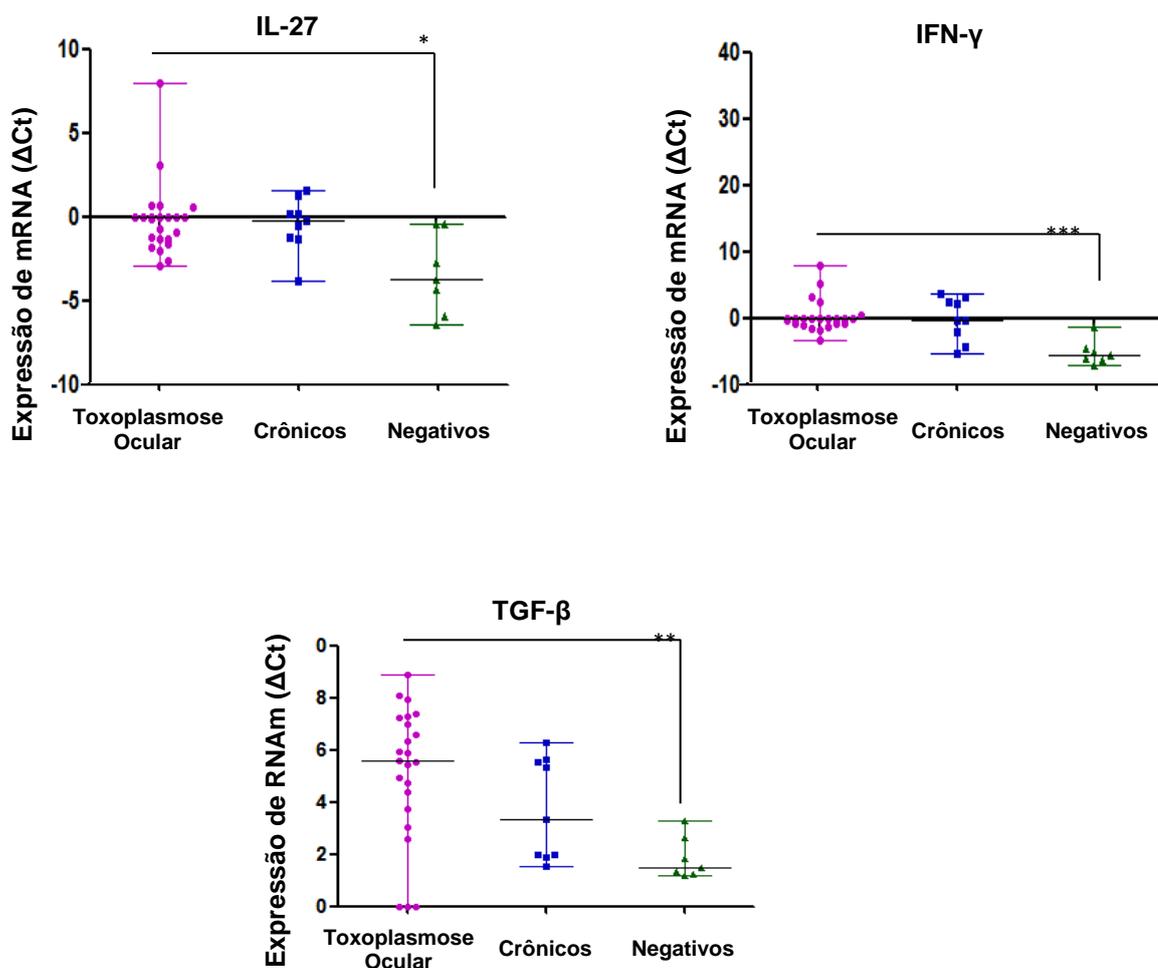
**Figura 14** - Expressão dos genes codificadores para citocinas IL-6, IL-10 de PBMC.

Em resposta ao ALT, os níveis de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17 e IL-4 também foram mais expressos em pacientes com toxoplasmose ocular em comparação com indivíduos com toxoplasmose crônica e negativos embora sem significância estatística ( $p > 0,05$ ), como mostra a Figura 15.



**Figura 15** - Expressão de mRNA para os genes codificadores para as citocinas TNF-  $\alpha$ , IL-12, IL-17 e IL-4 de PBMC.

Em contraste, os níveis de mRNA de IL-27 e IFN- $\gamma$  em PBMC de pacientes com toxoplasmose ocular foram estatisticamente mais expressos em comparação com os negativos ( $p < 0.05$  e  $p < 0.0005$ , respectivamente). Os níveis de mRNA para TGF- $\beta$  foram mais expressos em pacientes com toxoplasmose ocular em comparação aos indivíduos negativos, com resultados estatisticamente significantes ( $p < 0.005$ ), como mostra a Figura 16.



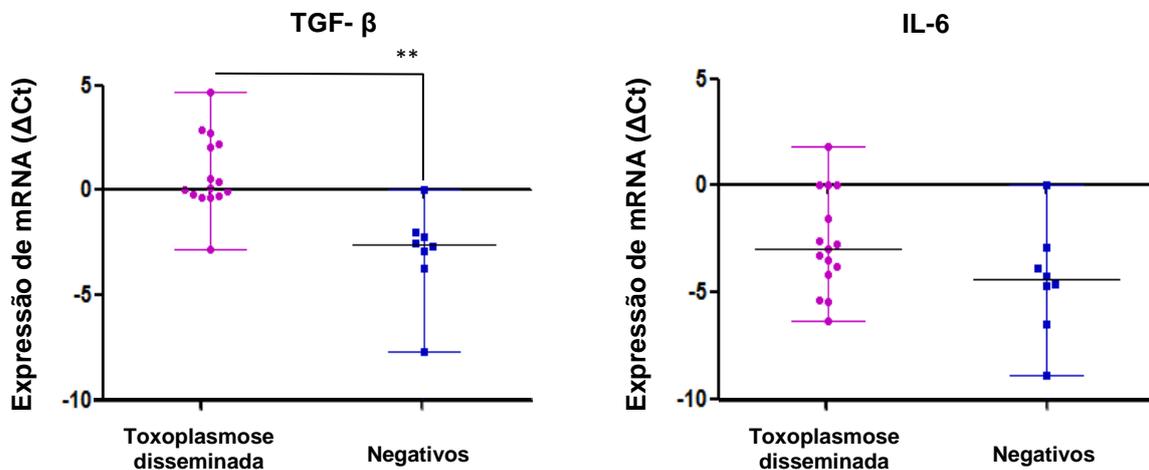
**Figura 16** - Expressão de genes codificadores para as citocinas IL-27, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  de PBMC.

#### 4.8. Análise da expressão dos genes codificadores de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF- $\beta$ e TNF- $\alpha$ em tecidos parafinados de pacientes com toxoplasmose disseminada

Os níveis de mRNA para citocinas também foram avaliados em amostras de cérebro e pulmão de FFPE de pacientes com coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS.

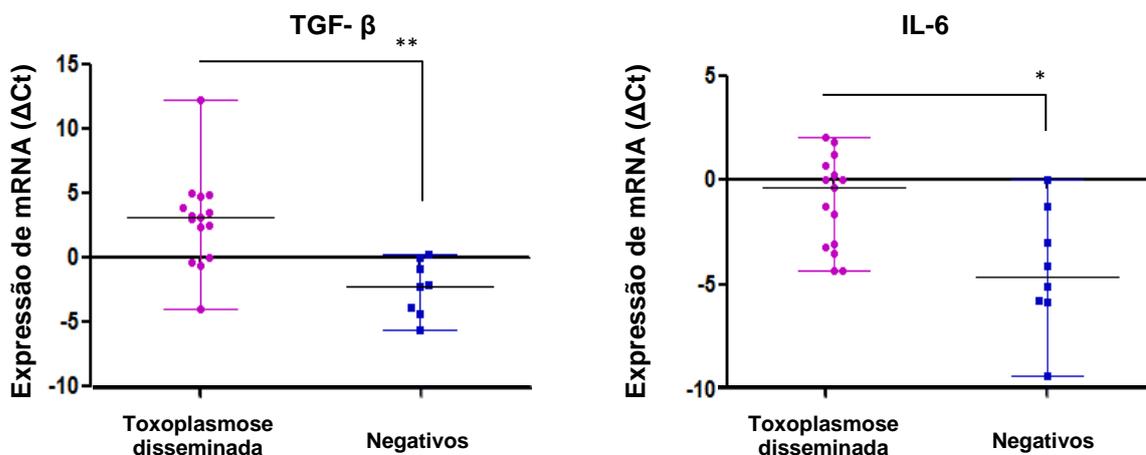
Em amostras de cérebro, níveis de mRNA para TGF- $\beta$  foram significativamente mais expressos em pacientes com a coinfeção

toxoplasmose disseminada/AIDS em comparação com os indivíduos negativos ( $p < 0.005$ ). Entretanto não houve diferença estatística em relação à expressão de mRNA de IL-6, como mostra a Figura 17.



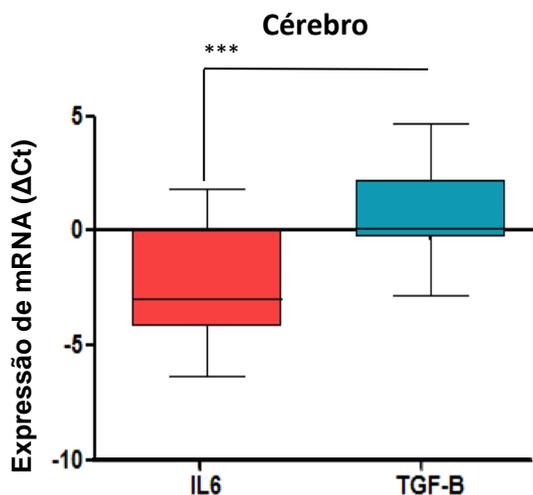
**Figura 17** - Expressão de mRNA dos genes codificadores para as citocinas TGF- $\beta$  e IL-6 em cérebro de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.

Em amostras de pulmão, níveis de mRNA para TGF- $\beta$  e IL-6 foram significativamente mais expressos em pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS em comparação aos indivíduos negativos ( $p < 0.005$  e  $p < 0.05$ , respectivamente) (Figura 18). No entanto, não foi possível detectar as outras citocinas.



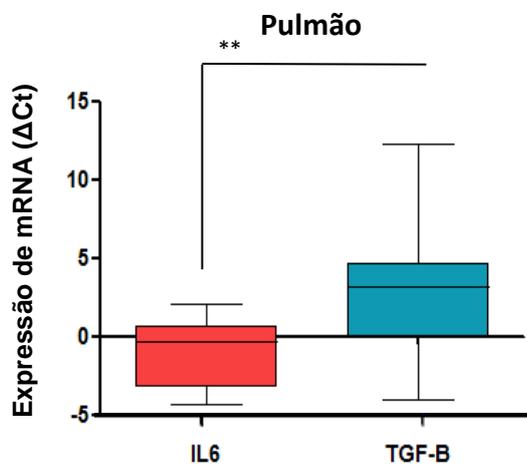
**Figura 18** - Expressão de mRNA dos genes codificadores para as citocinas TGF-β e IL-6 em pulmão de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.

Os níveis de mRNA para TGF-β e IL-6 em amostras de cérebro foi verificado que os níveis de expressão de mRNA para TGF-β foi significativamente maior quando comparado a expressão de IL-6 ( $p < 0.0005$ ), como mostra a Figura 19.



**Figura 19** - Expressão de genes codificadores para as citocinas TGF-β e IL-6 em cérebro de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.

Em concordância, nas amostras de pulmão, a expressão de mRNA de TGF- $\beta$  foi significativamente maior quando comparado a expressão de IL-6 ( $p < 0.005$ ), como mostra a Figura 20.



**Figura 20** - Expressão de genes codificadores para as citocinas TGF- $\beta$  e IL-6 em pulmão de pacientes que foram a óbito com a coinfeção Aids/toxoplasmose disseminada.

## 5. DISCUSSÃO

A normalização correta dos dados quantitativos de expressão gênica é um ponto crucial para alcançar resultados confiáveis e biologicamente significativos (Huggett et al., 2005) e se torna um método importante para corrigir diferenças de amostras para amostras, principalmente o objetivo e a análise da expressão genica de citocinas. Assim, a qualidade dos dados quantitativos de expressão gênica é boa se o normalizador também for bom (Pfaffl, 2001). As alterações no normalizador levam a uma errônea interpretação dos dados, pois podem sugerir falsas alterações nos níveis de expressão de genes de interesse ou podem ofuscar diferenças reais (Bustin, 2000).

Para as amostras de PBMC o gene de referência TBP foi considerado o mais estável entre todos os genes analisados. O gene TBP codifica a proteína TATA box, que garante a função celular básica sendo importante para o início da transcrição pela RNA polimerase II (Choukrallah et al., 2012). O TBP foi previamente utilizado como gene de referência em vários estudos (Schmidt et al., 2006; Koppelkamm et al., 2010; Braun et al., 2011; Tsaur et al., 2013; Xie et al., 2016).

Em todas as amostras de FFPE (autópsias pulmonares e cerebrais), o GAPDH se tornou o gene endógeno mais estável. Mesmo o GAPDH sendo o gene endógeno mais utilizado na RT-qPCR, surpreendentes discrepâncias podem ser encontradas nos dados publicados. O GAPDH contribui para diferentes funções celulares, como a exportação de RNA nuclear, replicação de DNA, reparo e organização do citoesqueleto, atividade de fosfotransferase e apoptose patológica, resultando em variável expressão de mRNA mesmo em subpopulações celulares de mesma origem patológica (Tatton et al., 2000; Goidin et al., 2001). Lin e Redies (2012) mencionaram o seu valor muito limitado para a normalização da expressão gênica em relação às últimas

descobertas. Em contraste, Mori et al. (2008) propuseram que o GAPDH é confiável para expressão gênica em tecidos FFPE de câncer de próstata.

As citocinas podem ser pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, sinérgicas, antagônicas, pleiotrópicas, redundantes ou interativas, dependendo do ambiente imunológico local (Lacomba et al., 2000; Ooi et al., 2006; Ang et al., 2012). A resistência à toxoplasmose ocular está associada à capacidade de produzir IL-12 e IFN- $\gamma$  contra antígenos parasitários (Vallochi et al., 2002). IFN- $\gamma$  é responsável pela regulação da carga parasitária e distribuição de *T. gondii* nos olhos. É mediador essencial da resposta imune no controle de *T. gondii* no cérebro e para manter a latência da infecção crônica (Carruthers e Suzuki, 2007; Gaddi e Yap, 2007; Goldszmid et al., 2012; Nijhawan et al., 2013).

Os resultados também mostraram uma produção semelhante de mRNA de TNF- $\alpha$  entre os pacientes com toxoplasmose ocular e pacientes com toxoplasmose crônica. Esta citocina pró-inflamatória está diretamente envolvida na regulação do crescimento de taquizoítos. Além disso, o equilíbrio entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é o mediador chave no desencadeamento de funções efetoras contra *T. gondii*, durante os estágios agudo e crônico da infecção (Denkers e Gazzinelli, 1998). Esses dados estão de acordo com outros estudos quanto à suscetibilidade dos pacientes com toxoplasmose ocular, onde a produção de TNF- $\alpha$  e a resposta inflamatória contribuíram para lesão da córnea e da retina (Crisace et al., 2010).

Neste estudo, os resultados mostraram que os pacientes com toxoplasmose ocular apresentaram níveis maiores de mRNA para IFN- $\gamma$  quando comparados com o grupo de indivíduos negativos. Um dos fatores mais importantes para a resistência dos pacientes à toxoplasmose ocular está associado à capacidade de produzir IFN- $\gamma$  contra antígenos parasitários, pois essa citocina é responsável pela distribuição de *T. gondii* nos olhos. Ao mesmo tempo, o IFN- $\gamma$  é um mediador essencial para controlar *T. gondii* no cérebro e para manter a latência da infecção crônica (Vallochi et al., 2002; Carruthers et al., 2007; Nijhawan et al., 2013). Na verdade, este trabalho mostrou que os pacientes com toxoplasmose ocular apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  menor ou

semelhante às daquelas do grupo crônicos. Esses resultados confirmam que outros estudos mostraram que a produção *in situ* de IFN- $\gamma$  aumenta em indivíduos infectados e assintomáticos em comparação com aqueles que sofrem de toxoplasmose sintomática (Meira et al., 2014; de-la-Torre et al., 2013). Os níveis desta citocina encontrados em indivíduos do grupo crônico podem ser explicados pela liberação por linfócitos T específicos contra parasitas, que são necessários para prevenir a reativação de cisto durante infecção crônica (Sarciron e Guerardi, 2000).

Apesar do papel da IL-12 na estimulação da produção de IFN- $\gamma$ , níveis de IL-12 foram observados em pacientes com toxoplasmose ocular, mas sem diferença significativa em relação ao grupo com toxoplasmose crônica ( $p > 0,05$ ). Lahmar et al. (2009), encontraram níveis de IL-12 oculares significativamente aumentados em indivíduos com toxoplasmose ocular, o que pode estar relacionado à produção local de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  observada na maioria dos pacientes estudados.

Além disso, foram relatados polimorfismos no gene que codifica IFN- $\gamma$  entre os indivíduos soropositivos para *T. gondii*, incluindo aqueles com lesões oculares (Albuquerque et al., 2009) que poderia interferir na resposta imune de pacientes infectados.

Neste estudo, observou-se um aumento significativo de IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10 em pacientes com toxoplasmose ocular. A IL-6 é considerada um mediador pró-inflamatório na toxoplasmose ocular (Hoekzema et al., 1990). A elevada concentração intra-ocular de IL-6 poderia aumentar a ação das quimiocinas e agravar a resposta inflamatória local destrutiva dentro da retina. A IL-6 poderia também antagonizar as propriedades antimicrobianas de IFN- $\gamma$  por ativação sustentada de STAT3, um potente inibidor de IL-12 e IFN- $\gamma$  (Whitmarsh et al., 2011) e, inibir a atividade de TGF- $\beta$ , uma citocina anti-inflamatória. Corroborando com os achados, níveis locais elevados de IL-6 e TGF- $\beta$  foram encontrados na toxoplasmose ocular murina. A IL-6 parece controlar a carga parasitária ocular e a atividade inflamatória, enquanto que o TGF- $\beta$  (como

regulador imunológico do sítio ocular privilegiado), em associação com IL-10 (Shoab et al., 2013), limita a atividade inflamatória (Kong et al., 2003).

De fato, a IL-10 é uma citocina imunomoduladora produzida por várias células (O'Garra et al., 2004), frequentemente concomitante com IFN- $\gamma$  ou IL-17 (Damsker et al., 2010), como um mecanismo de feedback negativo, parece ser essencial para a indução do estado permissivo observado nos olhos de pacientes sul americanos com toxoplasmose ocular (de-la-Torre et al., 2014). Estes dados, também, podem ser explicados pelo desvio para a resposta imune Th2 incluindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 que favorecem a sobrevivência do parasita. Esta estratégia é necessária para manter o equilíbrio imune no olho, impedindo a destruição imunológica do tecido (Neyer et al., 1997; Gaddi e Yap, 2007).

Os níveis mais elevados de mRNA de IL-17 foram encontrados em pacientes com toxoplasmose ocular em comparação com o grupo com toxoplasmose crônica, mas não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Estudos recentes demonstraram que IL-6 e IL-17A estavam claramente correlacionadas com a resposta patológica primária (Sauer et al., 2013). A IL-17A é a citocina de assinatura da resposta Th17, recentemente descrita, e a IL-6 é necessária para induzir a produção de IL-17A (Stumhofer et al., 2006; Guiton et al., 2010).

O papel da IL-17A nas doenças infecciosas é mais ambíguo, entre a atividade anti-patogênica e a destruição dos tecidos. Embora a IL-17 seja responsável pela destruição tecidual durante a infecção por *T. gondii*, existe uma discrepância considerável nos resultados em termos de seu efeito antiparasitário, possivelmente devido a um foco em diferentes órgãos (Kelly et al., 2005, Stumhofer et al., 2006 e Guiton et al., 2010). Sauer et al. (2012) mostraram que a proteção 'natural' durante a reinfecção de *T. gondii* também implica na diminuição da expressão de IL-17A. Por outro lado, níveis elevados de mRNA de IL-27 foram encontrados em pacientes com toxoplasmose ocular em comparação com os indivíduos negativos, apresentando diferença significativa. A IL-27 inibe diretamente o comprometimento e o desenvolvimento das células Th17 durante a encefalite auto-imune e a toxoplasmose cerebral

(Stumhofer et al., 2006 e Diveu et al., 2009). Propõe-se que o aumento dos níveis de IL-27 poderia estar na origem da mudança de resposta Th17 patogénica para uma resposta protetora do tipo Th1 (Sauer et al., 2013), mas enquanto a IL-27 foi descrita inicialmente como uma citocina do tipo Th1 induzindo fator em estudos de infecção por *T. gondii* (Villarino et al., 2006), trabalhos mais recentes mostraram efeitos pleiotrópicos na regulação do subconjunto Th (Hall et al., 2012; Wojno e Hunter, 2012).

Limitações quanto à coleta e processamento de amostras ou variação individual de cada paciente também foram observadas neste estudo. Em alguns pacientes com toxoplasmose ocular não foi possível detectar os níveis de mRNA de algumas citocinas, porém o gene endógeno foi detectado em todas as amostras. Por outro lado, alguns pacientes apresentaram uma produção exacerbada de algumas citocinas, indicando que as variações individuais de cada paciente devem ser levadas em conta. No entanto, muito cuidado deve ser tomado para afirmar que alguns pacientes não são capazes de produzir determinada citocina.

Como mencionado, a coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS envolve principalmente os pulmões (Mendelson et al., 1987, Pomeroy et al., 1992), mas também pode causar miocardite e hepatites, que, embora menos frequentes do que as formas cerebrais, estão associadas a um pior prognóstico (Martino et al., 2000). Devido à coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS apresentar diferentes formas clínicas, seu diagnóstico é muito difícil (Lucet et al., 1993).

Apesar da dificuldade de isolar RNA de amostras de FFPE, foi possível detectar os níveis de mRNA de duas citocinas nestes pacientes. Nas amostras de cérebro e pulmão, os níveis de mRNA de IL-6 foram significativamente mais baixos do que os níveis de mRNA de TGF- $\beta$ . Como mencionado, a IL-6 é capaz de antagonizar as propriedades antimicrobianas de IL-12 e IFN- $\gamma$  e inibe a atividade de TGF- $\beta$  (Whitmarsh et al., 2011). Corroborando nossos achados, encontramos poucos níveis de mRNA de IL-6 capaz de inibir a produção de TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  desencadeia efeitos anti-inflamatórios diretos e indiretos que conduzem à supressão imunitária, o que resulta no curso crônico da toxoplasmose e das suas complicações incluindo retino-coroidite e encefalite (Zare-Bidaki et al., 2016). TGF- $\beta$  desempenha um papel essencial na progressão da toxoplasmose e suas complicações, desta forma terapias futuras podem ser direcionadas para controlar os efeitos adversos da função desequilibrada de TGF- $\beta$  durante a infecção com o objetivo de suprimir a carga parasitária. Neste contexto, espera-se que os doentes que morreram com toxoplasmose disseminada/AIDS tivessem níveis elevados de expressão de mRNA para esta citocina. Além disso, parece que o TGF- $\beta$  pode ser considerado como um fator de risco chave se a sua expressão é elevada após o desafio do parasita ou por outras variações epigenéticas e genéticas. Até à data, este é o primeiro estudo que investigou a resposta imune de pacientes com coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS através do perfil de expressão de mRNA de citocinas.

Ao mesmo tempo, os resultados deste estudo podem ser atribuídos a diferença de genótipos de *T. gondii* presentes em amostras clínicas. No Brasil, há circulação de diferentes genótipos de *T. gondii*, como descrito anteriormente (Ferreira et al, 2011; Carneiro et al., 2013). Em um estudo prévio, a genotipagem das 15 amostras de necropsia cerebral, utilizadas nesse estudo, gerou seis genótipos sugestivos (Bastos da Silva et al., 2016). Isto é muito importante já que já foi descrita uma infecção ocular mais grave na América do Sul devido a cepas de *T. gondii* altamente variáveis e caracterizadas por um padrão de resposta imune local, completamente diferente e com cargas parasitárias muito maiores (Pfaffl et al., 2014; de-la-Torre et al., 2013), diferentemente dos pacientes europeus e norte-americanos, onde predominam as linhagens de Tipo II (Sibley e Ajioka, 2008).

Infelizmente, os resultados mostraram que não foi possível detectar níveis de mRNA das outras citocinas de pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS utilizados neste estudo. Portanto, a precisão da análise da expressão gênica usando qPCR pode ser influenciada pela

qualidade do RNA (Fleig e Pfaffl, 2006). Ao contrário da experimentação em animais, em que a condição de colheita de amostras pode ser controlada, a degradação do RNA neste caso é inevitável e imprevisível para os tecidos humanos recolhidos na autópsia (Koppelkamm et al., 2011). Em geral, a integridade do RNA do material de autópsia é afetada por dois fatores principais, a influência da agonia e da interferência postmortem (Tomita et al., 2004). Influência da acidose cerebral na transcrição gênica e na estabilidade do mRNA na morte prolongada tem sido relatada (Tomita et al., 2004; Koppelkamm et al., 2010). Nesses casos, uma avaliação cuidadosa dos dados qPCR é necessária para a interpretação de alterações específicas em expressões de genes alvo. Finalmente, a suscetibilidade individual foi previamente relacionada com polimorfismos em vários genes que codificam os agentes da resposta imune, tais como IFN- $\gamma$ , IL-10 ou TNF- $\alpha$  (Albuquerque et al., 2009; Cordeiro et al., 2008). Estes pacientes geneticamente susceptíveis possivelmente são menos capazes de lidar com uma cepa mais virulenta.

Esse estudo foi retrospectivo, com dados clínico-laboratoriais conhecidos. A hipótese era que estes pacientes com a coinfeção toxoplasmose disseminada/AIDS talvez não fossem capazes de ter uma expressão gênica de citocinas adequada o que poderia ter levado a forma grave da doença e, conseqüentemente, a morte. Além de estudar a toxoplasmose disseminada através de autópsias de pacientes, este estudo apresentou outras vantagens. Diariamente são retiradas amostras de tecido do corpo humano para análise visando o diagnóstico de doenças. Os fragmentos desses materiais são fixados em formol, incluídos em parafina e estocados nos serviços de patologia. Esses espécimes representam importantes fontes de material biológico para a pesquisa de estudos retrospectivos empregando diferentes técnicas. Nos últimos anos, as metodologias moleculares tornaram-se possíveis, principalmente depois dos kits de extração de DNA e RNA a partir de tecido parafinado. Trouxeram grande contribuição para obtenção de dados epidemiológicos para diversas doenças. Assim, com este tipo de abordagem, espécimes biológicos de quarenta anos puderam ser analisados por técnicas moleculares (Scorsato et al., 2011). Os blocos de parafina guardam grandes

informações e podem ser eficazes na quantidade, qualidade de moléculas de RNA. Tais estudos possibilitam a elucidação de diagnósticos retrospectivos como o proposto.

Concluindo, na toxoplasmose ocular, a maioria dos estudos disponíveis avaliam citocinas localmente, diretamente de amostras de humor aquoso. O diferencial deste estudo foi analisar os níveis de citocinas em nível sistêmico utilizando amostras de sangue após estímulo com antígeno específico do parasito. Até o momento, este é o primeiro estudo que visou investigar a resposta imune de pacientes com toxoplasmose disseminada através do perfil de expressão de mRNA para citocinas. O monitoramento da resposta imune em diferentes formas clínicas de infecção pode fornecer informações valiosas que podem ajudar na compreensão dos mecanismos de controle do sistema imunológico sobre os parasitos.

## 6. CONCLUSÕES

- A extração de RNA de amostras de células mononucleares do sangue periférico e de tecidos fixados em formol e conservados em blocos de parafina foi padronizada com sucesso e com boa qualidade de resultado.
- Os resultados mostraram que o melhor gene endógeno a ser utilizado para ensaios de expressão gênica em PBMC é o TBP e em tecidos parafinados é o GAPDH.
- Foi possível avaliar a expressão dos genes codificadores das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nas amostras de células mononucleares do sangue periférico, sugerindo uma relação dos níveis de expressão do mRNA das citocinas de interesse com a apresentação clínica. Nas amostras de tecidos fixados em formol e conservados em blocos de parafina foi possível avaliar a expressão de apenas duas citocinas, a IL6 e TGF- $\beta$ , onde os níveis de mRNA de IL-6 foram significativamente mais baixos do que os níveis de mRNA de TGF- $\beta$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK LA, Pillai S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011a. p. 1-14 p.

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med. 2001; 2001:1-19.

Al-Kassab AK, Habte-Gabr E, Mueller WF, Azher Q. Fulminant disseminated toxoplasmosis in an HIV patient. Scan J Inf Dis. 1995; 27: 183-185.

Albrecht H, Skörde J, Arasteh K, Heise W, Stellbrink HJ. Disseminated toxoplasmosis in AIDS patients--report of 16 cases. Scand J Infect Dis. 1995; 27:71-74.

Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, Leandro AC, das Neves LB, Vicente RT, et al. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104: 451-455.

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 2005; 1: 17.

Amato N V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4. ed. São Paulo: Sarvier; 1995. p.154

Amendoeira MRR, Da Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Revista Souza Marques 1999; 1: 15-35.

Ang M, Cheung G, Vania M, Chen J, Yang H, Li J, et al. Aqueous cytokine and chemokine analysis in uveitis associated with tuberculosis. Mol Vis. 2012; 18: 565-573.

Araújo FAP, Souza WJS, Silva NRS, Rodrigues RJD. Inquérito epidemiológico sobre a toxoplasmose em granjas de suínos na região da grande Erechim, RS, Brasil. Arq Fac Vet UFRGS. 2000; 28: 61-69.

Arnold SJ, Kinney MC, McCormick MS, Dummer S, Scott MA. Disseminated toxoplasmosis. Unusual presentations in the immunocompromised host. Arch Pathol Lab Med. 1997; 121: 869-873.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003; 9: 55-62.

Barbosa CJDG, Molina RJ, Souza MB, Silva ACA, Micheletti AR, Reis MA. Disseminated toxoplasmosis presenting as sepsis in two AIDS patients. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2007, 49: 113-116.

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: 205-215.

Bastos da Silva I, Batista TP, Martines RB, Kanamura CT, Ferreira IM, Vidal JE, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Exp Parasitol.* 2016; 165: 16-21.

Beaman MH, Luft BJ, Remington JS. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 163-4.

Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1294-1300.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69: 463-485.

Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS.* 2009; 117: 458-476.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol.* 2000; 165: 4515- 4521.

Bossi P, Paris L, Caumes E, Katlama C, Danis M, Bricaire F. Severe Acute Disseminated Toxoplasmosis Acquired by an Immunocompetent Patient in French Guiana. *Scand J Infect Dis*, 2000. 311-313.

Botterel F, Ichai O, Feray C, Bouree P, Saliba S, Raspa RT, Samuel D, Romand S. Disseminated Toxoplasmosis, resulting from Infection of Allograft after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2002. 1648-1650.

Braun M, Menon R, Nikolov P, Kirsten R, Petersen K, Schilling D, et al. The HOPE fixation technique--a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches. *BMC Cancer*. 2011. 511.

Busemann C, Ribback S, Zimmermann K, Sailer V, Kiefer T, Schmidt CA, et al. Toxoplasmosis after allogeneic stem cell transplantation--a single center experience. *Ann Hematol*. 2012; 91:1081-1089.

Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol*. 2000; 25, 169-193.

Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Mennechet FJ, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, et al. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 2001; 120: 914-924.

Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cell Microbiol. 2006; 8:535-544.

Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M. Manifestações neurológicas de toxoplasmose em AIDS. DST – J Bras Doenças Sex Transmis. 2003;15, 46-50.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnósticolaboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001: 65-174.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop 2002; 81: 111-122.

Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizophr Bull. 2007; 33: 745-751.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential proteins secretion from three distinct organelle of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. Eur J Cell Biol 1997; 73: 114-123.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. Jama. 1993; 10: 729-730.

Choukrallah MA, Kobi D, Martianov I, Pijnappel WW, Mischerikow N. Interconversion between active and inactive TATA-binding protein transcription complexes in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:1446-1459.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. 2005. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol*, 43: 5044-5047.

Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. *Bol Chil Parasitol* 2000; 55: 1-10.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000; 32:142-147.

Coombes JL, Charsar BA, Han SJ, Halkias J, Chan SW, Koshy AA, et al. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 1913-1922.

Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Oréface F, et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:1979-1982.

Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfica F, et al. TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol*. 2008; 92:986-988.

Copeland R, Phillpotts BA. Ocular manifestations of HIV. *eMedicine* 2006; 1-46.

Coutinho SG VT. Toxoplasmose. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 815-29 p.

de Amorim Garcia CA, Oréfica F, De Oliveira Lira C, Bezerra Gomes A, França M, Amorim Garcia Filho CA. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Ophthalmic Epidemiology*. 2004; 11: 301-317.

Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1183: 211-221.

de-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine*. 2014; 68: 23-31.

de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- $\gamma$ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e 2541.

de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 326-329.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 569-88.

Desroche N, Beltramo C, Guzzo J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Methods.* 2005; 60: 325-333.

Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 2009; 182: 5748-5756.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 1019-1024.

Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004; 126: 57-72.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55: 467-475.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972; 19: 155-177.

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: 1375-1424.

Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. *Parasitol Today.* 1993; 9: 452-458.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med.* 1970;132: 636-662.

Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 2008; 8:131.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 159-162.

Ferreira AIC DeMattos CC, Frederico FB, Meira CS, AlmeidaGCJr, Nakashima, F, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 2014; 142, 142–148.

Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006; 28: 1601-1613.

Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol 1997; 35, 2639-2641.

Frenkel JK, Hassenem KM, Hassenem RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama city, Panama: a five year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds and soil. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53, 458-468.

Frenkel JK. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. Bull N Y Acad Med. 1974;50:182-191.

Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. Immunol Cell Biol. 2007;85:155-159.

Gadea I, Cuenca M, Benito N, Pereda J, Soriano F. Bronchoalveolar Lavage for the diagnosis of disseminated toxoplasmosis in Aids patients. Diagn Microbiol. Infect Dis. 1995; 22, 339-341.

Gattás VL, Nunes EM, Soares ALB, Pires MA, Pinto PLS, Andrade Jr, HF. Acute toxoplasmosis outbreak at Campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. In, International Conference on Emerging Infectious Diseases. 2000; Atlanta, Georgia, USA, p.135.

Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104, 211-220.

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2: 277.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol.* 1992; 114:136-44.

Gregg B, Taylor BC, John B, Tait-Wojno ED, Girgis NM, Miller N, et al. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. *Infect Immun.* 2013; 81: 1635-1643.

Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem.* 2001; 295: 17-21.

Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, et al. NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity.* 2012; 36: 1047-1059.

Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, Van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, et al. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. J Infect Dis. 2010; 202: 427-435.

Gubbels MJ, Vaishnava S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. J Cell Sci. 2006;119: 2236-2245.

Hall AO, Beiting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, et al. The cytokines interleukin 27 and interferon- $\gamma$  promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. Immunity. 2012; 37: 511-523.

Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect Dis 1989; 159: 736-740.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005;6:41-61.

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a Parasite in Food: Analysis and Control. Microbiol Spectr. 2016;4.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002;8: 634-640.

Hoekzema R, Murray PI, Kijlstra A. Cytokines and intraocular inflammation. *Curr Eye Res.* 1990;9 Suppl:207-211.

Holland, G. N. et al. Analysis of recurrence patterns associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145: 1007-1013.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005; 6, 279–284.

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-cells independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J of Immunol* 1995; 25: 994-1000.

Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJP, Bluethmann H, Alexander J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 1998; 20: 231-239.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol.* 1998; 36, 2900-2906.

Junior AJG. *Toxoplasma gondii* vs radiação ionizante: Imunidade humoral e celular em baço e intestino de camundongos isogênicos irradiados com Cobalto 60. Tese (Doutorado) - São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 2005; 73: 617-621.

Kheirelseid EAH, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalization of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 12.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes Infect*. 2008; 10: 978-84.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989;170: 827-45.

Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis*. 2003;187:1484-1495.

Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med*. 2010;124: 371-380.

Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med.* 2011;125: 573-580.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 2005; 118: 212-216.

L R. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Lacomba MS, Martin CM, Chamond RR, Galera JM, Omar M, Estevez EC. Aqueous and serum interferon gamma, interleukin (IL) 2, IL-4, and IL-10 in patients with uveitis. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:768-772.

Lahmar I, Abou-Bacar A, Abdelrahman T, Guinard M, Babba H, Ben Yahia S, et al. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1239-1249.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27: 37-58.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. *Textbook of AIDS medicine*, 2 ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1999. 225-259.

Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol.* 2012; 222: 369-376.

Liu D, Ling Q, Venkateshan VS, Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. A clinicopathological study of eighteen autopsy cases with acquired toxoplasmosis. 1995; 13: 64-67.

Lucet JC, Bailly MP, Bedos JP, Wolff M, Gachot B, Vachon F. Septic shock due to toxoplasmosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Chest.* 1993; 104: 1054-1058.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 211-22.

Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 2002;18:198-201.

Madabusi LV, Latham GJ, Andrus BF. RNA extraction for arrays. *Methods in Enzymology*, New York, 2006; 411: 1-14.

Maloukh L; Matousek J; Bockstaele EV, Roldán-Ruiz I. Housekeeping gene selection for real time PCR normalization in female HOP (*Humulus lupulus* L) tissues. *J Plant Biochem Biotechnol* 2009; 18: 53-58.

Maroufi A, Bockstaele EV, Loose M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 15.

Martino R, Maertens J, Bretagne S, Rovira M, Deconinck E, Ullmann AJ, et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1188-1195.

Mastroianni A, Coronado O, Scarani P, Manfredi R, Chiodo F. Anergic disseminated toxoplasmosis in a patient with AIDS. Case report. *Minerva Med* 1997; 88: 101-104.

Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr G C, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70, 362–366.

Medeiros BC, Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bieghi-Torres LF. Disseminated toxoplasmosis after bones marrow transplantation: report of 9 cases. *Transplant Infectious Disease.* 2001; 3: 24-28.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*, 2008; 57: 845-850.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, de Mattos CC, Motoie G, Costa-Silva TA, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front Microbiol* 2014; 5: 492.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Motoie G, Costa-Silva TA, Gava R, et al. Evolution of cytokine profile during the treatment of cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *J Immunol Methods* 2015; 426: 14-8.

Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, Carnietto de Hipólito DD, Wang HL, Motoie G, et al. Selection of reference genes in five types of human tissues for normalization of gene expression studies in infectious diseases. *Gene Reports*. 2017; 7: 98-105

Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 691-698.

Mendelson MH, Finkel LJ, Meyers BR, Lieberman JP, Hirschman SZ. Pulmonary toxoplasmosis in AIDS. *Scand J Infect Dis*. 1987;19: 703-706.

Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2002;168: 2988-2996.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363: 1965-1976.

Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate*. 2008; 68, 1555-1560.

Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol*. 1999; 66: 698-704.

Munoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D. *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 1591-1593.

Nai A, Rubio A, Campanella A, et al. Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood* 2016; 127: 2327-2336.

Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte J, Becker D, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int J Epidemiol*. 2000; 29: 941-947.

Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. Role of interleukin-10 in regulation of T cell dependent and T cell independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1997; 65: 1675-1682.

Nieto PA, Covarrubias PC, Jedlicki E, Holmes DS, Quatrini R. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial

transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Molecular Biology*. 2009; 10: 63.

Nijhawan R, Bansal R, Gupta N, Beke N, Kulkarni P, Gupta A. Intraocular cysts of *Toxoplasma gondii* in patients with necrotizing retinitis following periocular/intraocular triamcinolone injection. *Ocul Immunol Inflamm*. 2013; 21: 396-399.

Nogueira OAE. Toxoplasmose: Um problema de saúde Pública. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*. 2004; 114: 1372-1378.

Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and chemokines in uveitis: is there a correlation with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006; 4: 294-309.

Pfaffl, AW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29: 45.

Pfaffl AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, et al. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2014; 44: 99-107.

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; 39:1385-1394.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009; 4:1363-1379.

Petersen E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5: 285-293.

Pomeroy C, Filice GA. Pulmonary toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 863-870.

Previato M, Frederico FB, Murata FH, et al. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. *BMC Res Notes.* 2015; 8: 746.

Rabaud C, May T, Amiel C, Katlama C, Leport C. 1994. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey. *Medicine (Baltimore).* 73: 306-314.

Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* 1997;186:1819-1829.

Remington JS, Klein JO. Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4 ed. W B Saunders Company. 1995, 140-268.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 941-945.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.p.321-334.

Roberts CD, Ferguson DJP, Jebbari J, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun 1996; 64: 897-904.

Robert-Gangneux F, Dupretz P, Yvenou C, Quinio D, Poulain P, Guiguen C, Gangneux JP. 2010. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis J, 29:33–38.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite *Toxoplasma*. Science 1948; 108: 660-663.

Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 9-44.

Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol.* 2000; 52: 534-543.

Sauer A, Rochet E, Lahmar I, Brunet J, Sabou M, Bourcier T, et al. The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 721-728.

Sauer A, Pfaff AW, Villard O, Creuzot-Garcher C, Dalle F, Chiquet C, et al. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis.* 2012; 206: 1319-1329.

Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, et al. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2013; 208: 1520-1528.

Sibley LD, Ajioka JW. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62: 329-351.

Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcu K, Hatanpaa KJ, et al. Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res.* 2006; 1123: 1-11.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing

T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006; 7: 937-945.

Schmidt. Clinical features and outcomes in patients with disseminated toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*; 2013, 57: 1535-1541.

Scott P, Hunter CA. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 466-470.

Silva MC. Toxoplasmose com ênfase no diagnóstico. *Rev Saúde Pub Zoon.*2008: 9, 154-259.

Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimarães LA, Silva FR, Carneiro VTC.. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual Grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 2009 9: 84.

Talabani H, Mergey T, Yera H, Delair E, Brézin AP, Langsley G, et al. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite.* 2010; 17: 177-182.

Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Elstner M, Leesch W, Jagodzinski FB, Stupak DP, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J Neural Transm Suppl.* 2000, 77-100.

Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000; 30:1217-1258.

Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J, et al. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. Biol Psychiatry. 2004; 346-52.

Tsaur I, Renninger M, Hennenlotter J, Oppermann E, Munz M, Kuehs U, et al. Reliable housekeeping gene combination for quantitative PCR of lymph nodes in patients with prostate cancer. Anticancer Res. 2013; 5243-5248.

Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort R, et al. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. Scand J Immunol. 2002; 55: 324-328.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 18: 3.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J Clin Microbiol 2004; 42: 4765- 4768.

Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. J Immunol 2006;176: 237-247.

Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3537-3541.

Wallace GR, Stanford MR. Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Clin Exp Immunol*. 2008; 153: 309-315.

Walker, C. G. et al. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 100.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 2000; 5: 391-405.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 895-901.

Whitmarsh RJ, Gray CM, Gregg B, Christian DA, May MJ, Murray PJ, et al. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 224-236.

Wojno ED, Hunter CA. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends Immunol*. 2012; 33: 91-97.

Xie J, Liu X, Li Y, Liu Y, Su G. Validation of RT-qPCR reference genes and determination of Robo4 expression levels in human retinal endothelial cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene*. 2016; 585, 135-142.

Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, et al. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis*. 2000; 181: 2018-2022.

Zare-Bidaki M, Assar S, Hakimi H, Abdollahi SH, Nosratabadi R, Kennedy D, et al. TGF- $\beta$  in Toxoplasmosis: Friend or foe? *Cytokine*. 2016; 86: 29-35.

## Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressão gênica de citocinas em pacientes com toxoplasmose sintomática

**Pesquisador:** Vera Lucia Pereira Chioccola

**Área Temática:** Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 41959315.8.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
Instituto Adolfo Lutz

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.131.151

**Data da Relatoria:** 18/05/2015

**Apresentação do Projeto:**

Idem ao parecer consubstanciado do CEP/IAL de 24/04/2015.

**Objetivo da Pesquisa:**

Idem ao parecer consubstanciado do CEP/IAL de 24/04/2015.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Idem ao parecer consubstanciado do CEP/IAL de 24/04/2015.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nada a acrescentar.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Análise ética com base no parecer consubstanciado do CEP/IAL de 24/04/2015 e na resposta à pendência.

Documentos apresentados e de acordo, a seguir.

1. Parecer de aprovação quanto ao mérito científico do Conselho Técnico Científico (CTC) do

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César **CEP:** 01.246-902

**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859 **Fax:** (11)3065-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.131.131

Instituto Adolfo Lutz (IAL) corroborada pela diretoria geral da instituição, de 12/01/2015.

2. Termo de responsabilidade e sigilo do uso de material biológico humano armazenado no IAL e dos dados do projeto de pesquisa, assinado pela pesquisadora responsável, de 27/04/2015.

3. Declaração de responsabilidade pela guarda do material biológico emblocado em parafina e armazenado no Núcleo de Anatomia Patológica do Centro de Patologia do IAL para fins de pesquisa, e de ciência da Portaria DG IAL 16/2010 sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL, assinada por Cristina Takami Kanamura, de 29/04/2015.

4. Declaração de responsabilidade pela guarda do material biológico emblocado em parafina e armazenado no Núcleo de Anatomia Patológica do Centro de Patologia do IAL para fins de pesquisa, e de ciência da Portaria DG IAL 16/2010 sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL, assinada por Rosecelis Brasil Martines, de 02/06/2015.

**Recomendações:**

Em próxima edição do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, alterar a área temática por não se tratar de Genética Humana no estrito senso do tema.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora responsável atendeu satisfatoriamente à pendência e complementou o protocolo com os documentos necessários.

O protocolo de pesquisa está aprovado do ponto de vista ético e em conformidade com as diretrizes institucionais.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 18 de junho de 2015.

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.240-902

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)3088-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.131.151

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

**IX - Do pesquisador responsável**

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 30 de Junho de 2015

---

**Assinado por:**  
**Luz Marina Trujillo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3ª andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3088-2850

**Fax:** (11)3085-3303

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br



Contents lists available at ScienceDirect

Gene Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/genrep](http://www.elsevier.com/locate/genrep)

## Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues



Cristina Silva Meira-Strejevitch <sup>a</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola <sup>a,\*</sup>, Marta Marques Maia <sup>a</sup>, Daise Damaris Carnietto de Hippolito <sup>a</sup>, Hui-Tzu Lin Wang <sup>b</sup>, Gabriela Motoie <sup>a</sup>, Aparecida Helena de Souza Gomes <sup>c</sup>, Cristina Takami Kanamura <sup>d</sup>, Roosecelis Brasil Martines <sup>d</sup>, Cinara Cássia Brandão de Mattos <sup>e</sup>, Fábio Batista Frederico <sup>f</sup>, Luiz Carlos de Mattos <sup>e</sup>, FAMERP Toxoplasma Research Group:

Cinara Cássia Brandão de Mattos <sup>1</sup>, Fábio Batista Frederico <sup>2</sup>, Rubens Camargo Siqueira <sup>1</sup>, Mariana Previato <sup>1,3</sup>, Amanda Pires Barbosa <sup>2,4</sup>, Fernando Henrique Antunes Murata <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>2</sup> Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Oftalmologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>a</sup> Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Regional de Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>f</sup> Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, São José do Rio Preto, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 November 2016

Received in revised form 20 February 2017

Accepted 7 March 2017

Available online 09 March 2017

#### Keywords:

Endogenous reference genes

Gene expression

Real-time PCR

PBMC

Formalin-fixed paraffin-embedded

### ABSTRACT

Gene expression analyses based on messenger RNA (mRNA) expression require accurate data normalization. When using endogenous reference genes, these should be carefully validated. Validated reference genes vary greatly depending on tissue, cell subsets and experimental context. This study was aimed to identify reference genes that have more stable mRNA levels among individuals in peripheral blood mononuclear cells (PBMC); fresh skin biopsies; lung and brain autopsies as well as, skin biopsies formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE). Therefore, 6 endogenous reference genes were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction: 18S rRNA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TATA box-binding protein (TBP), beta-2-microbolin (B2M), ubiquitin C (UBC) and mitochondrially encoded ATP synthase 6 (MT-ATP6). Furthermore, validation of their stabilities and performance as reference genes was determined by geNorm and NormFinder programs. The results show that the most stable genes for PBMC and fresh skin biopsies were TBP and UBC; in FFPE lung autopsies and skin biopsies were GAPDH and B2M; and in FFPE brain autopsies were GAPDH and UBC. In addition, 18S rRNA was the least stable of all genes analyzed. These data concluded that even genes constitutively expressed have transcript level variations in different tissues as well as storage and experimental conditions. These observations suggest that suitable reference genes should be selected for normalization of gene expression data analysis.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** 18S rRNA, eukaryotic 18S rRNA; ACL, American cutaneous leishmaniasis; B2M, beta-2-microbolin; cDNA, complementary DNA; CYCA, cyclophilin A; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HIV, human immunodeficiency virus; IPO8, importin 8; M, stability of expression value; MIQE, guidelines of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR; mRNA, messenger RNA; MT-ATP6, mitochondrially encoded ATP synthase 6; N, normalization factor; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate buffer solution; PHA, phytohemagglutinin; POLR2A, RNA polymerase II; qPCR, quantitative Real-time PCR; RI, RNA integrity number; RPLPO, ribosomal protein; RT, reverse-transcriptase; RT-qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; SDHA, succinate dehydrogenase complex, subunit A; TBP, TATA box-binding protein; TFIID, basal transcription complex; TLA, *Toxoplasma gondii* lysate antigen; UBC, ubiquitin C; V, pairwise variation.

\* Corresponding author at: Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 351, 8 andar, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil

E-mail addresses: [cristinadasilvameira@gmail.com](mailto:cristinadasilvameira@gmail.com) (C.S. Meira-Strejevitch), [pchioccola@gmail.com](mailto:pchioccola@gmail.com) (V.L. Pereira-Chioccola), [martinhamarquesmaia@hotmail.com](mailto:martinhamarquesmaia@hotmail.com) (M.M. Maia), [daise.carnietto@hotmail.com](mailto:daise.carnietto@hotmail.com) (D.D. de Hippolito), [pesquisalin@yahoo.com.br](mailto:pesquisalin@yahoo.com.br) (H.-T.L. Wang), [gabrielamotioie@gmail.com](mailto:gabrielamotioie@gmail.com) (G. Motoie), [cidahelena@ial.sp.gov.br](mailto:cidahelena@ial.sp.gov.br) (A.H.S. Gomes), [cristkanamura@yahoo.com.br](mailto:cristkanamura@yahoo.com.br) (C.T. Kanamura), [xgn7@cdc.gov](mailto:xgn7@cdc.gov) (R.B. Martines), [mattosci@gmail.com](mailto:mattosci@gmail.com) (C.C.B. de Mattos), [drfabiofrederico@gmail.com](mailto:drfabiofrederico@gmail.com) (F.B. Frederico), [luc.carlos@famerp.br](mailto:luc.carlos@famerp.br) (L.C. de Mattos).

## 1. Introduction

Gene-expression analysis is increasingly important in many fields of biological research. Understanding the patterns of expressed genes is expected to provide insight into complex regulatory networks and will most probably lead to identifying genes relevant to new biological processes or implicated in disease (Vandesompele et al., 2002). Reverse transcription in combination with quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) has become the method of choice for quantifying mRNA expression in biological tissues because of its high sensitivity, accuracy, and relatively low cost (Stassen et al., 2015). During such a complex multi-step procedure, experimental errors between samples (e.g., differences in initial sample RNA amounts, efficiency of RNA isolation, RNA integrity and efficiency of reverse transcription) can easily occur (Huggett et al., 2005; Bustin and Penning, 2012). To minimize the estimation errors, data normalization is indispensable. The most popular normalization strategy involves the use of stably expressed endogenous genes as reference to estimate interest gene expression based on the assumption of the expression level of endogenous reference genes does not change from sample to sample (Stassen et al., 2015).

The ideal internal standard should be expressed at a constant level among different tissue types, disease states, cell cycle states and at all stages of development, and should be unaffected by any experimental treatment. However, many studies use these constitutively expressed genes as control without proper validation of their presumed stability of expression. However, studies show that reference gene expression, although occasionally constant in a given cell type or experimental condition, can vary considerably (Bustin, 2000; Suzuki et al., 2000; Warrington et al., 2000; Dheda et al., 2004; Bustin and Penning, 2012; Dundas and Ling, 2012; Van Rijn et al., 2014). Dheda et al. (2004) and Ohl et al. (2005) demonstrated that the outcome of expression analysis is highly dependent on the reference genes, which in some cases may result in haziness and erroneous conclusions in expression studies.

The parasitic diseases cause significant morbidity and mortality, infecting hundreds of millions of people globally, particularly in developing countries (WHO, World Health Organization, 2017). One of them is visceral leishmaniasis, which worldwide prevalence is estimated at 400,000 to 600,000 new cases per year, and over 20,000 deaths annually. This infection can be found in the Americas, Africa, Southern Europe, and Asia, although most cases occur in India, Bangladesh, Sudan, Brazil, and Nepal. Unfortunately, control strategies against the disease toward vectors as well as reservoirs of leishmaniasis have been ineffective (Stuart et al., 2008; WHO, World Health Organization, 2017). Another is toxoplasmosis, which is prevalent in about one-third of the world's human population. It is widely distributed and can be found within many different species of mammals and birds. If infection is not controlled by the host immune system, tachyzoites are highly virulent and cause a generalized toxoplasmosis which is normally fatal (Dubey, 1998; Montoya and Liesenfeld, 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Such as toxoplasmosis and leishmaniasis, the other parasitic diseases cause intense cellular and humoral response producing host inflammatory response. In addition, studies of gene expression using infectious parasitic diseases are poorly known with no report about the expression of reference genes in these pathological conditions. Thus, investigations using samples from patients infected with parasitic diseases with high importance in public health in the world can contribute for different studies. Additionally, investigations in immunopathogenesis of toxoplasmosis, leishmaniasis and other infectious parasitic diseases often involve studies of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) subsets and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. However, until now no study has examined the stability of reference genes in these types of samples. In FFPE tissues, factors such as formal fixation time, the paraffin-embedded procedure and others may contribute to variations in gene expression levels by RNA degradation (Macabeo-Ong et al., 2002; Aggerholm-Pedersen et al., 2014; Nam et al., 2014). It is also

well known that mRNA from FFPE tissues can be poorly preserved and highly degraded (Søes et al., 2013). On the other hand, other studies have shown that using RNA from FFPE tissue samples is feasible (Macabeo-Ong et al., 2002; Von Ahlfen et al., 2007; Walter et al., 2013).

The precise guidelines of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments (MIQE) describes such a normalization strategy (Bustin et al., 2009; Bustin et al., 2010). According the MIQE and the Universal Normalizing Gene is not possible analyze a single target gene in studies. Thus, this study was aimed to evaluate six frequently used gene reference for normalization. The analyses were made in five different human tissues. These tissues are normally analyzed in infection disease studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethical considerations

The Ethics Committees of all involved Institutions approved the entire study, which was performed according to recommendations of these Committees (CONEP-IAL number: 1034567). All patients provided written informed consent the institutional review boards of Ethics Committee.

### 2.2. Patients and clinical samples

A total of 52 samples were grouped into five groups. Group I, comprises 10 PBMC samples from patients stricken by ocular toxoplasmosis. All patients were admitted and treated at the Ophthalmology Outpatients Clinics from Fundação Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. They were clinically diagnosed as having toxoplasmic retinochoroiditis scars by fundoscopic examination (Mattos et al., 2011; Ferreira et al., 2014; Previato et al., 2015). They were aged between 15 to 76 years old, with 57% being men and 43% women. Group II consisted of, 14 FFPE lung autopsies and Group III by, 11 FFPE brain autopsies. In both groups the FFPE samples were collected from autopsies of HIV-infected patients who died at the Instituto de Infectologia Emilio Ribas located in Sao Paulo, Brazil, because of severe disseminated toxoplasmosis. These FFPE tissues were sectioned in 4- $\mu$ m-thick fragments for histopathological, molecular diagnosis, and for this study. Disseminated toxoplasmosis was defined since all patients had *T. gondii* infection in, at least, two non-contiguous organs (brain and lung). Group II and Group III samples comprised 64% men and 36% women, aged between 30 to 59 years old (Bastos da Silva et al., 2016). All samples from Groups I, II, and III had positive molecular, serological and/or histopathological tests for toxoplasmosis. Group IV, included 9 fresh skin biopsy samples and Group V, 8 FFPE skin biopsy samples. In both groups the biopsies were collected from patients with cutaneous lesions living and attending public dermatology clinics of Sorocaba Region, Sao Paulo State, Brazil. A complete dermatological examination was performed before skin biopsy collection, and all patients presented cutaneous lesions suggestive of leishmaniasis. The lesions were cleaned with antiseptic, with a local anesthetic was administered. The borders of the lesion were scraped and the samples were obtained by punch and immediately added in tubes. They were clinically diagnosed as having American cutaneous leishmaniasis (ACL), as they had positive molecular, histopathological and parasitological tests for ACL (Gomes et al., 2008). Group IV samples were 33% men and 67% women, aged between 17 to 74 years old, and Group V samples from 33% men and 67% female, aged between 12 to 56 years old.

### 2.3. Endogenous reference genes

Six potential reference genes were chosen according to their common use as endogenous control genes in the literature and they described in details in Table 1. Genes that belong to different molecular

**Table 1**  
Description of the 6 endogenous reference genes analyzed in this study.

Gene symbol	Gene name	Accession number	Biological function	Assay ID <sup>a</sup>	Amplicon length	Location chromosome
18S rRNA	Eukaryotic 18S rRNA	[GenBank: X03205.1]	Ribosomal formation	Hs99999901_s1	187	Nd <sup>b</sup>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	[RefSeq: NM002046.4]	Involved in glycolysis	Hs02758991_g1	93	12
TBP	TATA box-binding protein	[RefSeq: NM003194.3]	Transcription factor	Hs00427620_m1	91	6
B2M	Beta-2-microglobulin	[RefSeq: NM004048.2]	Protein binding	Hs00984230_m1	81	15
UBC	Ubiquitin C	[RefSeq: NM021009.5]	Involved in protein degradation	Hs00824723_m1	71	12
MT-ATP6	Mitochondrially encoded ATP synthase 6	[GenBank: NC_012920.ATP6.0]	Participation in oxidative phosphorylation	Hs02596862_g1	150	10

TaqMan real-time PCR assays were chosen to span at least one exon-exon boundary and can be purchased with the given assay IDs (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

<sup>a</sup> Purchased from applied biosystems.

<sup>b</sup> Not determined.

pathways were used to minimize the risk of co-regulation (Vandesompele et al., 2002).

#### 2.4. Isolation of human PBMC and *Toxoplasma gondii* antigen

A volume of 10 mL of peripheral blood containing sodium heparin as anticoagulant was collected from Group I patients and an equal volume of phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2 was added to the blood. The PBMCs were separated over Histopaque 1077, as in a protocol described by Sigma-Aldrich. After isolation, cells were washed two times with PBS by centrifugation at 1000g for 10 min and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) containing L-glutamine, 2 g/L sodium bicarbonate, 10% heat-inactivated fetal calf serum and 50 mg/mL of streptomycin. The viability of the cells used in the experiments was always higher than 85%, as measured by trypan blue exclusion (Sigma). The cells were then plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well into 48-well culture plates in a final volume of 500  $\mu$ L (Meira et al., 2014).

*T. gondii* lysate antigen (TLA) was prepared as described before (Meira et al., 2008; Meira et al., 2011; Costa-Silva et al., 2012). PBMCs were then stimulated with 1  $\mu$ g/mL of TLA. Alternatively, as positive control for experiments, cells were stimulated with 2  $\mu$ g/mL of phytohemagglutinin (PHA). Culture medium was used in all experiments as negative control wells. PBMC cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and cells were collected after 48 h of stimulation. In these cells, 300  $\mu$ L of RNeasy Lysis Solution (Qiagen) was added to protect cellular RNA from degradation; cells were stored at –70 °C until RNA isolation.

#### 2.5. RNA isolation and cDNA synthesis

To minimize the RNA degradation by RNases during the experimental process, all materials and working surfaces were cleaned using RNaseZap® RNase Decontamination Solution (Ambion™) prior to handling the samples. RNA molecules were extracted from FFPE samples (skin biopsies as well as lung and brain autopsies) using RNeasy FFPE isolation Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. For lung and brain autopsies or skin biopsies, the extractions were made using 6–8 fragments of 5–8  $\mu$ m. Initially, fragments were dissolved in xylene (1 mL) and, centrifuged at 13,000g for 1 min. This step was carried out twice. Supernatants were removed and ethanol 96–100% (500  $\mu$ L) was added to pellets, centrifuged at 13,000g for 2 min and pellets were incubated at room temperature for complete ethanol evaporation. Next, PKD buffer (240  $\mu$ L) and proteinase K (10  $\mu$ L) were added to the samples to complete lysis and followed the manufacturer's instructions. RNA isolation of PBMC and fresh skin biopsies (3 mm each) were made using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. First, samples were centrifuged 2800g for 10 min for RNeasy Lysis Solution removal. Next, RLT buffer

(350  $\mu$ L) was added to samples and vortexed for 20 s for complete cell lysis. To remove residual genomic DNA, isolated RNA molecules were treated with Turbo DNA-free™ Kit (Ambion™) prior to cDNA synthesis. Next, 100 ng/ $\mu$ L of total RNA was reverse-transcribed (RT) using a High-Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems). RT was performed using a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions under the following thermal conditions: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C followed by 5 min at 85 °C. All cDNA samples were stored at –70 °C until PCR processing.

#### 2.6. Quality control of total RNA

Extraction yield and concentrations were assessed by Quantus™ Fluorometer (Promega). RNA integrity and levels of degradation were assessed by on-chip electrophoresis using an RNA 6000 Pico kit and Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Based on the electropherogram, an RNA Integrity Number (RIN) between 1 (completely degraded) and 10 (completely intact) was calculated, considering the 18S/28S rRNA peaks, as well as, the background and possible degradation products (Schroeder et al., 2006).

#### 2.7. Quantitative real-time PCR (qPCR)

qPCR amplification mixture contained 10  $\mu$ L of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix and 1  $\mu$ L TaqMan® Gene Expression Assays (both Applied Biosystems) for the following genes: Eukaryotic 18S rRNA (18S rRNA), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TATA box-binding protein (TBP), Beta-2-microglobulin (B2M), Ubiquitin C (UBC), Mitochondrially encoded ATP synthase 6 (MT-ATP6). Assay IDs are given in Table 1. Template cDNA (4  $\mu$ L) and 5  $\mu$ L of RNase free water were added to a total volume of 20  $\mu$ L. Reactions were prepared in triplicate for each sample and all of 6 assays. Samples were amplified and detected using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the following thermal profile: 2 min, 50 °C, and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles performed at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min.

#### 2.8. Data analysis

The gene expression levels of the six candidate reference genes were calculated and their gene expression stabilities were compared using the geNorm program (version 3.5) accessed in <http://genorm.cmgg.be>, and NormFinder program (version 0.953) accessed in <http://moma.dk/normfinder-software> in order to confirm our findings. For both programs, C<sub>T</sub> values were transformed into relative quantification data using “delta C<sub>T</sub> method”. For each gene measured, the highest C<sub>T</sub> value was subtracted from all C<sub>T</sub> values. Next, in each data point was applied the equation  $2^{(-\Delta C_T)}$  and, then, plotted in geNorm and NormFinder

program. In geNorm, the stability of expression ( $M$ ) of each studied gene based on the average pairwise variation was calculated. Stepwise elimination of the least stable gene finally identifies the two most stable genes (Vandesompele et al., 2002). Furthermore, geNorm determines the optimal number of reference genes by calculating the *normalization factor* ( $NF$ ) for a given number of reference genes ( $n$ ). Next the *pairwise variation* ( $V$ ) between the consecutive normalization factors  $NF_n$  and  $NF_{n+1}$  is defined. The lower  $V$ , the smaller the variation, implying that adding an extra gene does not significantly improve normalization. A cut-off value of 0.15 for the pairwise variation is most often chosen, indicating that the use of a set of reference genes with a pairwise variation  $<0.15$  results in valid normalization (Vandesompele et al., 2002; Ohl et al., 2005; Peters et al., 2007; Bustin et al., 2010; Bustin and Penning, 2012). NormFinder algorithm is a software, which evaluates the expression variation of each reference gene and allows taking intra- and intergroup variations into account when pointing out the most stable reference gene. The lowest stability value accounts for least variation and the most stable gene and is a direct measure for the estimated expression variation (Andersen et al., 2004).

### 3. Results

#### 3.1. RNA extraction and integrity

Total RNA molecules were successfully extracted from all 52 samples. The highest mean RNA yield was obtained from fresh skin biopsy samples (mean 122 ng/ $\mu$ L, range 53.5–261 ng/ $\mu$ L). The mean of FFPE lung autopsy samples was 78 ng/ $\mu$ L (range 33.1–115 ng/ $\mu$ L). The mean for FFPE brain autopsy samples was 48.54 ng/ $\mu$ L (range 15–109 ng/ $\mu$ L); for FFPE skin biopsy samples was 47 ng/ $\mu$ L (range 25.8–91.7 ng/ $\mu$ L); and for PBMC samples was 38 ng/ $\mu$ L (range 16–85 ng/ $\mu$ L).

Means of RIN values were 2.6 (range 2.4–3.1) for FFPE lung autopsy samples; 2.7 (range 2.5–2.9) for FFPE skin biopsy samples; 2.9 (range 2.3–5.1) for FFPE brain autopsy samples; 4.0 (range 2.8–8.6) for fresh skin biopsy samples; and 7.9 (range 7.0–9.0) for PBMC samples.

#### 3.2. Stability of endogenous control genes

The core principle of geNorm program is based on the expression ratio of two stable endogenous genes. These values should be consistent in all samples. Greater variability in expression ratios means less stable reference genes (Vandesompele et al., 2002). It provides a method to rank gene stability with a gene expression stability value ( $M$ ), which is calculated as the average pair-wise variation in expression of a specific gene relative to all other candidate genes. Lower  $M$  values indicate more stable gene expression. We ranked the 6 selected reference genes in 5 human tissues samples (PBMC, fresh skin biopsy; FFPE lung and brain autopsies; and FFPE skin biopsies) based on expression stability  $M$  (Fig. 1).

The results showed that all 6 genes exhibited  $M$  values  $< 1.5$  (as shown in Y axis in Fig. 1) in all human tissue samples. In PBMC samples (Fig. 1/Group I) and in fresh skin biopsy samples (Fig. 1/Group IV), the genes with the most stable mRNA levels were *TBP* and *UBC*, followed by *B2M*, *MT-ATP6*, *GAPDH* and *18S rRNA* (for Group I) and *GAPDH*, *B2M* and *MT-ATP6* (for Group IV). The *18S rRNA* gene was not detected in the Group IV. In FFPE lung autopsy samples (Fig. 1/Group II) and in FFPE brain autopsies (Fig. 1/Group III), the genes with the most stable mRNA levels were *GAPDH* and *UBC*, followed by *B2M* and *18S rRNA*. *GAPDH* and *B2M* genes were the most stable in FFPE skin biopsy samples (Fig. 1/Group V), followed by *UBC* and *18S rRNA*. The genes *MT-ATP6* and *TBP* were not detected in Groups II, III and V.

The complementation of geNorm findings, in analyzing the expression stability of candidate genes, was done using NormFinder software. This software calculates the expression stability values using a variance-based model on intergroup variations, in gene expression and ranks reference genes according to stability values ranging from low to high. This

evaluation indicates candidate genes ranging from most stable to least (Andersen et al., 2004). As shown in Table 2, NormFinder gave results similar to geNorm. *TBP* (for Group I and IV) and *GAPDH* (for Group III and V) were the most stable genes. However, *UBC* (for Group II) was considered the most stable gene unlike the geNorm.

#### 3.3. Determination of the minimum number of endogenous control genes

The optimal number of endogenous control genes needed for normalization was calculated by pairwise variation ( $V$ ) between two sequential normalization factors, including an added gene using geNorm. Large pairwise variation suggests that an additional gene plays a significant role in normalization and should be included in the calculation. A cut-off threshold of 0.15 (as shown in Y axis in Fig. 2) is recommended in most cases. In PBMC samples (Fig. 2/Group I),  $V2/3$  showed a  $V$  value of 0.056 and further addition of other genes had an insignificant effect. In the other tissues (Figs. 2/Groups II, III, IV and V),  $V2/3$  analysis, showed a  $V$  value of 0.036, 0.018, 0.039 and 0.023, respectively. In all these groups, the  $V$  values were lowest when more genes were added. However, the results showed that additional genes were not required in any of the groups studied for normalization, as all  $V$  values were below 0.15.

### 4. Discussion

The issue of correct normalization of quantitative gene expression data is a crucial point for achieving reliable and biologically meaningful results (Huggett et al., 2005). Data normalization is an important method to rectify sample-to-sample differences such as slight differences in sources and integrity, as well as handling and efficiency of the analysis. Thus, the quality of quantitative gene expression data is good if the normalizer is also good (Pfaffl, 2001). Changes in the normalizer will lead to erroneous data interpretation as they might falsely hint at changes in the expression levels of genes of interest or might obscure real differences (Bustin, 2000).

Some endogenous reference genes have often been evaluated to check if they are suitable to be applied as normalizers to quantify mRNA; however, the stability of these genes has been variable (Stassen et al., 2015; Koppelkamm et al., 2010; Kulkarni et al., 2011; Wang et al., 2012). Thus, this study was aimed to evaluate the most common endogenous reference genes in 5 human tissues (PBMC, fresh skin biopsy; FFPE lung and brain autopsies; and FFPE skin biopsies), vastly analyzed in infectious diseases studies. The investigation was made to select the best reference gene for accurate and reliable normalization of gene-expression data. With the help of the freely available Excel applet geNorm, genes with the most stable amount of transcript among a set of 6 candidate reference genes were identified (Table 1).

For the set of samples comprising PBMC and fresh skin biopsy (Groups I and IV), the reference gene *TBP* was considered the most stable among all genes analyzed. The *TBP* gene encodes the (TATA)-box-binding protein, which represents a crucial constituent of basal transcription complex (TFIID) required for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II (Choukrallah et al., 2012). *TBP* warrants basic cellular function as a part of the transcriptional machinery and has been previously used as a reference gene in several studies (Schmidt et al., 2006; Koppelkamm et al., 2010; Kulkarni et al., 2011; Braun et al., 2011; Tsaour et al., 2013; Xie et al., 2016). In the ocular epithelial surface, specifically in the region of the conjunctiva, *TPB* and *RPLPO* (ribosomal protein) were considered the most stable genes (Xie et al., 2016).

The stability of the *TBP* gene was also assessed in samples of cardiac and skeletal muscle tissue. *TBP* was identified as the most stable in combination with the *CYCA* (cyclophilin A) and *SDHA* (succinate dehydrogenase complex, subunit A), respectively (Koppelkamm et al., 2010). In contrast, Bas et al. (2004) comparing resting and activated T lymphocytes, showed that normalization to *18S rRNA* gave the most reliable

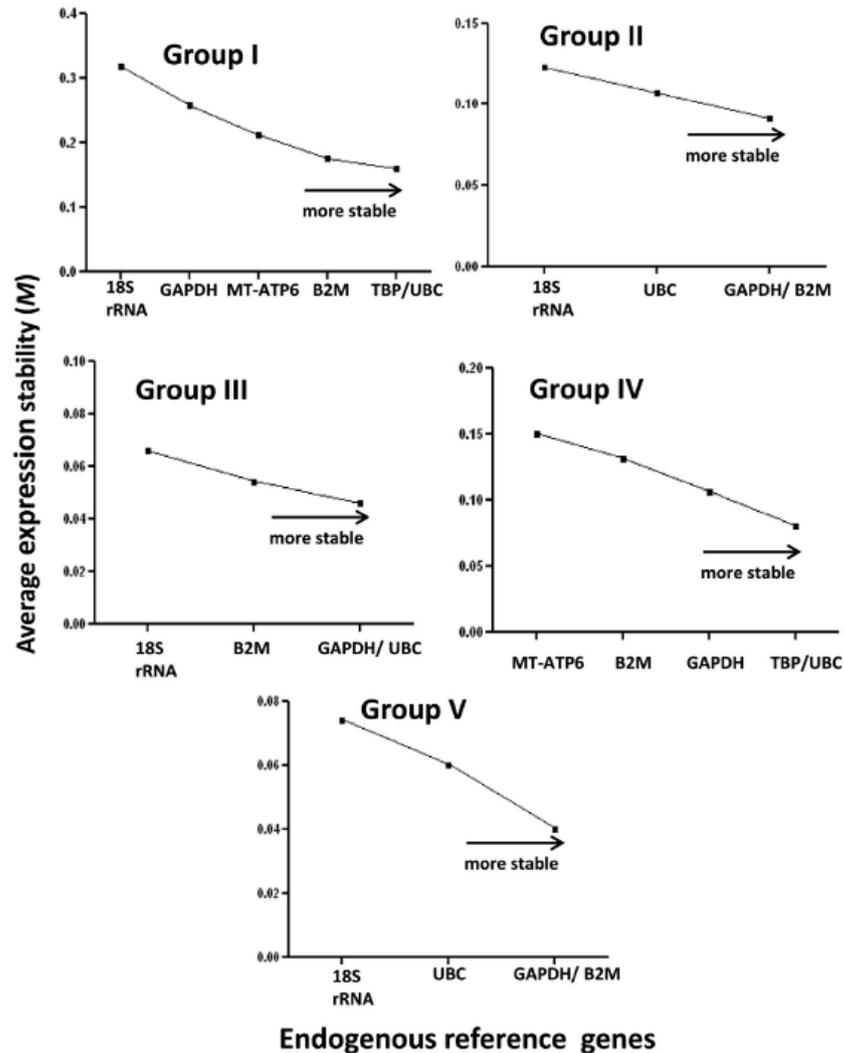


Fig. 1. Average expression stability values ( $M$ ) calculated by geNorm, as described in Material and Methods section, of the 6 candidates to endogenous reference genes for analysis in PBMC (Group I), FFPE lung autopsies (Group II), FFPE brain autopsies (Group III), fresh skin biopsies (Group IV), and FFPE skin biopsies (Group V). The genes were: Eukaryotic 18S rRNA (*18S rRNA*), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), TATA box-binding protein (*TBP*), Beta-2-microglobulin (*B2M*), Ubiquitin C (*UBC*) and Mitochondrially encoded ATP synthase 6 (*MT-ATP6*). Arrows indicate that lower  $M$  values are more stable gene expression.

results followed by  $\beta$ -actin mRNA and last *GAPDH* mRNA, suggesting that *18S rRNA* should therefore be the preferred housekeeping gene for normalization in the human lymphocyte context, but this study

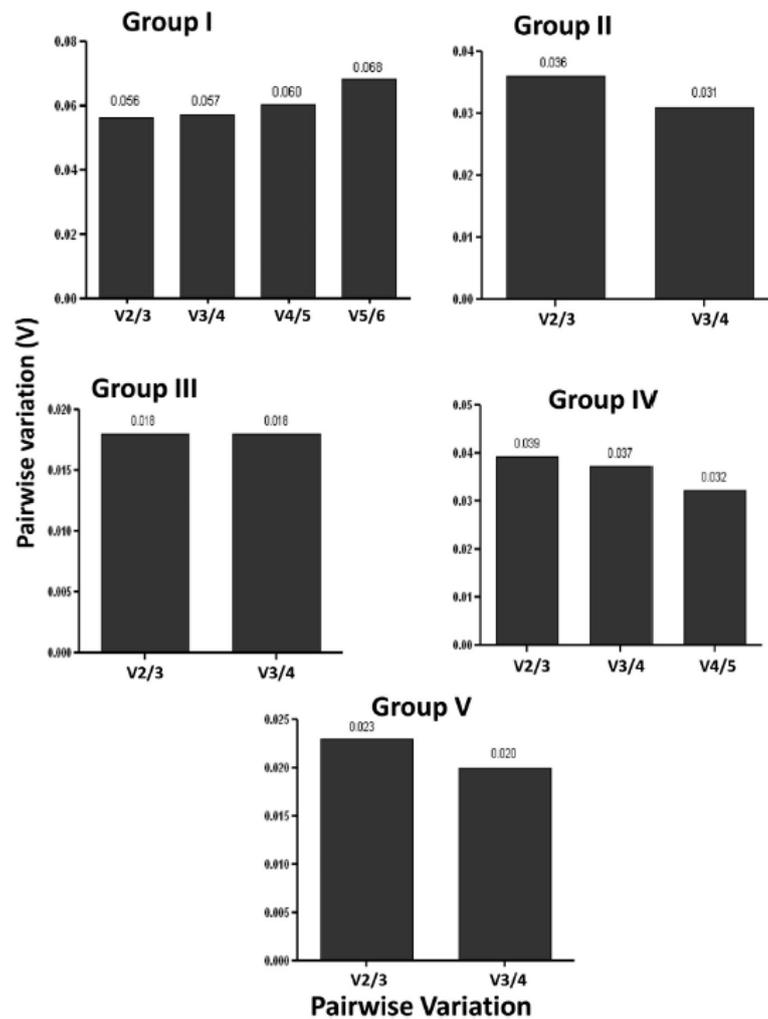
did not evaluate *TBP* and *UBC* genes. On the other hand, our results imply that the commonly used endogenous control genes, *18S rRNA* and *GAPDH*, show rather unstable transcript levels in PBMC samples,

**Table 2**  
Description of the candidate genes determined by geNorm and NormFinder.

Groups	geNorm				NormFinder			
	Most stable gene <sup>a</sup>	Stability value ( $M$ )	Least stable gene	Stability value ( $M$ )	Most stable gene <sup>b</sup>	Stability value	Least stable gene	Stability value
I	TBP	0.159	18S	0.317	TBP	0.060	18S	0.275
II	UBC	0.091	18S	0.123	UBC	0.043	18S	0.081
III	GAPDH	0.046	18S	0.066	GAPDH	0.012	18S	0.048
IV	UBC	0.080	MT-ATP	0.150	TBP	0.012	MT-ATP	0.105
V	TBP	0.040	18S	0.074	GAPDH	0.014	18S	0.054

<sup>a</sup> geNorm is based on the expression ratio of two stable endogenous genes.

<sup>b</sup> NormFinder evaluates the expression stability of each single reference gene.



**Fig. 2.** Pairwise variation ( $V$ ) analysis, to determine the optimal number of reference genes for normalization were calculated by geNorm, as described in Material and Methods section. Six candidates to endogenous reference genes were tested for analyses in PBMC samples (**Group I**), FFPE lung autopsies (**Group II**), FFPE brain autopsies (**Group III**), fresh skin biopsies (**Group IV**), and FFPE skin biopsies (**Group V**). Values below the cut-off threshold of 0.15 (as shown in Y axis) is recommended.

so that they are not recommended for normalization in gene expression studies based on similar sample composition.

However, in all FFPE tissue samples (lung and brain autopsies as well as skin biopsies - Groups II, III and V, respectively), *GAPDH* turned out to be the most stable endogenous gene. Even looking at *GAPDH*, the most frequently used housekeeping gene in RT-qPCR, astonishing discrepancies can be found in the published data. *GAPDH* contributes to different cellular functions, such as nuclear RNA export, DNA replication, DNA repair and cytoskeletal organization, phosphotransferase activity and pathological apoptosis, resulting in varying mRNA expression even in cellular subpopulations of the same pathological origin (Sirover, 1999; Tatton et al., 2000; Goidin et al., 2001; Zhu et al., 2001). Lin and Redies (2012) alluded to its very limited value for normalization of gene expression with respect to the latest findings. In contrast, Mori et al. (2008) proposed *GAPDH* to be a reliable denominator for gene expression in FFPE tissues of prostate cancer.

In fact, the transcripts of *GAPDH* showed varying stabilities between different tissues (Bas et al., 2004; Koppelkamm et al., 2010; Kulkarni et al., 2011; Tsaour et al., 2013; Xie et al., 2016). Koppelkamm et al. (2010) showed variability in stability of *GAPDH* mRNA levels in

human post mortem cardiac muscle, skeletal muscle, and brain tissue. Interestingly, this gene was the third more stable in human brain tissue but, in cardiac and skeletal muscle, it was the second most unstable. Wang et al. (2012) evaluated 32 potential reference genes in the human brain of 15 forensic autopsy cases (from blunt brain injury and sudden cardiac death) showed that the most stable genes were *IPO8* (importin 8) and *POLR2A* (RNA polymerase II), using geNorm algorithm. However, this study did not evaluate the usefulness of the *GAPDH* gene.

Recently there has been increasing recognition of the importance of accessing gene expression data in FFPE tissues. Whereas the use of fresh frozen tissue has major limitations due to the requirement for immediate collection, processing, transport, preservation, and its limited availability, FFPE tissue is routinely obtained from different patients and is the gold standard for fixation. However, since RNA in FFPE tissues can be substantially degraded as well as cross-linked (Mori et al., 2008), the suitability of reference genes should also be validated for different sample types in FFPE tissue. In general, the RNA integrity of autopsy material is affected by two major factors, the influence of agony and post-mortem interference (Tomita et al., 2004). In the present study evaluating FFPE lung autopsies, RIN, as an indicator of RNA integrity,

was found to be lower compared with other FFPE tissue samples. In addition, whole gene expressions, including reference genes, may have deteriorated in prolonged death processes (Madabusi et al., 2006; Wang et al., 2012).

To complement the geNorm findings, NormFinder software was also used and confirmed that TBP (for Group I and IV) and GAPDH (for Group III and V) were the most stable genes. However, for Group II, UBC was considered the most stable gene, differently from geNorm which showed that GAPDH was the most stable, but UBC was considered the second more stable. This strategy of comparing the results generated by two different programs may give us more reliable results. Similar data has been observed by others (Penna et al., 2011; Otsu et al., 2016; Xie et al., 2016).

Information about the minimum number of endogenous control genes necessary for data normalization could be obtained from the pairwise variation  $V$ . The cut-off value, below which additional endogenous control genes have no further impact on correct data normalization, was recommended as 0.15 (Vandesompele et al., 2002). In our set of samples, pairwise variations showed an insignificant effect of addition of the third endogenous control gene to the NF. According to MIQE guidelines, the number of reference genes screened for normalization must be more than three, unless one single reference gene has been fully validated. Furthermore, the selection should be confirmed by at least one algorithm, such as geNorm or Normfinder (Bustin et al., 2009). However, the estimation of the suitable number of control genes must be balanced between practical considerations and the pursuit of accuracy (Koppalkamm et al., 2010). In addition, it is important to state that the authors do not advocate the use of one reference gene. It has previously been demonstrated that the use of two to four reference genes improves accuracy of quantification (Vandesompele et al., 2002; Brinkhof et al., 2006; Peters et al., 2007).

Data from geNorm and Normfinder gave slight different results, due to their distinct statistical algorithms. However, both suggested the transcript stability seems to be tissue dependent, since different genes were found to be stable in all tissues investigated. For example, the TBP gene, which was considered the most stable in PBMC and fresh skin biopsy, did not have its level detected in any FFPE tissue samples studied. Consistent with our findings, the TBP gene was considered the least stable reference gene in postmortem human brains (Lee and Young, 1998; Wang et al., 2012). So, in order for RT-qPCR studies to be of clinical relevance it is of utmost importance that data are presented in a way that permits proper data comparison and experimental repetition. Furthermore, accurate normalization of data using stably expressed reference genes has been shown to vary among species, tissues, and experimental settings. Therefore, systematic reference gene stability evaluation must be an integral part of the experimental design.

#### Funding

This study was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) 2014/09496-1 to VLP-C, 2015/04803-6 to DDCH, 2013/05811-7 to RBM, 2013/10050-5 to MP, 2013/15879-8 to FHAM, 2013/25650-8 to LCM; by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) to VLP-C 301369/2015-1. The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are the responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of FAPESP.

#### Author contributions

VL Pereira-Chioccola and CS Meira-Strejevitch designed the study and experiments; performed the data analysis, interpreted the data, and wrote the manuscript. CS Meira-Strejevitch, MM Maia, DDC Hipólito and G Motoie performed the laboratorial experiments (RNA isolation and cDNA synthesis, qPCR, Isolation of PBMC and data analysis). HTL Wang and G Motoie revised critically the manuscript. AHS

Gomes performed the inclusion of patients with American cutaneous leishmaniasis, sample collection and laboratorial diagnosis. CT Kanamura and RB Martines performed the inclusion of post-mortem patients, sample collection, clinical and histopathological diagnosis for disseminated toxoplasmosis. CC Brandão de Mattos, LC Mattos, FB Frederico, RC Siqueira, M Previato, AP Barbosa and FHA Murata performed the inclusion of patients with ocular toxoplasmosis, sample collection, develop the ophthalmological clinical evaluation, interviewed the patients, and collected the epidemiological data.

All authors revised the manuscript, approved the final version submitted, published and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Acknowledgments

The authors thank Jim Hesson of AcademicEnglishSolutions.com to proofread the English.

#### References

- Aggerholm-Pedersen, N., Safwat, A., Bærentzen, S., Nordmark, M., Nielsen, O.S., Alsner, J., Sørensen, B.S., 2014. The importance of reference gene analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples from sarcoma patients - an often-underestimated problem. *Transl. Oncol.* 7, 687–693.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S., Hammarström, M.L., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59, 566–573.
- Bastos da Silva, J., Batista, T.P., Martines, R.B., Kanamura, C.T., Ferreira, L.M., Vidal, J.E., et al., 2016. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Exp. Parasitol.* 165, 16–21.
- Braun, M., Menon, R., Nikolov, P., Kirsten, R., Petersen, K., Schilling, D., et al., 2011. The HOPE fixation technique—a promising alternative to common prostate cancer biobanking approaches. *BMC Cancer* 11, 511.
- Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., Penning, L.C., 2006. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal. Biochem.* 356, 36–43.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Bustin, S., Penning, L.C., 2012. Improving the analysis of quantitative PCR data in veterinary research. *Vet. J.* 191, 279–281.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S., Olsvik, P.A., et al., 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* 21 (11), 74.
- Choukrallah, M.A., Kobi, D., Martianov, I., Pijnappel, W.W., Mischerikow, N., Ye, T., et al., 2012. Interconversion between active and inactive TATA-binding protein transcription complexes in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* 40, 1446–1459.
- Costa-Silva, T.A., Borges, M.M., Galhardo, C.S., Pereira-Chioccola, V.L., 2012. Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop.* 124, 203–209.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112–114.
- Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 7, 1019–1024.
- Dundas, J., Ling, M., 2012. Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory Biosci.* 131, 215–223.
- Ferreira, A.J., De Mattos, C.C., Frederico, F.B., Meira, C.S., Almeida Jr., G.C., Nakashima, F., et al., 2014. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 142, 142–148.
- Goidin, D., Mameissier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., Berthier-Vergnes, O., 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin

- genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.* 295, 17–21.
- Gomes, A.H., Armelin, I.M., Menon, S.Z., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 119, 319–324.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6, 279–284.
- Koppellkamm, A., Vennemann, B., Fracasso, T., Lutz-Bonengel, S., Schmidt, U., Heinrich, M., 2010. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int. J. Legal Med.* 124, 371–380.
- Kulkarni, B., Mohammed, I., Hopkinson, A., Dua, H.S., 2011. Validation of endogenous control genes for gene expression studies on human ocular surface epithelium. *PLoS One* 6, e22301.
- Lee, T.I., Young, R.A., 1998. Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev.* 12, 1398–1408.
- Lin, J., Redies, C., 2012. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev. Genes Evol.* 222, 369–376.
- Macabeo-Ong, M., Ginzinger, D.G., Dekker, N., McMillan, A., Regezi, J.A., Wong, D.T., et al., 2002. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod. Pathol.* 15, 979–987.
- Madabusi, L.V., Latham, G.J., Andruss, B.F., 2006. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol.* 411, 1–14.
- Mattos, C.C., Meira, C.S., Ferreira, A.I., Frederico, F.B., Hiramoto, R.M., Jr, G.C., et al., 2011. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 362–366.
- Meira, C.S., Costa-Silva, T.A., Vidal, J.E., Ferreira, I.M., Hiramoto, R.M., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Med. Microbiol.* 57, 845–850.
- Meira, C.S., Vidal, J.E., Costa-Silva, T.A., Frazatti-Gallina, N., Pereira-Chioccola, V.L., 2011. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 71, 279–285.
- Meira, C.S., Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., de Mattos, C.C., Motoie, G., Costa-Silva, T.A., Gava, R., et al., 2014. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front. Microbiol.* 13, 492 eCollection.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976.
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P.V., 2008. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68, 1555–1560.
- Nam, S.K., Im, J., Kwak, Y., Han, N., Nam, K.H., Seo, A.N., et al., 2014. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic acid preservation. *Korean J. Pathol.* 48, 36–42.
- Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A., et al., 2005. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J. Mol. Med.* 83, 1014–1024.
- Oturai, D.B., Søndergaard, H.B., Børnsen, L., Sellebjerg, F., Christensen, J.R., 2016. Identification of suitable reference genes for peripheral blood mononuclear cell subset studies in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 83, 72–80.
- Penna, I., Velá, S., Gignoni, A., Russo, C., Cancedda, R., Pagano, A., 2011. Selection of candidate housekeeping genes for normalization in human postmortem brain samples. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5461–5470.
- Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., Su, C., 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 4, 1363–1379.
- Peters, I.R., Peeters, D., Helps, C.R., Day, M.J., 2007. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 55–66.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Previato, M., Frederico, F.B., Murata, F.H., Siqueira, R.C., Barbosa, A.P., Silveira-Carvalho, A.P., et al., 2015. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. *BMC. Res. Notes* 8, 746.
- Schmidt, U., Fuessel, S., Koch, R., Baretton, G.B., Lohse, A., Tomasetti, S., et al., 2006. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* 66, 1521–1534.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
- Sirover, M.A., 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159–184.
- Søes, S., Sørensen, B.S., Alsner, J., Overgaard, J., Hager, H., Hansen, L.L., Kristense, L.S., 2013. Identification of accurate reference genes for RT-qPCR analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue from primary non-small cell lung cancers and brain and lymph node metastases. *Lung Cancer* 81, 180–186.
- Stassen, Q.E., Riemers, F.M., Reijmerink, H., Leegwater, P.A., Penning, L.C., 2015. Reference genes for reverse transcription quantitative PCR in canine brain tissue. *BMC. Res. Notes* 8, 761.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., et al., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1301–1310.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R., 2000. Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* 29, 332–337.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R.M., Elstner, M., Leesch, W., Jagodzinski, F.B., Stupak, D.P., et al., 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J. Neural Transm. Suppl.* 60, 77–100.
- Tomita, H., Vawter, M.P., Walsh, D.M., Evans, S.J., Choudary, P.V., Li, J., et al., 2004. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol. Psychiatry* 55, 346–352.
- Tsaur, I., Renninger, M., Hennenlotter, J., Oppermann, E., Munz, M., Kuehs, U., et al., 2013. Reliable housekeeping gene combination for quantitative PCR of lymph nodes in patients with prostate cancer. *Anticancer Res.* 33, 5243–5248.
- Van Rijn, S.J., Riemers, F.M., van den Heuvel, D., Wolfswinkel, J., Hofland, L., Meij, B.P., et al., 2014. Expression stability of reference genes for quantitative RT-PCR of healthy and diseased pituitary tissue samples varies between humans, mice, and dogs. *Mol. Neurobiol.* 49, 893–899.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 RESEARCH0034.
- Von Ahlfen, S., Missel, A., Bendrat, K., Schlumpberger, M., 2007. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One* 2, e1261.
- Walter, R.F., Mairinger, F.D., Wohlschlaeger, J., Worm, K., Ting, S., Vollbrecht, C., et al., 2013. FFPE tissue as a feasible source for gene expression analysis: a comparison of three reference genes and one tumor marker. *Pathol. Res. Pract.* 209, 784–789.
- Wang, Q., Ishikawa, T., Michiue, T., Zhu, B.L., Guan, D.W., Maeda, H., 2012. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. *Int. J. Legal Med.* 126, 943–952.
- Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M., Tsyganskaya, M., 2000. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genomics* 2, 143–147.
- WHO (World Health Organization), 2017. <http://www.who.int/en/> <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (accessed 17.02.20).
- Xie, J., Liu, X., Li, Y., Liu, Y., Su, G., 2016. Validation of RT-qPCR reference genes and determination of Robo4 expression levels in human retinal endothelial cells under hypoxia and/or hyperglycemia. *Gene* 585, 135–142.
- Zhu, G., Chang, Y., Zuo, J., Dong, X., Zhang, M., Hu, G., et al., 2001. Fudrine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 951–956.

# Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis

M. M. Maia<sup>1</sup> | C. S. Meira-Strejevitch<sup>1</sup> | V. L. Pereira-Chioccola<sup>1</sup>  |  
D. D. C. de Hippólito<sup>1</sup> | V. O. Silva<sup>1</sup> | C. C. Brandão de Mattos<sup>2</sup>  | F. B. Frederico<sup>3</sup> |  
R. C. Siqueira<sup>2</sup> | L. C. de Mattos<sup>2</sup>  | FAMERP and IAL Toxoplasma Research Group\*

<sup>1</sup>Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>3</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, São José do Rio Preto, Brazil

## Correspondence

Vera Lucia Pereira-Chioccola, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.  
Email: pchioccola@gmail.com

## Funding information

This study was supported by grants from: i. FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) 2014/09496-1; 2015/04803-6 to DDCH; 2013/10050-5 to MP; 2013/15879-8 to FHAM; 2013/25650-8 to LCM. ii. CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) to VLP-C 301369/2015-1.

## Summary

This study evaluated levels for mRNA expression of 7 cytokines in ocular toxoplasmosis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with ocular toxoplasmosis (OT Group, n = 23) and chronic toxoplasmosis individuals (CHR Group, n = 9) were isolated and stimulated in vitro with *T. gondii* antigen. Negative controls (NC) were constituted of 7 PBMC samples from individuals seronegative for toxoplasmosis. mRNA expression for cytokines was determined by qPCR. Results showed a significant increase in mRNA levels from antigen stimulated PBMCs derived from OT Group for expressing IL-6 (at  $P < .005$  and  $P < .0005$  for CHR and NC groups, respectively), IL-10 (at  $P < .0005$  and  $P < .005$  for CHR and NC groups, respectively) and TGF- $\beta$  (at  $P < .005$ ) for NC group. mRNA levels for TNF- $\alpha$  and IL-12 were also upregulated in patients with OT compared to CHR and NC individuals, although without statistical significance. Additionally, mRNA levels for IL-27 and IFN- $\gamma$  in PBMC of patients with OT were upregulated in comparison with NC individuals. Differences between OT and NC groups were statistically significant at  $P < .05$  and  $P < .0005$ , respectively.

## KEYWORDS

cytokines, gene expression, ocular toxoplasmosis, PBMC

## 1 | INTRODUCTION

*Toxoplasma gondii* is a protozoan that multiplies in nucleated cells of warm-blooded animals. Although toxoplasmosis is generally asymptomatic and self-limiting in healthy adults, it may have serious destructive inflammatory consequences in immunocompromised individuals and may cause ocular toxoplasmosis in cases of congenital infection or after birth-acquired infections.<sup>1-5</sup>

In ocular toxoplasmosis, these lesions may destroy the architecture of the neural retina and sometimes involve the choroid (retinochoroiditis). The lesions may be multiple, single or adjacent to scars, caused by reactivation or acute, unilateral or bilateral infection.<sup>6-10</sup> Some complications of ocular toxoplasmosis include cataracts, glaucoma, cystoid

macular oedema, retinal detachment, optic nerve atrophy and choroidal neovascularisation advanced stages.<sup>10</sup> Ocular toxoplasmosis is, also, a common disease in the north-western region of São Paulo State, in Brazil. A previous report shows that around 27% of patients treated at an ophthalmology outpatient clinic showed clinical symptoms of ocular toxoplasmosis.<sup>8,11</sup>

The severity and prevalence of the disease vary greatly and are believed to be affected by the status of the host immune system,<sup>12</sup> the genotype of infective parasite strains<sup>3,13</sup> and the host genetic background.<sup>14-16</sup> Some investigators have hypothesized that immunological and genetic parameters may play significant roles in the pathogenesis of toxoplasmosis or eradication of the *T. gondii* from the infected tissues. The current data suggest that cytokines play a significant role in the development of appropriate immune responses against *T. gondii* as well as control of its related diseases.<sup>15,16</sup>

\*See Appendix for authors in FAMERP and IAL Toxoplasma Research Group.

Our previous study<sup>15</sup> and others<sup>17,18</sup> have shown changes in cytokine levels in ocular toxoplasmosis. These data emphasize the importance of cellular response in pathogenesis of the disease. Consequently, this study was aimed to analyse how genes encoding IL-6, IL-10, IL-12, IL-27, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are expressed during the infection. The analyses were performed in messenger RNA (mRNA) purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with ocular toxoplasmosis compared with individuals chronically infected and negative for *T. gondii*.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Ethical considerations

The Ethics Committees of all involved Institutions approved the entire study, which was performed per recommendations of these Committees (CONEP-IAL number: 1034567). All patients provided written informed consent from the institutional review boards of Ethics Committee.

### 2.2 | Patients and clinical samples

This prospective study evaluated a total of 39 clinical samples classified into three groups. ocular toxoplasmosis (OT) Group comprised 23 PBMC samples from patients stricken by ocular toxoplasmosis. They were admitted and treated at the Ophthalmology Outpatient Clinics from Fundação Faculdade Regional de Medicina, Hospital de Base, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. These clinical samples were received at the Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil, between May 2014 and May 2016. They were clinically diagnosed as having toxoplasmic retinochoroiditis

scars by fundoscopic examination.<sup>7,8,19</sup> All of them were seropositive for toxoplasmosis (positive anti-*T. gondii* IgG), and 39% of them had positive PCR. The chronic toxoplasmosis individuals (CHR) Group consisted of 9 PBMC samples from individuals chronically infected with *T. gondii*. Negative controls (NC) Group (negative controls) comprised of 7 PBMC samples from healthy individuals with negative serological test for toxoplasmosis (Table 1). The study included the analyses of peripheral blood collected in tubes: (i) with EDTA (5 mL) for PCR; (ii) with no anticoagulants (5 mL) for serological tests; and (iii) with sodium heparin (10 mL) for PBMC and RNA extractions. Samples were sent to laboratory within 48 hours after collection and immediately processed. According to patients from the OT Group, blood samples were collected before the antiprastic therapy for toxoplasmosis.

### 2.3 | *T. gondii* antigens

*T. gondii* lysate antigen (TLA) was prepared as described before.<sup>20,21</sup> Briefly, tachyzoites (RH strain) from Vero cell cultures were purified by filtration. Then, parasites were washed, suspended in PBS and lysed using glass beads by vortex for 8 cycles for 4 minutes with 2-minute intervals. Parasite extract was centrifuged (3000 g) and dissolved in 0.3 mol/L NaCl. Protein concentration was determined at 280 nm by spectrometry in NanoDrop ND100 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). TLA was used as antigen in ELISA (for serological diagnosis) and to stimulate PBMC to produce cytokines.

### 2.4 | Laboratorial diagnosis

For serological diagnosis, ELISA was performed exactly as described before,<sup>19-21</sup> using TLA as antigen. For molecular diagnosis, the protocols were performed exactly as described before for blood samples.<sup>22</sup>

	Groups		
	OT <sup>a</sup> (n = 23)	CHR <sup>b</sup> (n = 9)	NC <sup>c</sup> (n = 7)
Data of the sample collection (y)	2014-2016	2016	2016
Median age (range)	63 (15-76)	35 (25-60)	30 (25-45)
Gender	12M-11F	4M-5F	1M-6F
Clinical diagnosis <sup>d</sup>	Active RtC (14%) <sup>e</sup> Active and RtC scar (2%) RtC scar (84%)	Chronic toxoplasmosis	Seronegative for toxoplasmosis
Positive PCR in blood (for <i>T. gondii</i> DNA)	39% (9/23)	Negative (9/9)	Negative (7/7)
Anti- <i>T. gondii</i> antibodies ELISA	Positive (23/23)	Positive (9/9)	Negative (7/7)

**TABLE 1** Clinical and laboratory diagnosis of patient groups analysed in this study

<sup>a</sup>OT (ocular toxoplasmosis).

<sup>b</sup>CHR (chronic toxoplasmosis).

<sup>c</sup>NC (negative controls).

<sup>d</sup>Diagnosis was defined by clinical, images and laboratory data as described in Materials and Methods section.

<sup>e</sup>Active and retinochoroiditis (RtC) scars in the right and left eyes, respectively.

DNA molecules were extracted from peripheral blood samples and tachyzoites (positive control by QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen). The protocol for DNA purification was performed according to the manufacturer's instructions in a Robotic workstation for automated purification of DNA (QIAcube, Qiagen). *T. gondii* was identified by cPCR using primer pair B22-B23, designed to amplify a 115 bp amplicon from the B1 gene as target. To verify the absence of PCR inhibitors, samples were also assayed by cPCR using a housekeeping gene that amplified a 140 bp fragment of the human  $\beta$ -globulin gene. Reactions were run following the same conditions as described elsewhere.<sup>23</sup>

## 2.5 | Isolation of PBMC

The preparations were performed as described before.<sup>15</sup> A volume of 10 mL of peripheral blood containing sodium heparin and an equal volume of PBS, pH 7.2, were added to the blood. The PBMCs were separated over Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). After isolation, cells were washed two times with PBS by centrifugation at 1,000 *g* for 10 minutes and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma) containing L-glutamine, 2 g/L sodium bicarbonate, 10% heat-inactivated foetal calf serum and 50 mg/mL of streptomycin. The viability of the cells used in the experiments was always higher than 85%, as measured by trypan blue exclusion (Sigma). The cells were then plated at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well into 48-well culture plates in a final volume of 500  $\mu$ L. PBMCs were then stimulated with 1  $\mu$ g/mL of TLA. Alternatively, as positive control for experiments, cells were stimulated with 2  $\mu$ g/mL of phytohemagglutinin. Culture medium was used in all experiments as negative control wells. PBMC cultures were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and cells were collected after 48 hour of stimulation. In these cells, 300  $\mu$ L of RNeasy Lysis Solution (Qiagen) was added to protect cellular RNA from degradation; cells were stored at -70°C until RNA isolation.

## 2.6 | RNA isolation and cDNA synthesis

To minimize the RNA degradation by RNases during the experimental process, all materials and working surfaces were cleaned using RNaseZap<sup>®</sup> RNase Decontamination Solution (Ambion™) prior to handling the samples. RNA molecules were extracted from PBMC using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. First, the samples were centrifuged 2800 *g* for 10 minutes for RNeasy Lysis Solution removal. Next, RLT buffer (350  $\mu$ L) was added to the samples and vortexed for 20 seconds for complete cell lysis. To remove residual genomic DNA, isolated RNA molecules were treated with Turbo DNA-free™ Kit (Ambion™) prior to cDNA synthesis. Next, 100 ng/ $\mu$ L of total RNA was reverse-transcribed (RT) using a High-Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems). RT was performed using a Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions under the following thermal conditions: 10 minutes at 25°C, 120 minutes at 37°C followed by 5 minutes at 85°C. All cDNA samples were stored at -70°C until use in real-time quantitative PCR assays (qPCR).

## 2.7 | Quality control of total RNA

Extraction yield and concentrations were assessed by Quantus™ Fluorometer (Promega). RNA integrity and level of degradation were assessed by on-chip electrophoresis using an RNA 6000 Nano kit and Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Based on the electropherogram, RNA integrity number (RIN) between 1 (completely degraded) and 10 (completely intact) was calculated, considering the 18S/28S rRNA peaks, as well as, the background and possible degradation products.<sup>24</sup>

## 2.8 | Quantitative Real-time PCR (qPCR)

qPCR amplification mixture contained 10  $\mu$ L of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix and 1  $\mu$ L TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (both Applied Biosystems) for the following genes: interleukin 6 (*IL6*), interleukin 10 (*IL10*), transforming growth factor beta (*TGF- $\beta$* ), tumour necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ), interleukin 12 (*IL12*), interleukin 27 (*IL27*), interferon gamma (*IFN- $\gamma$* ) and TATA box-binding protein (*TBP*). Assay IDs are shown in Table 2. Template cDNA (4  $\mu$ L) and 5  $\mu$ L of RNase-free water were added to a total volume of 20  $\mu$ L. Reactions were prepared in triplicate for each sample and all assays. Samples were amplified and detected using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the following thermal profile: 2 minutes, 50°C and 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles performed at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minutes. The results with no amplification in qPCR were repeated at least three times.

## 2.9 | Data analysis

Values of mRNA expression were shown as median of  $\Delta C_T$  values ( $C_T$  reference gene -  $C_T$  target gene). The higher the  $\Delta C_T$ , the greater is the amount of target amplicon. Estimates of the fold changes in gene expression ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) are shown on the graphs.<sup>25</sup> The *TBP* gene was chosen as reference gene as its uniform expression throughout PBMC.<sup>26</sup> Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 6.0 (San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used to compare differences between groups. In all cases, differences were considered statistically significant when  $P < .05$ .

# 3 | RESULTS

## 3.1 | RNA extraction and integrity

Total RNA molecules were successfully extracted from all 39 samples. The mean RNA yield obtained from PBMC samples was 38 ng/ $\mu$ L (range 16-85 ng/ $\mu$ L). Means of RIN values were 7.9 (range 7.0-9.0) for all PBMC samples.

## 3.2 | Expression of IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$ were upregulated in patients with OT

After stimulation of PBMC with TLA and posterior RNA extraction, the results of the relative mRNA levels expressed as  $\Delta C_T$  values are

**TABLE 2** Description of the genes analysed in this study

Gene Symbol	Gene Name	Accession number	Biological function	Assay ID <sup>a</sup>	Amplicon length	Location chromosome
IL6	Interleukin 6	[RefSeq: NM_000600.4]	Protein coding	Hs00985639_m1	66	7
IL10	Interleukin 10	[RefSeq: NM_000572.2]	Protein coding	Hs00961622_m1	74	1
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	[RefSeq: NM_000660.5]	Protein coding	Hs00998133_m1	57	19
TNFA	Tumour necrosis factor alpha	[RefSeq: NM_000594.3]	Protein coding	Hs01113624_g1	143	6
IL12B	Interleukin 12B	[RefSeq: NM_002187.2]	Protein coding	Hs01011518_m1	72	5
IL27	Interleukin 27	[RefSeq: NM_145659.3]	Protein coding	Hs00377366_m1	75	16
IFNG	Interferon gamma	[RefSeq: NM_000619.2]	Protein coding	Hs00989291_m1	73	12
TBP	TATA box-binding protein	[RefSeq: NM_003194.4]	Transcription factor	Hs00427620_m1	91	6

TaqMan real-time PCR assays were chosen to span at least one exon-exon boundary and can be purchased with the given assay IDs (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

<sup>a</sup>Purchased from Applied Biosystems.

shown in Figure 1. mRNA expression for IL-6 and IL-10 was upregulated in patients from the OT Group than those individuals from the CHR and NC Groups. The differences between results from IL-6 were statistically significant at  $P < .005$  and  $P < .0005$  for CHR and NC groups, respectively. For IL-10, differences between groups were statistically significant at  $P < .0005$  and  $P < .005$  for CHR and NC groups, respectively. mRNA expression for TGF- $\beta$  was only upregulated in patients from the OT Group than those individuals from the NC Groups at  $P < .005$ .

mRNA levels for TNF- $\alpha$  and IL-12 were also upregulated in patients with OT compared to CHR and NC individuals, although without statistical significance ( $P > .05$ ). In contrast, mRNA levels for IL-27 and IFN- $\gamma$  in PBMC of patients with OT were upregulated in comparison with NC individuals. Differences between OT and NC groups were statistically significant at  $P < .05$  and  $P < .0005$ , respectively.

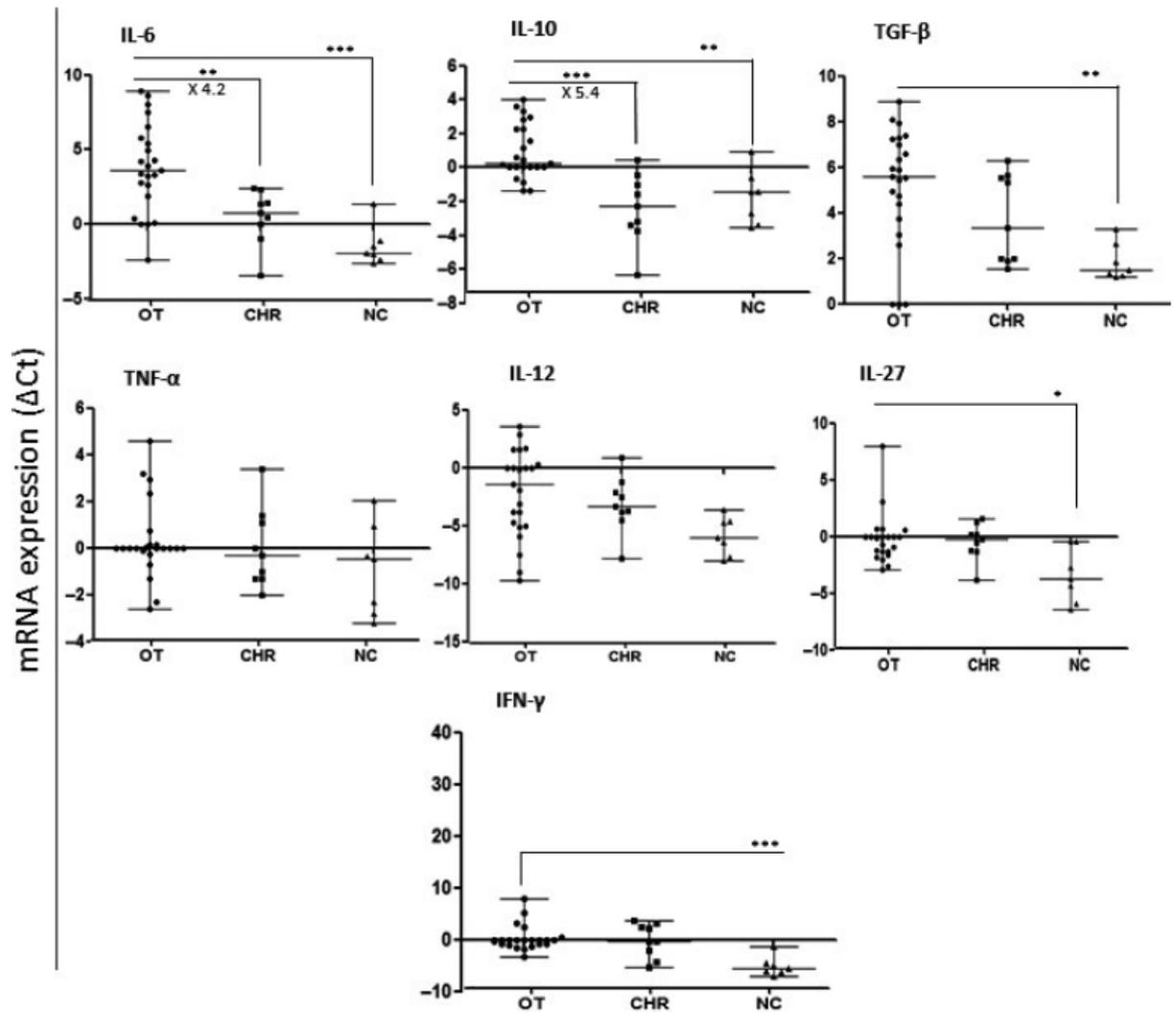
## 4 | DISCUSSION

Results of this study showed a significant increase in mRNA levels for expressing IL-6, TGF- $\beta$  and IL-10 of TLA-stimulated PBMCs derived from patients with OT. Previous studies have provided conflicting data concerning the role of IL-6 during toxoplasmosis. IL-6 is a strong proinflammatory mediator in the ocular infection and is capable to antagonize the antimicrobial properties of IFN- $\gamma$  by sustained activation of STAT3, a potent inhibitor of IL-12 and IFN- $\gamma$ .<sup>27,28</sup> The high intra-ocular concentration of IL-6 could add to the action of chemokines and aggravate the destructive local inflammatory response within the retina.<sup>29,30</sup> However, some studies suggest that IL-6 may reduce parasite multiplication by promoting the formation

of cysts<sup>31</sup> and plays a beneficial role in limiting parasite burden and inflammation in the eyes of mice infected with *T. gondii*.<sup>32</sup> When investigating the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis, a hallmark of immune privilege in the eye is constitutive expression of TGF- $\beta$ <sup>33</sup>; however, in ocular infection, significantly increases levels of TGF- $\beta$  transcripts suggesting that the upregulation may protect uninfected cells from nonspecific inflammatory responses.<sup>32</sup> Corroborating with our findings, these studies showed that elevated local levels of IL-6 and TGF- $\beta$  have been found in murine ocular toxoplasmosis. In agreement, the ocular parasite burden and activity inflammatory seem to be controlled by IL-6, whereas TGF- $\beta$  (as a regulator of the ocular immune privilege), in association with IL-10,<sup>29</sup> limits inflammatory activity.<sup>30</sup>

IL-10 is an immunomodulatory cytokine produced by various cells and often concomitant with IFN- $\gamma$  or IL-17.<sup>35-37</sup> In high concentrations, as produced in most patients of the OT Group, it seems to favour the induction of the permissive state seen in the eyes of patients in South America.<sup>34</sup> These data, also, could be explained by the deviation of Th2 immune response including the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4, that favours the parasite's survival.<sup>34</sup> This strategy is required to maintain immune equilibrium in the eye preventing the tissue immune destruction.<sup>37</sup>

mRNA levels expressing IL-27 and IL-12 were similar in OT and CHR Groups. IL-27 directly inhibits Th17 cell commitment and development during autoimmune encephalitis and cerebral toxoplasmosis.<sup>38-40</sup> IL-27 levels could be at the origin of the observed shift from pathogenic Th17 to a protective Th1-type response.<sup>38</sup> While IL-27 was initially described as a Th1-inducing factor in *T. gondii* infection studies,<sup>41</sup> more recent studies showed pleiotropic effects on Th subset regulation.<sup>42,43</sup>



**FIGURE 1** mRNA relative expression of cytokines listed in each graphic from Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after TLA stimulation *in vitro*. PBMC ( $1 \times 10^6$ /well) from patients with ocular toxoplasmosis (OT—circles), chronic individuals (CHR—squares) and negative controls (NC—triangles) were stimulated with  $1 \mu\text{g/mL}$  of TLA. Cells were collected after 48 h. After RNA isolation and cDNA synthesis, qPCR determined gene expression of each cytokine. Values of mRNA expression are shown as median  $\pm$  SEM of  $\Delta\text{C}_T$ , whose calculations were described in Materials and Methods section. The higher  $\Delta\text{C}_T$  is the greater amount of target amplicon. Point estimates of the fold changes in gene expression ( $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ ) are shown on the graphs. The horizontal lines indicate the medians and vertical lines de range. Comparison of reactivity between groups by Mann-Whitney test (95% confidence interval) at \* $P < .05$ , \*\* $P < .005$ , \*\*\* $P < .0005$

Results also showed similar mRNA levels for TNF- $\alpha$  in OT and CHR Groups. These data are in agreement with other studies when the susceptibility of patients with OT and production of TNF- $\alpha$  contributed to the inflammatory response and damage of the choroid and retina.<sup>44-46</sup> In addition, TNF- $\alpha$  is involved in the regulation of tachyzoite growth.

One of the most important factors for resistance of patients to ocular toxoplasmosis is associated with the ability to produce IL-12 and IFN- $\gamma$  against parasitic antigens, as is responsible for regulation of *T. gondii* load and distribution in the eyes. Equality, IFN- $\gamma$  is an essential mediator to control *T. gondii* in the brain and to maintain the latency of chronic infection.<sup>17,47,48</sup> In fact, this study showed that patients with ocular toxoplasmosis (OT Group) had similar mRNA IFN- $\gamma$  expression than those

individuals from the CHR Group. Studies have shown that the production *in situ* of IFN- $\gamma$  increases in infected and asymptomatic individuals compared with those afflicted with symptomatic toxoplasmosis.<sup>15,49</sup> Levels of this cytokine found in individuals from the CHR Group can be explained by its release by parasite-specific T lymphocytes, which are required to prevent cyst reactivation during chronic infection.<sup>50</sup>

Despite the role of IL-12 in the stimulation of IFN- $\gamma$  production, mRNA IL-12 levels were upregulated in patients with OT compared to CHR individuals, although without statistical significance ( $P > .05$ ). Nevertheless, Lahmar et al.<sup>51</sup> found ocular IL-12 levels significantly augmented in patients with ocular toxoplasmosis, which may be related to local IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production observed in most patients studied.<sup>52</sup>

PCR for *T. gondii* was positive in 39% of patients with OT, confirming our previous study.<sup>19</sup> However, no correlation was observed between cytokine gene expression levels and parasite load.

Limitations regarding sample collection, processing or individual variation of each patient were also observed in this study. Samples from some patients (OT Group) were negative in detecting the mRNA levels of some cytokines, but the endogenous gene was perfectly detected in all the samples. In such cases, careful evaluation of qPCR data is needed for the interpretation of specific alterations in target gene expressions. The accuracy of gene expression analysis using qPCR can be influenced by quality of RNA<sup>53</sup> and individual susceptibility or variations in genes encoding immune response players, as already seen in IFN- $\gamma$ , IL-10 or TNF- $\alpha$ .<sup>52,53</sup> These data can suggest that these genetically susceptible patients are possibly less able to cope with a more virulent strain.

In conclusion, in ocular toxoplasmosis, most available studies evaluated cytokines directly in aqueous humour samples. The differential of this study was to analyse the levels of mRNA expressing cytokines at the systemic level (peripheral blood). The monitoring of the immune response in different clinical forms of infection provides valuable information that can help in understanding the mechanisms of immune system control over parasites.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

VL Pereira-Chioccia and CS Meira-Strejevitch designed the study and experiments, performed the data analysis, interpreted data and wrote the manuscript. MM Maia, DDC Hipólito, VO Silva, LM Camilo and G Motoie performed the laboratorial experiments (RNA purification, cPCR, qPCR, ELISA and data analysis). CC Brandão de Mattos, LC de Mattos, FB Frederico, RC Siqueira, M Previato, AP Barbosa, D Cavallini and FHA Murata performed the inclusion of patients with ocular, sample collection, developed the clinical evaluation in FAMERP. All authors revised the manuscript, approved the final version submitted, published and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### ORCID

V. L. Pereira-Chioccia  <http://orcid.org/0000-0003-3317-195X>

C. C. Brandão de Mattos  <http://orcid.org/0000-0002-4836-3113>

L. C. de Mattos  <http://orcid.org/0000-0002-8572-8177>

#### REFERENCES

- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol.* 2008;55:467-475.
- Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Exp Ophthalmol.* 2013;41:95-108.
- Pereira-Chioccia VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009;4:1363-1379.
- Pomeroy C, Filice GA. Pulmonary toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis.* 1992;14:863-870.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis.* 2012;44:805-814.
- Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:1056-1061.
- Ferreira AIC, De Mattos CCB, Frederico FB, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2014;142:142-148.
- Previato M, Frederico FB, Murata FH, et al. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. *BMC Res Notes.* 2015;8:746.
- Lima GS, Saraiva PG, Saraiva FP. Current therapy of acquired ocular toxoplasmosis: a review. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;31:511-517.
- Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: factors and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:211-220.
- 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;139:1375-1424.
- Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol.* 1999;29:1351-1358.
- Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos CC, et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol.* 2011;129:190-195.
- Sullivan WJ Jr, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:717-733.
- Meira CS, Pereira-Chioccia VL, Vidal JE, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front Microbiol.* 2014;13:492.
- Abdollahi SH, Ayoobi F, Khorramdelazad H, et al. Interleukin-10 serum levels after vaccination with in vivo prepared *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Oman Med J.* 2013;28:112-115.
- Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, et al. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. *Scand J Immunol.* 2002;55:324-328.
- Sauer A, Rochet E, Lahmar I, et al. The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int J Parasitol.* 2013;43:721-728.
- Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:362-366.
- Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccia VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol.* 2008;57:845-850.
- Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccia VL. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in vero cell maintained in serum free medium. *Exp Parasitol.* 2012;130:463-469.

22. Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol.* 2010;59:641-647.
23. Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5044-5047.
24. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;31:3.
25. Nai A, Rubio A, Campanella A, et al. Limiting hepatic Bmp-Smad signaling by matriptase-2 is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood.* 2016;127:2327-2336.
26. Meira-Strejvitch CS, Pereira-Chioccola VL, Maia MM, et al. Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues. *Gen Rep.* 2017;7:98-105.
27. Hoekzema R, Murray PI, Kijlstra A. Cytokines and intraocular inflammation. *Curr Eye Res.* 1990;9:207-211.
28. Whitmarsh RJ, Gray CM, Gregg B, et al. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe.* 2011;10:224-236.
29. Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, et al. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2013;208:1520-1528.
30. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis.* 2003;187:1484-1495.
31. Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol.* 1995;42:50-57.
32. Lyons RE, Anthony JP, Ferguson DJ, et al. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6. *Infect Immun.* 2001;69:2589-2595.
33. Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol.* 1997;158:3557-3560.
34. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup> Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 2004;114:1372-1378.
35. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1183:211-221.
36. de-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine.* 2014;68:23-31.
37. Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1997;65:1675-1682.
38. Sauer A, Pfaff AW, Villard O, et al. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis.* 2012;206:1319-1329.
39. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7:937-945.
40. Guiton R, Vasseur V, Charron S, et al. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis.* 2010;202:427-435.
41. Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol.* 2006;176:237-247.
42. Hall AO, Beiting DP, Tato C, et al. The cytokines interleukin 27 and interferon- $\gamma$  promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity.* 2012;37:511-523.
43. Wojno ED, Hunter CA. New directions in the basic and translational biology of interleukin-27. *Trends Immunol.* 2012;33:91-97.
44. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:569-588.
45. Wallace GR, Stanford MR. Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Clin Exp Immunol.* 2008;153:309-315.
46. Talabani H, Mergey T, Yera H, et al. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite.* 2010;17:177-182.
47. Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull.* 2007;33:745-751.
48. Nijhawan R, Bansal R, Gupta N, Beke N, Kulkarni P, Gupta A. Intraocular cysts of *Toxoplasma gondii* in patients with necrotizing retinitis following periocular/intraocular triamcinolone injection. *Ocul Immunol Inflamm.* 2013;21:396-399.
49. de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- $\gamma$ /IL-17a and increased IL-6/IL-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2541.
50. Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol.* 2000;52:534-543.
51. Lahmar I, Abou-Bacar A, Abdelrahman T, et al. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J Infect Dis.* 2009;199:1239-1249.
52. Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, et al. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:451-455.
53. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006;28:1601-1613.

How to cite this article: Maia MM, Meira-Strejvitch CS, Pereira-Chioccola VL, et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* 2017;39:e12462. <https://doi.org/10.1111/pim.12462>

## APPENDIX

FAMERP and IAL Toxoplasma Research Group:

Mariana Previato<sup>2,5</sup>, Amanda Pires Barbosa<sup>3,#</sup>, Danilo Cavalini<sup>3</sup>, Fernando Henrique Antunes Murata<sup>2</sup>, Lilian Muniz Camilo<sup>1</sup>, Gabriela Motoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunogenética, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil.

<sup>3</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, São José do Rio Preto, Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, Brazil;

<sup>#</sup>Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.