UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

NARJARA TIANE LOPES DE MELO

"APLICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 2F12 NA PESQUISA DE ANTI-NTPase EM LÁGRIMAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE TOXOPLASMOSE OCULAR EM RECIFE – PE"

RECIFE - PE
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

NARJARA TIANE LOPES DE MELO

"APLICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 2F12 NA PESQUISA DE ANTI-NTPase EM LÁGRIMAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE TOXOPLASMOSE OCULAR EM RECIFE – PE"

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Profª. Drª. Elizabeth Malagueño de Santana

Co-orientadora: Profª. Drª. Silvana de Fátima Ferreira da Silva

RECIFE - PE

2009

Melo, Narjara Tiane Lopes de
Aplicação do anticorpo monoclonal 2F12 na pesquisa de anti- NTPase em lágrimas de indivíduos portadores de toxoplasmose ocular em Recife- PE / Narjara Tiane Lopes de Melo. – Recife : O Autor, 2009.
78 folhas : fig. e tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Doenças infecciosas parasitárias. 2. Toxoplasmose ocular. 3. NTPase. 4. Diagnóstico. 5. Anticorpo monoclonal. I.Título.

616-022.39	CDU (2.ed.)	UFPE
616.96	CDD (22.ed.)	CCS2009-070

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)[1]

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA NARJARA TIANE LOPES DE MELO

No dia 19 de fevereiro de 2009, às 10h00, na Sala Prof. Murillo La Greca no 3º. and do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: **Profª. Drª. Maria Isabel Lynch Gaete (UFPE – Membro Externo), a Profª. Drª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (UFPE – Membro Externo) e a Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE – Membro Interno)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **NARJARA TIANE LOPES DE MELO** sobre a sua Dissertação intitulada "**APLICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 2F12 NA PESQUISA DE NTP-ase NO IMUNODIAGNÓSTICO DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE TOXOPLASMOSE OCULAR EM RECIFE-PE**". Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque	Aprovada
Profª. Drª. Maria Isabel Lynch Gaete	Aprovada
Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza	Aprovada

Monica C. P. A Albuquerque
Profª. Drª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Profª. Drª Maria Isabel Lynch Gaete

Valdênia Souza
Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

[1] Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: http://www.ufpe.br/ppgmedtrop

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Profº. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profº. José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOCENTE

Profª. Célia Maria Machado Barbosa de castro

Profº.Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Profª. Elizabeth Malagueño de Santana

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Profª. Maria Amélia Vieira Maciel

Profª. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Profª. Maria do Amparo Andrade

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Profº. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Profª. Sylvia Maria de Lemos Hinrinchsen

Profª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Profª. Vera Magalhães da Silveira

Dedico:

Aos meus pais Adelmo e Sandra, pois eles são os verdadeiros responsáveis pela minha formação moral e acadêmica.

Ao meu irmão Wallace, a minha prima-irmã Izabella e meu noivo Carlos que estiveram ao meu lado ao longo de toda a caminhada e me ajudaram a torná-la mais curta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força de vontade para nunca desistir das dificuldades.

À minha família, pelo carinho e atenção oferecidos mesmo a distância.

Ao meu noivo Carlos, por suportar pacientemente os momentos de estresse e de auto-cobrança com palavras de conforto e de motivação, como também pela eterna vontade de ajudar.

À minha orientadora Profa. Dra. Elizabeth Malagueño, por estar sempre disposta a oferecer estímulos, ouvindo sempre com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante a execução do trabalho. Por ser paciente, generosa e por sua compreensão declarada e muitas vezes silenciosa dos momentos difíceis, permitindo que meu tempo interno fluísse com a maior tranqüilidade possível.

Á minha co-orientadora Silvana Ferreira pela amizade, disposição e paciência em importantes momentos deste percurso.

Às professoras Vlaudia e Valdênia pela incansável e incontestável disposição em me ajudar em qualquer que fosse a necessidade.

À Patrícia D'Emery pela amizade devotada desde a nossa época de "I. C." e que guardarei comigo para sempre na lista dos grandes amigos.

À Wheverton Ricardo, Rodrigo Santana e Raiana Apolinário pelos auxílios diretos e indiretos nos intermináveis experimentos.

À Maiara Severo, Maíra Espíndola, Mirelle Souza Leão e Felipe Lynch pela amizade cultivada nos intervalos das aulas do mestrado e que continuou se fazendo presente mesmo fora do ambiente acadêmico.

Aos companheiros da “Imuno”: Profa. Mônica, Profa. Valdênia, Profa. Vlaudia, Profa. Silvana, Profa. Elizabeth, André, Amanda, Juliana, Érica, Naishe, Rafaela, Patrícia, Wheverton, Luiz, Rodrigo e Raiana que participaram comigo de muitos momentos comemorativos e outros nem tanto, mas que se fizeram presente ao longo desta jornada.

Aos amigos inseparáveis Ana Paula, Betânia, Bethânia, Djalma, Lígia e Maíra que fazem parte de todos os momentos de minha vida e que estão sempre “a postos” para o que for preciso.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

“Para evitar críticas, não faça nada, não diga nada, não seja nada.”

Elbert Hubbard

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um importante agente de uveíte posterior nos indivíduos imunocompetentes levando a perda parcial ou total da visão, caracterizando assim, a forma ocular da toxoplasmose. Atualmente, o diagnóstico laboratorial desta forma da doença, não produz bons resultados, levando a inexistência de correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e a sintomatologia ocular, sendo comum à ocorrência de títulos baixos. Para auxiliar o diagnóstico clínico e diferenciar a lesão toxoplásmica de lesões por outra etiologia, Asai et al. (1983) produziram um anticorpo monoclonal (AcMo-2F12), contra uma enzima citosólica, a NTPase, presente na forma ativa (taquizoíto) do *T. gondii.* Em camundongos infectados, a detecção desta enzima na circulação, foi capaz de identificar a fase ativa do parasito. O presente estudo se propôs a testar o AcMo-2F12, em lágrimas de indivíduos com toxoplasmose ocular clinicamente ativa, como uma possível ferramenta para o diagnóstico laboratorial diferencial da uveíte posterior por *T.gondii.*Como ferramenta de pesquisa, utilizamos o teste de dot blot em amostras de lágrimas de 21 pacientes com uveítes posterior ativa devido a infecção pelo *T. gondi* (UPAPT) com lesão *padrão ouro* (os pacientes apresentavam lesão satélite à lesão cicatrizada) e 20 indivíduos controles sem histórico nem lesões oculares sugestivas de toxoplasmose. Discos de nitrocelulose foram incubados com as lagrimas, bloqueados e incubados durante uma hora com o AcMo 2F12 a-NTPase, seguido de incubações com conjugados a-Ig total (a-Igt) de camundongo conjugado a biotina e avidina-Peroxidase. A sensibilidade do teste foi de 95,27%, especificidade 55%, valor preditivo positivo de 63,31% e valor preditivo negativo 90,48%. Obtivemos pelo teste de Fisher um valor de p=0,0005, considerado como significante todo valor de p<0,05 e odds ratio de 21,444 (considerando I.C. de 95%: 2, 726 a 219,21). Os resultados demonstraram forte associação entre a presença de NTPase na lágrima, detectada pelo AcMo 2F12 e a toxoplasmose ocular ativa.

.

Palavras chave: Toxoplasmose ocular, NTPase, Diagnóstico, Anticorpo Monoclonal

ABSTRACT

Toxoplasma gondii it is an important cause of posterior uveitis in immunocompetent individuals, leading to a partial or total vision loss, characterizing an important clinical form of the disease, the ocular toxoplasmosis. Currently, the laboratorial diagnosis of this illness is not satisfactory, leading to uncorrelation between the circulating antibodies levels and the ocular symptomatology, being common low antibodies titers in these patients. To assist the clinical diagnosis and differentiating toxoplasmic injury from those caused for another etiology, Asai et al (1983) produced an monoclonal antibody (Mab) 2F12, against a citosolic enzyme, the NTPase, present in tachyzoite form of parasite. This enzyme was detected in the blood of infected mice and allowed to identify the active phase of the parasite. This study aimed to investigate the prescence of NTPase in tears of individuals with ocular toxoplasmosis clinically active,using 2F12 monoclonal antibody as a tool for laboratorial diagnosis of posterior uveitis indiced by *T.gondii.* The NTPase determination was accomplishment by using dot blot test. Tears samples belonged to 21 patients with active posterior uveitis induced by *T. gondii* (APUPT) with gold standard lesions (the patients showed satellites lesions to the scarred lesions) and 20 healthy control subjects without lesions induced by *T. gondii*. The tears samples were incubated with disc of nitrocellulose for 18 hour at 4º C, blocked, incubated with the Mab 2F12 during 1 hour, followed by a-mouse Igt biotin and avidin-peroxidase conjugates. The sensitivity of the test was 92,57%, specificity 55%, positive predictive value 63,31% and negative predictive value 90,48%. Fisher's test demonstrated association between NTPase in APUT patients p=0,0005, considered significant p<0,05 and odds ratio was 21,444 (C.I. 95%:2, 726 a 219,21). Results show strong association between NTPase in tears, detected by 2F12 monoclonal antibody and active ocular toxoplasmosis.

Key words: Ocular Toxoplasmosis, NTPase, Diagnosis, Monoclonal antibody.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Modelo de tabela 2 x 2 utilizada nas análises estatísticas	**PÁGINA** 58
TABELA 2	Análise estatística do desempenho do teste de dot blot na pesquisa de NTPase pelo AcMo 2F12 em pacientes portadores e não portadores de UPAPT.	**PÁGINA** 58

LISTA DE ABREVIATURAS

APUPT	Active Posterior Uveitis induced by *Toxoplasma gondii*
AcMo	Anticorpo Monoclonal
ADP	Adenosina difosfato
BSA	Bovine Serum Albumin
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiolreitol
ELISA	Enzime-Linked Imunosorbent Assay
HC	Hospital das Clinicas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.C.	Intervalo de confiança
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kDa	Kilodalton
LIKA	Laboratório de imunologia Keizo-Asami
Mab	Monoclonal Antibody
NTPase	Nucleosil Trifosfato Hidrolase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Tris Buffered Saline
T. gondii	*Toxoplasma gondii*
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPAPT	Uveíte posterior presumivelmente por *T. gondii*
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
µL	microlitros
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 16
2.0 REVISÃO DA LITERATURA 20
2.1 O PARASITO E SEUS HOSPEDEIROS... 20
2.1.1 HOSPEDEIROS DEFINITIVOS 20
2.1.2 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS 21
2.2 PATOGENIA E PREVALÊNCIA 25
2.2.1 TOXOPLASMOSE 25
2.2.2 TOXOPLASMOSE OCULAR 27
2.3 DIAGNÓSTICO 29
2.3.1 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE 29
2.3.2 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE OCULAR 31
2.4 PESQUISA DE NTPase 33
2.5 ANTICORPOS MONOCLONAIS 34
3.0 OBJETIVOS 35
4.0 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS 37
4.1 DESENHO DO ESTUDO 38
4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO 38
4.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 38
4.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 38
4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS 39
4.3.1 GRUPO CONTROLE 39
4.3.2 GRUPO CASO 39
4.4 COLETA DAS AMOSTRAS 40
4.5 EXPANSÃO DO HIBRIDOMA E PURIFICAÇÃO DO AcMo 2F12 ANTI-NTPase DE *Toxoplasma gondii* 40
4.5.1 DESCONGELAMENTO E EXPANSÃO DO HIBRIDOMA 41
4.5.2 PURIFICAÇÃO DO AcMo 2F12 41
4.6 TESTE DE DOT BLOT PARA TOXOPLASMOSE OCULAR 41
4.7 ANÁLISE DOS DADOS 42
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 43
5.0 ARTIGO 44

RESUMO 46
ABSTRACT 46
INTRODUÇÃO 47
MATERIAIS, PACIENTES E MÉTODOS 49
RESULTADOS 52
DISCUSSÃO 53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
TABELAS 58
6.0 CONCLUSÃO 59
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61
8.0 APÊNDICES 68
APÊNDICE N° 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 69
9.0 ANEXOS 71
ANEXO N° 1 – Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE..... 72
ANEXO N° 2 – Instrução aos autores..... 73

1.0. INTRODUÇÃO

1.0- INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de alta prevalência no mundo provocada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Este é um protozoário coccídeo intestinal de gatos e outros felídeos que, comumente, infecta outros animais de sangue quente, inclusive o homem. (FRENKEL et al, 1970; DUBEY ,1977). A principal forma de transmissão da doença para humanos é pela ingestão de alimentos ou água contaminada pelas formas de oocistos do parasito provenientes principalmente de fezes de gatos domésticos ou pela ingestão de carne mal cozida contendo cistos teciduais e pela passagem do parasito pela barreira transplacentária. (PREZELOV et al, 2008; SUZUKI et, al 2001, DODDS, 2003).

Inquéritos sorológicos indicam que a prevalência da infecção pelo *T. gondii* chega a 30% no mundo. (JOHNSON et al, 2003; LANG et al, 2007). A infecção em adultos, geralmente segue de forma subclínica e pode persistir por muitos anos de forma crônica. Em pacientes imunodeprimidos que já estiveram em contato com o parasito, a infecção crônica tende a reativar podendo levar às formas graves da doença. A forma congênita da doença é adquirida quando o parasito infecta a mulher na gestação e esta passa a infecção ao feto (JOHNSON et al, 2003). No feto infectado congenitamente a infecção pode levar a sérias complicações como é o caso da toxoplasmose ocular, que hoje é a causa de cerca de 25% de todos os casos de cegueira no mundo (KIJILISTRA & JONGERT, 2008). A retina é o sítio primário de infecção pelo *T. gondii* (GÓMEZ –MARIN et al, 2000) ou seja, o taquizoíto inicia a replicação na retina com necrose tecidual local que se propaga em direção à coróide e surgem sinais de inflamação adjacente levando a retinocoróidite (LABALETTE et al., 2002). A retinocoróidite toxoplásmica tem sido mais comumente reconhecida como causadora de uveítes posteriores em muitos pacientes (GÓMEZ –MARIN et al, 2000).

O diagnóstico da toxoplasmose ocular é baseado em aspectos clínicos típicos, a retinocoróidite toxoplásmica é tida como lesão clássica, e esta se refere à presença de um foco de retinite satélite a uma cicatriz retinocoróidea. Contudo, existem casos que permanecem de difícil identificação pela ausência de sinais típicos e de testes de laboratório de boa sensibilidade capazes de identificar por alterações sorológicas o quadro do paciente (LYNCH et al, 2008). Sendo assim, os ensaios laboratoriais possuem apenas a capacidade de responder se o indivíduo já teve contato com o parasito, mas não confirmam o diagnóstico da doença. (GARWEG, 2005).

Estudos realizados por Asai et al. (1983) identificaram uma enzima localizada no citosol de taquizoítos (forma ativa) de *T. gondii*, a Nucleosil Trifosfato Hidrolase (NTPase). Esta é uma das principais proteínas citosólicas do parasito e possui dentre outras funções a de regular o crescimento e replicação do parasito, sendo um dos melhores antígenos estimuladores da resposta imune na fase aguda da infecção toxoplásmica (ASAI, et al 1983; ASAI, et al 1992).

Baseando-se nestes estudos, este trabalho propõe-se a testar, em lágrimas, um anticorpo monoclonal (o anticorpo monoclonal 2F12) produzido por este grupo contra a porção NTPase do antígeno de *T. gondii* como uma possível ferramenta diagnóstica laboratorial para toxoplasmose ocular.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.0. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O PARASITO E SEUS HOSPEDEIROS

O protozoário *Toxoplasma gondii*, foi primariamente identificado há cerca de 100 anos em tecidos de pássaros e mamíferos por Nicolle e Manceaux (1908) no norte da África. Os autores descreveram a forma assexuada do parasito, taquizoítos, em uma espécie de roedor chamado de gundi (*Ctenodoactylus gundi*). Simultaneamente no Brasil, Splendore identificou o parasito em tecido de coelho. Nicolle e Manceaux nomearam o gênero de *Toxoplasma* pelo fato do parasito possuir a forma de arco, que no grego é "Toxo" e "plasma" significar criatura. (KIM & WEISS, 2008).

O parasito apresenta três formas de infecção: a forma taquizoíta, os bradizoítos (que formam cistos) e os esporozoítos (formando oocistos). Estas três formas evolutivas compõem um complexo ciclo de vida. (DUBEY et al., 1998).

O *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, um grande grupo composto em sua maioria por parasitos intracelulares, incluindo patógenos que provocam infecções potencialmente fatais como o *Plasmodium* ssp., agente causador da malária (COPPENS & JOINER, 2001). Sendo também membro da classe *Sporozoa* (TONELLI et al, 1987) e da ordem *Eucoccidea* (COUTINHO & VERGARA, 2005).

2.1.1. HOSPEDEIROS DEFINITIVOS

Os felídeos (domésticos ou selvagens) são os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii* conhecidos. A infecção natural nos gatos (*Felis catus)* ocorre pela ingestão de cistos contidos nos tecidos das suas presas (pequenos mamíferos e aves). A transmissão vertical nesses animais é rara e experimental. Achados sorológicos indicam que aproximadamente

74% da população de gatos adultos está infectada pelo *T. gondii.* (DUMÈTRE & DARDÉ, 2003).

A soroprevalência aumenta com a idade e é maior em gatos de rua. Em hospedeiros selvagens (suçuarana, leões da montanha, linces e jaguares), a infecção natural também se dá pela ingestão de cistos, mas dados experimentais têm mostrado que a produção de oocistos é mais variável em animais selvagens do que em gatos domésticos (DUMÈTRE & DARDÉ, 2003).

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro definitivo pode se iniciar com a ingestão dos cistos. No intestino dos gatos, os bradizoítos desencistados invadem as células enteroepiteliais e começam a multiplicação assexuada. A diferenciação em macrogametócitos (fêmea) ou microgametócitos (macho) se inicia dentro de 3 a 15 dias após a contaminação. Microgametas flagelados são libertados dos microgametócitos dentro do lúmen intestinal para que possa ocorrer a fertilização dos macrogametas em células enteroepiteliais. Aparentemente, a fertilização parece não ser essencial para a reprodução do *T. gondii* ser satisfatória. Oocistos imaturos são liberados das células epiteliais e passam às fezes diariamente. Estes, não são diretamente infectantes aos animais. Este processo de aumento do poder de infectividade (esporulação) ocorre de 1 a 21 dias em temperatura de 11 – 25° C e condições favoráveis de ventilação e umidade. Um oocisto esporulado possui 2 esporocistos, cada um contendo 4 esporozoítos infectantes. No período de 1 a 3 semanas ocorre a produção e disseminação ao ambiente de grande quantidade de oocistos (DUMÈTRE & DARDÉ, 2003).

2.1.2. HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

Nos hospedeiros intermediários, que podem ser qualquer tipo de mamífero (incluindo o homem) e pássaros (DUBEY, 1988; STROEHLE et al, 2005), bem como também existem relatos de contágios em répteis e anfíbios (GARCIA et al, 1999a). A infecção geralmente é

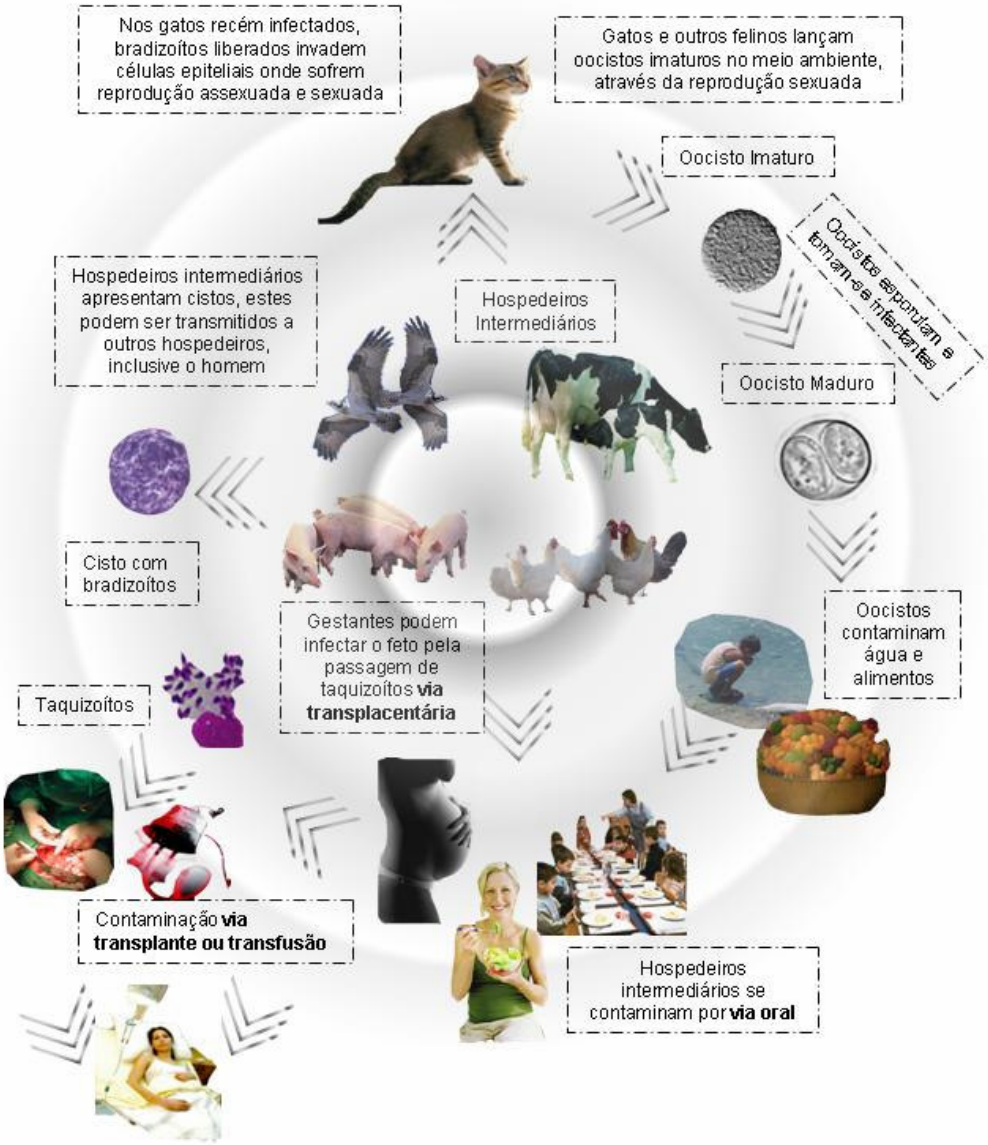
contraída após ingestão de oocistos, bradizoítos ou taquizoítos, há o surgimento de gametócitos (macromegatócitos e micromegatócitos) que se fundem e formam zigotos, os quais evoluem para formar oocistos. Após o amadurecimento, um oocisto apresenta dois esporocistos com quatro esporozoítos em seu interior. A liberação de oocistos pelo gato pode durar cerca de 30 dias e a infectividade dos cistos pode chegar a 18 meses em condições favoráveis (DUBEY et al, 1998). Quando a infecção ocorre por ingestão de oocistos, esta pode ocorrer pela ingestão de oocistos presentes em água, no solo ou em alimentos contaminados, (TENTER et al, 2000) bem como por transfusões sangüíneas e transplantes de órgãos (GARCIA et al, 1999a). Quando ingeridos por outros hospedeiros que não os felídeos, os oocistos se transformam rapidamente na forma de taquizoítos que caracterizam a forma aguda da doença, enquanto que na fase crônica são encontradas as formas císticas nas células do hospedeiro, estas são denominadas de bradizoítos (ZHANG et al, 2006).

Após a invasão da célula pela forma taquizoíta do parasito o mesmo começa a multiplicar-se rapidamente, e dissemina-se pelo corpo do hospedeiro. Os taquizoítos que chegam ao estômago são destruídos pelo suco gástrico em poucos minutos, o que os torna infectantes apenas ao penetrarem pelas mucosas. No entanto, as formas císticas permanecem viáveis no suco gástrico (JACOB et al., 1960) liberando respectivamente esporozoítos e bradizoítos na luz do intestino, estes penetram no epitélio intestinal do hospedeiro e passam para o estágio de taquizoítos (KAWAZOE et al., 2001; KASPER et al., 2004), iniciando então o ciclo assexuado do parasito e levando a uma infecção sistêmica. Nesta ocorre o parasitismo em vários tecidos do hospedeiro e nos hospedeiros imunocomprometidos ou imunoimaturos, gerando uma infecção aguda disseminada (BARRAGAN et al., 2002).

Com o começo da resposta imune, a fase proliferativa de taquizoíto é substituída pela forma latente de bradizoítos, formando um cisto que pode se localizar no sistema nervoso central (SNC) e no tecido muscular, onde aparentemente não provocam danos e podem

permanecer em estado de latência por muitos anos (STROEHLE et al., 2005). Se o indivíduo, por algum motivo torna-se imunodeprimido estes cistos teciduais servem como um reservatório da doença podendo levar a uma infecção local ou disseminada. A maioria dos casos de reativação da doença são representados por encefalites ou retinocorióidites. (KIM & WEISS, 2008).

Ciclo de Vida do *Toxoplasma gondii*



2.2. PATOGENIA E PREVALÊNCIA

2.2.1 TOXOPLASMOSE

Embora a toxoplasmose seja uma doença amplamente disseminada, as taxas de soropositividade variam entre as diferentes regiões do globo (DUBEY & BEATTIE, 1998). As taxas de soprevalência sofrem variações de acordo com os hábitos sócio-culturais, fatores geográficos, rota de transmissão climática e se elevam com o aumento da idade. (COELHO et al, 2003). Esta variabilidade de freqüência da infecção no mundo, também pode ser avaliada baseando-se na procedência do indivíduo; se oriundos de zona urbana ou rural. (AMENDOEIRA, et al. 2003).

Também é sabido que, em regiões tropicais ou subtropicais de clima úmido a prevalência é mais elevada, pois este tipo de clima favorece a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente (BACCARIN & OLIVEIRA, 2007).

No Brasil, estudos relatam que 20 a 90% da população adulta é soropositiva para o *T.* gondii, este valor varia conforme as regiões do país sendo encontradas valores de 82% de prevalência no Rio Grande do Sul, 42% em São Paulo, 50% na Bahia(ABREU et al, 1987), 66% no Paraná (GARCIA et al, 1999b) e no Recife a soropositividade varia de 64% em mulheres a 79% em homens. (COELHO et al, 2003).

Na Polônia, a taxa de soropositividade encontrada no final da década de 90 era de cerca de 60% na população adulta (MALGORZATA, 1999). Na Espanha, a prevalência de anticorpos IgG encontrada em gestantes foi de 38,8%, sendo em 1,2% dos casos encontrada a imunoglobulina IgM. Nos Estados Unidos, a prevalência de anticorpos IgG foi de 40% (SERVER et al 1998), na Finlândia foi 20,3% (LAPPALAINEM et al, 1995), na França 87,7% (RODIER et al, 1995), na Suécia foi de 46,1% para esta mesma imunoglobulina, já para anticorpos do tipo IgM foi de 1,7% (JACQUIER et al, 1995).

A patogenia na espécie humana depende de vários fatores, dentre eles temos: a virulência da cepa parasitária, resistência do hospedeiro e a forma pela qual o indivíduo adquiriu a infecção. (BACCARIN & OLIVEIRA, 2007).

A infecção pelo *T. gondii* em humanos é muito comum e pode ser adquirida congenitamente ou na fase pós-natal (HAVELAAR, 2007), normalmente ela ocorre de maneira assintomática (GARCIA et al., 1999a; BEGHETTO et al., 2003), exceto em duas condições: em indivíduos com o sistema imune deprimido e em mulheres que adquirem a primo-infecção por *T. gondii* durante a gestação, a transmissão congênita (GARCIA et al.,1999a). Em cerca de 20% dos casos de toxoplasmose, a infecção aguda é acompanhada por lifadenopatia febril, astenia e linfomonocitose, com o curso da infecção sendo auto-limitado (YAZAR et al., 2004).

Em pacientes imunocomprometidos (pacientes com neoplasias, doença do tecido colagenoso, pacientes transplantados fazendo uso de terapia de imunossupressão, ou pacientes com deficiência renal fazendo uso de hemodiálise), especialmente aqueles com deficiência na imunidade celular, ocorre o risco de reagudização e disseminação da fase crônica da doença, o que pode levar a um quadro fulminante, havendo uma predileção do parasito pelo sistema nervoso, com encefalopatia difusa, meningoencefalite ou acúmulo de lesões cerebrais. (YAZAR et al, 2004). Altas taxas de soropositividade foram encontradas por Yazar et al, 2004, ao pesquisarem a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes portadores de neoplasias. Em indivíduos imunodeprimidos portadores do vírus do HIV e de infecção crônica por *T. gondii*, o risco estimado de reativação a nível de sistema nervoso central por *T. gondii* varia de 12 a 47%. (BORGES & FIGUEIREDO, 2004).

A infecção que ocorre durante a gestação pode ser transmitida ao feto através da placenta, causando danos graves tais como nascimento pré-maturo, danos neurológicos permanentes ou danos visuais. A idade gestacional é de fundamental importância na definição

da conduta a ser aplicada no tratamento da gestante que soroconverteu durante este período, pois a taxa de transmissão para o feto é maior com o avanço da idade gestacional, já a gravidade para o feto diminui com a infecção ocorrendo em uma fase mais avançada de gestação. (BEGHETTO et al., 2003).

Se a infecção ocorrer durante o primeiro trimestre de gestação pode levar a morte fetal. No segundo trimestre, pode ocasionar a chamada tétrade de Sabin, em que o feto apresenta hidrocefalia, com macro ou microcefalia (em 50% dos casos), retinocoróidite (em 90% dos pacientes com infecção), calcificações cerebrais (em 69%) e retardo mental ou perturbações neurológicas (em 60% dos casos). O recém-nascido também pode apresentar lesões iniciais como nódulos miliares disseminados por todo o encéfalo, ou em torno de focos necróticos, os ventrículos cerebrais podem estar dilatados e as lesões cerebrais podem se calcificar. Do mesmo modo, outras alterações oculares ainda podem acontecer, como graus variáveis de degeneração e edema de retina, lesões vasculares da coróide, neurite óptica, microftalmo, nistagmo, estrabismo, entre outras. Entre as manifestações neurológicas podem ser citadas as perturbações psicomotoras, convulsões, opistótono, etc. As crianças que sobrevivem à toxoplasmose congênita são, na maioria das vezes, mentalmente retardadas (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005).

A terapia pré-natal da toxoplasmose gestacional é, geralmente, considerada efetiva para reduzir a incidência das manifestações clínicas em crianças infectadas e diminuir a transmissão vertical. (BEGHETTO et al., 2003).

A maioria das infecções congênitas em recém-nascidos não apresentam sinais clínicos, mas estes indivíduos podem, com o passar do tempo, desenvolver sintomatologia, o que pode ser prevenido com o tratamento precoce da doença (NIELSEN et al., 2005).

2.2.2. TOXOPLASMOSE OCULAR

O *T. gondii* é responsável por 30 a 50% dos casos de uveítes no mundo em indivíduos imunocompetentes(VILLARD, 2003). No entanto, estudos indicam que não somente estes pacientes tem desenvolvido a forma ocular da toxoplasmose, como também esta manifestação da doença tem crescido nestes pacientes sem nenhum comprometimento imune (NUSSENBLATT & BELFORT, 1994, RONDAY et al., 1995). No Brasil, o *T. gondii* é o agente etiológico mais freqüente nas uveítes de localização posterior na população humana. (GARCIA et al, 1999a). A toxoplasmose ocular pode ser uma complicação tanto da infecção aguda pelo *T. gondii*, como da infecção crônica reativada. (MASUR, et al 1978; MONTOYA & REMINGTON, 1996). Na França, são realizados estudos de rastreamento de soroconversão em mulheres em período gestacional. Nos casos positivos, são realizados tratamentos pré-natais e pós-natais, o que tem levado a uma diminuição dos casos de toxoplasmose congênita grave. (VILLARD, 2003). Este tipo de rastreamentos é também realizado na Áustria, além de pilotos na Finlândia, Noruega, algumas partes da Suécia e da Alemanha. A partir de 1989, este sistema foi adotado no sul do Brasil a fim de pesquisar não só doenças infecciosas, como também doenças como a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congênito (NETO, 2000).

O principal risco para crianças com infecção congênita subclínica é a retinocorióidite, incidente em aproximadamente 85% dos casos não tratados e geralmente ocorre durante os primeiros anos da infância (VILLARD, 2003). A retinoróidite toxoplásmica parece ser mais comum e mais grave no Brasil do que na Europa e na América do Norte, pois no Brasil esta representa uma das principais causas de cegueira, o que não corresponde a dados obtidos nas outras regiões citadas. O risco de desenvolvimento da retinocoróidite na população portadora de infecção pós-natal vai de 2% no Nordeste brasileiro a 25% no Sudeste do país. (GILBERT et al, 2008).

A retinocoróidite causa lesões cicatriciais na retina, podendo levar a perda da função visual. Uma vez a cicatriz estabelecida, ela permanecerá pelo resto da vida. Lesões

recorrentes ao redor da cicatriz são comuns e podem agravar a deficiência visual. (GÓMEZ-MARIN et al, 2000).

A retinite estabelecida pela presença do parasito associa-se a manifestações inflamatórias de magnitude variável e podem envolver diversas partes do olho produzindo vasculites, vitreítes, coroidites e uveítes anterior. (DODDS, 2003)

A vasculite pode afetar artérias e veias, como também os vasos adjacentes à lesão e toda a circulação retinal. Alguns pacientes tratados nunca desenvolvem vitreítes, já outros chegam a apresentar vitreítes graves ao ponto de ser necessária uma vitrectomia. Ao ocorrer o desprendimento do humor vítreo induzido pela inflamação é possível visualizar precipitados inflamatórios por trás do mesmo. Este é um achado comum na toxoplasmose ocular. (DODDS 2003).

2.3. DIAGNÓSTICO

2.3.1 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

ANGELOV et al, em meados da década de 50, detectaram pela primeira vez em humanos por meio de testes sorológicos e alergológicos a toxoplasmose. Arnaudov (1971, 1973) investigaram a prevalência de toxoplasmose entre animais domésticos por reação de fixação do complemento, teste de hemaglutinação passiva, teste de microprecipitação em ágar, etc. (PREZELOV et al, 2008).

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser estabelecido por testes sorológicos, amplificações de sequências de ácidos nucléicos (reação em cadeia de polimerase – PCR), demonstrações do parasito ou de seus antígenos em cortes histológicos (técnica de imunoperoxidase), ou por isolamento do organismo. Outros métodos usados raramente incluem demonstração de antigenemia e antígeno em soros e outros fluídos corporais, um

teste cutâneo de toxoplasmina e transformação linfocítica antígeno específica. (MONTOYA, 2002).

Classicamente, o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito. (CANTOS, 2000). Existem muitas técnicas de diagnóstico sorológico disponível no mercado: o método de Sabin- Feldman, a hemaglutinação indireta, o teste de imunofluorescência indireta, o teste de aglutinação de látex, o teste imunoenzimático (ELISA) e o teste de captura (HILL & DUBEY, 2002).

O diagnóstico da infecção aguda depende da detecção da imunoglobulina G (IgG) específica e de imunoglobulinas M (IgM) , mas mesmo com a identificação destes anticorpos, não é possível determinar o tempo de infecção com acurácia (BEGHETTO, 2003, SUZUKI, 2001). Medidas de avidez de IgG específica mostraram-se como melhores ferramentas, em combinação com a análise da IgM, para determinação do início da infecção (ROBERTS et al, 2000; PELLOUX et al, 1998). A afinidade funcional dos anticorpos IgG específicos é inicialmente baixa após o contato primário com o antígeno e aumenta durante as semanas e meses subsequentes pela seleção de células B antígeno induzidas. Alguns pacientes permanecem com avidez baixa, mesmo após muitas semanas, o que enfatiza a necessidade de melhoramento da técnica. (PELLOUX et al, 1998; BEGHETTO, 2003). A avidez dos anticorpos IgG é considera alta quando é maior que 35%, conforme dados indicativos de fase crônica. A baixa avidez de anticorpo IgG , ou seja, menor que 30%, é indicativo de fase aguda. (RIBEIRO et al, 20008)

A IgM anti- *T. gondii* tende a desaparecer, mas há casos que esta pode permanecer em baixos títulos por um longo período de tempo, o que dificulta a interpretação do diagnóstico sorológico da fase aguda. Nestes casos a IgM que permanece é chamada de IgM residual e corresponde a fase crônica da doença. (RIBEIRO et al, 2008). Também existem caso de reações de pesquisa de IgM onde seu resultado aparece falsamente negativo ou falsamente

positivo, no primeiro caso, geralmente ocorre inibição competitiva de anticorpos do tipo IgG. Já nos casos falsamente positivos, geralmente ocorre a interferência de fatores reumatóides contidos no soro. Para ambos os casos, existem tratamentos que podem ser aplicados a amostra evitando estas reações inespecíficas. (LOON et al, 1983).

A infecção aguda também pode produzir a imunoglobulina A (IgA), no caso da infecção ter sido transmitida por via oral (CANTOS, 2000)e a imunoglobulina E (IgE). (VILLENA et al, 1999). Estudos também indicam que os anticorpos IgA, IgM e IgE podem ser detectados em casos de infecções recorrentes (GOMÉZ-MARIN, et al 2000).

Desde o ano de 1980 quando foi desenvolvida a técnica de PCR a biologia molecular sofreu grandes avanços e hoje, este tipo de reação é frequentemente utilizada para detecção do DNA do *T. gondii* em amostras clínicas. A reação de PCR detecta diretamente o parasito e o resultado não depende do status imunológico do paciente. (EDVINSSON, 2006).

Mas, apesar desta técnica vir sofrendo modificações e aperfeiçoamentos, existem na literatura relatos de pacientes IgM-negativos com PCR positivas, o que leva a uma desconfiança de falsa positividade ou de se considerar parasitemia na fase crônica da doença. São referidos também inúmeros casos de PCR positivas em pacientes assintomáticos e o valor preditivo da técnica é desconhecido. Estes fatos levam a crer que a técnica ainda encontra-se em fase de padronização, o que ainda torna a sorologia o método de escola no diagnóstico da toxoplasmose (KOMPALIC-CRISTO et al, 2005).

2.3.2. DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE OCULAR

O diagnóstico da infecção ocular toxoplásmica é baseado em achados oftalmológicos. Os achados típicos são uma área de necrose focal retiniana e edema na coróide, sendo a lesão ativa frequentemente localizada próxima a cicatriz pigmentada. (DODDS, 2003; VILLARD et

al, 2003). No entanto, lesões atípicas também ocorrem e nestas, a origem toxoplásmica somente será comprovada com a aplicação de testes laboratoriais, ou após uma resposta positiva ao tratamento específico (VILLARD et al, 2003).

As técnicas laboratoriais utilizadas são aplicadas com amostras obtidas a partir do humor aquoso ou do humor vítreo por ELISA (Enzyme-lynked immunosorbent assay), immunobloting ou amplificações de genes. Estas técnicas possuem sensibilidade bem estabelecida, mas ainda possuem uma especificidade questionável. (VILLARD et al, 2003)

Os métodos sorológicos, embora sejam a alternativa utilizada para diagnosticar os casos inconclusivos, também possuem as suas limitações. Altos títulos, ou títulos em crescimento do anticorpo IgG podem ser considerados satisfatórios na diferenciação entre a infecção recente e a infecção tardia, principalmente se esse diagnóstico foi reproduzido por mais de uma técnica. No entanto, este aumento de anticorpos IgG nem sempre é observado em paciente recidivantes, especialmente em crianças mais velhas ou adolescente com manifestações oculares de ordem congênita. Interpretações de padrões de outras imunoglobulinas também apresentam suas limitações, como a IgM, que pode estar presente por alguns anos no paciente de forma residual, (PAUL, 1999) como foi observado recentemente em um trabalho de RIBEIRO et al em 2008.

Uma alternativa que vem sendo utilizada na pesquisa da toxoplasmose ocular é a identificação da IgA intraocular (GARWEG, 2000). Estes anticorpos elevam-se quase simultaneamente aos anticorpos IgM, entretanto, desaparecem da circulação em 6 a 7 meses após a infecção, sendo considerado um bom marcador de fase aguda (AMENDOEIRA, 2001). Nos dois primeiros meses após a infecção o anticorpo IgE também pode ser observado, em altas concentrações, declinando rapidamente até não ser mais detectado após um período de 4 meses, mostrando uma produção mais curta que a IgM e a IgA (AMENDOEIRA, 2001; COUTO et al., 2002).

2.4. PESQUISA DE NTPase

Uma potente Hidrolase Nucleosídeo Trifosfato (Nucleoside Triphosphates Hydrolase – NTPase) com um grande número de propriedades incomuns foi relatada na forma taquizoíta do protozoário *Toxoplasma gondii* na década de 80 por Asai e colaboradores. Esta enzima fica localizada no citosol do parasito e constitui de 3 a 4% do total de proteínas citosólicas encontradas no mesmo. Possui peso molecular de 240 a 260 kDa e contém quatro subunidades equivalentes. Purificada, a NTPase tem um peso molecular de 63kDa por SDS-PAGE. (ASAI, T. et al, 1983)

Esta enzima tem sido considerada um dos maiores antígenos do taquizoíto de *T. gondii,* (ASAI, T. et al, 1983) bem como parece ser um dos maiores antígenos estimuladores da resposta imune durante a forma aguda da infecção toxoplásmica. (ASAI, T. et al, 1992).

A NTPase parece ser uma enzima "adormecida" que se ativa em determinadas condições e em presença do composto ditiol. Após esta fase de ativação, a NTPase catalisa hidrolases de nucleosídeos trifosfatos e nucleosídeos difosfato. A potência hidrolítica total do ATP motivada pela NTPase em uma célula do taquizoíto da cepa RH é evidente e sua atividade é 370 a 19000 vezes mais alta neste do que em outros protozoários. (ASAI & SUZUKI, 1990).

O tratamento com compostos ditiol, tais como o composto ditiolreitol (DTT) é essencial para ativação da enzima *in vitro*, A NTPase possui 2 isoformas, a NTPase I e a NTPase II, as quais diferem entre si por suas propriedades cinéticas. A NTPase I tem pouca ação hidrolítica contra nucleosídeos difosfato tais como o ADP, enquanto que a NTPase II possui igualmente grande atividade com nucleosídeos difosfato e nucleosídeos trifosfato.(ASAI, et al., 1995). Cepas avirulentas de *T. gondii* possuem somente a NTPase de

tipo II, enquanto que cepas virulentas apresentam os dois tipos de NTPase. (JOHNSON et al, 2003).

A NTPase tem sido conhecida como um potente antígeno imunodominante em camundongos e humanos (ASAI, T. et al, 1992). .Pesquisas relatam a presença de alta correlação entre títulos de anticorpos IgG contra níveis de NTPase em pacientes com a forma aguda da toxoplasmose, detectados pelo teste de Sabin- Feldman e pelo teste de ELISA. Uma vez que as NTPases expressam-se fracamente no bradizoíto, a resposta do anticorpo à NTPase de um paciente crônico é supostamente fraca. (NAKAJIMA-NAKANO, 2000).

2.5. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais são proteínas que possuem elevadas especificidade e sensibilidade em suas reações, ligando-se a sítios específicos nas moléculas-alvo tornando-se reagentes de importância central na pesquisa biológica moderna, incluindo a análise e o tratamento da doença humana (KÖHLER & MILSTEIN, 1975). A produção de anticorpos monoclonais exige a imortalização dos esplenócitos pela fusão somática células derivadas do mieloma múltiplo (hibridoma). Estes hibridomas podem prodzir anticorpo monoclonais durante anos, mas na sua produção existe um grande risco de contaminação, o que leva a necessidade de um freqüente mecanismo alimentador celular que pode ser instável. (HARLOW & LANE, 1998)

3.0. OBJETIVOS

3.0. OBJETIVOS

O trabalho se propõe a testar o anticorpo monoclonal 2F12 anti- NTPase em lágrimas de indivíduos com toxoplasmose ocular clinicamente ativa, como uma ferramenta para o diagnóstico laboratorial diferencial da uveíte por *T.gondii.*

4.0. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.0. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo analítico de caso-controle, onde foram estabelecidos critérios diagnósticos.

4.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram utilizados na pesquisa dois grupos de pacientes; sendo um deles composto com indivíduos controle (sem sinais e sintomas da toxoplasmose) e outro grupo formado por indivíduos doentes em fase ativa da doença, portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *T. gondii* (UPAPT) na forma clássica – padrão ouro.

4.2.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Casos: Foram definidos como pacientes da pesquisa os indivíduos portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *T. gondii* na forma clássica, maiores de 10 anos, atendidos no Hospital das Clínicas (HC), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), provenientes do Estado de Pernambuco, no período de janeiro a outubro de 2008.

Controles: Foram utilizados pacientes sem histórico nem lesões oculares sugestivas de toxoplasmose.

4.2.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo aqueles indivíduos que informaram fazer uso de imunossupressores ou corticóides nos últimos dois meses, bem como aqueles que referiam ser portadores de SIDA ou transplantados.

4.3. FORMAÇÃO DOS GRUPOS

4.3.1. GRUPO CONTROLE

Este grupo foi formado por 20 indivíduos controles sem histórico nem lesões oculares sugestivas de toxoplasmose. Estas amostras fazem parte do banco de amostras do laboratório de Imunologia do LIKA/ UFPE. Os pacientes eram não portadores de UPAPT, todos apresentaram IgM negativa e e IgG positiva em baixos títulos, exceto 2 pacientes que apresentara IgG negativa.

4.3.2. GRUPO CASO

Este grupo foi formado por 21 amostras de pacientes maiores de 10 anos, atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Eram pacientes provenientes do Estado de Pernambuco, estes foram atendidos no período de janeiro a outubro de 2008. Foram excluídos do estudo aqueles indivíduos que informaram fazer uso de imunossupressores ou corticóides nos últimos dois meses, bem como aqueles que referiam ser portadores de SIDA ou transplantados.

Na seleção dos pacientes portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *T. gondii* para este estudo só foi considerada a forma clássica da doença, padrão-ouro, que pode ser definida pela presença de lesões cicatrizadas, de margens bem definidas, graus variáveis

de hipertrofia do epitélio pigmentar da retina e atrofia retinocoroidea, acompanhadas de lesão satélite em atividade inflamatória e vitreíte, presença ou não de vasculite retiniana, com ou sem comprometimento das estruturas do pólo anterior (GARWEG, 2005; ORÉFICE et al 2000, VASCONCELOS et al, 2009).

Nestes pacientes também foram realizados testes de imunofluorescência para diagnosticar a presença de IgM anti- *T. gondii* positiva e IgG anti- *T. gondii* positiva .

4.4. COLETA DAS AMOSTRAS

Após o exame clínico, foi realizada a coleta da amostra da lágrima utilizando fita de papel filtro nº. 4A, marca Toyo®, de 5.0cm de comprimento e 0,5cm de largura, previamente esterilizado. O papel foi dobrado 0.5cm antes da porção proximal, para ser inserido no terço externo da pálpebra inferior, sinalizando o extremo terminal, correspondente ao dedo do examinador. Tal precaução teve por objetivo facilitar a extração posterior da lágrima no laboratório. Quando a coluna de lágrima molhou no mínimo 3.0cm da fita de papel, a mesma foi retirada e colocada em papel não absorvente, sendo imediatamente refrigerada em reservatório apropriado para transporte. Todos os pacientes tiveram lágrimas coletadas de ambos os olhos separadamente.

4.5. EXPANSÃO DO HIBRIDOMA E PURIFICAÇÃO DE ACMO-2F12 ANTI-NTPase DE *Toxoplasma gondii*

O anticorpo utilizado neste estudo é uma imunoglobulina do isotipo IgA. O processo de hibridização foi realizado em colaboração com a Universidade de Medicina de Chiba – Japão, pelo Dr. Masashi Kobayashi e mantidos em nitrogênio líquido, no setor de Imunologia do LIKA-UFPE.

4.5.1. DESCONGELAMENTO E EXPANSÃO DO HIBRIDOMA

O hibridoma foi retirado do nitrogênio líquido e descongelado em banho-maria a 37ºC por aproximadamente por 2 minutos, em um processo rápido de descongelamento. O material foi levado ao fluxo laminar e, em um tubo estéril contendo 10 mL de meio de cultura de descongelamento, o líquido contendo o hibridoma foi gotejado aos poucos. Para cada 10 mL do meio foi adicionado 1,2 mL de material celular. O tubo contendo meio de descongelamento e as células foi centrifugado a 900 rpm durante 6 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de meio de cultivo. Dessa suspensão retiraram-se alíquotas com um número de, no mínimo, $1x10^6$ células e iniciou-se o repique celular em garrafas contendo meio de cultivo, até se obter a quantidade de célula de pelo menos 1×10^9.

4.5.2. PURIFICAÇÃO DO ACMO 2F12

O processo de purificação do anticorpo monoclonal foi realizado utilizando a técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), para isto se fez uso de uma coluna cromatográfica do tipo Mono S® HR 5/5 (PHARMACIA) e foi desenvolvida uma purificação utilizando-se de gradiente de concentração de sais. O protocolo de purificação foi montado seguindo-se as especificações técnicas da coluna.

4.6. TESTE DE DOT BLOT PARA TOXOPLASMOSE OCULAR

A padronização do teste de dot-blot foi realizada utilizando amostras lágrimas dos casos e controles. As amostras de lágrimas foram aplicadas a 15 µL em membranas de nitrocelulose (BIORAD – Trans – Blot 0,45 µm) e incubadas por 18 horas a 4º C. Após bloqueio com TBS-BSA 1% durante 1 hora, aplicou-se o AcMo-2F12 durante mais 1 hora para captura do antígeno, seguindo esta etapa foi aplicado o anticorpo anti- camundongo polivalente produzido em cabra (SIGMA) conjugado a biotina e incubado durante 1 hora, e, seguidamente aplicou-se o complexo AVIDINA-PEROXIDASE (SIGMA) por mais 1hora. Para a revelação da reação utilizou-se o sistema 0,3% DAB+H_2O_2 a 0,05%. A aplicação dos reagentes foi sempre precedida de 3 lavagens com TBS-Tween 0,05%. Foram também utilizadas amostras com "Brancos", que correspondeu a aplicação de tampão bloqueador em substituição a aplicação de amostras, mas nas demais etapas foram aplicados os mesmos reagentes utilizados nas membranas que continham amostras de pacientes. As amostras consideradas positivas foram aquelas que levaram a formação de uma circunferência escurecida no meio da membrana. Nas membranas com amostras negativas não havia essa circunferência.

4.7. ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise dos dados foram verificadas a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo obtidos com os resultados do teste, considerando uma prevalência local de 45% de uveítes por toxoplasmose, visto que existem relatos de uma prevalência de 30 a 60% de retinocoroidites por *T. gondii* no nosso meio (KAWAZOE, 2001). Também foram realizados testes estatísticos de Fisher e odds ratio, utilizando-se o programa estatístico Graphpad Instat 3.05.

Os cálculos dos valores preditivos seguiram o teorema de Bayes das probabilidades condicionais. Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$VPP = \frac{\text{SENSIBILIDADE x PREVALÊNCIA DE DOENTES}}{\text{(SENSIBLIDADE x PREVALÊNCIA) + (1 – ESPECIFICIDADE) x (1 – PREVALÊNCIA)}}$$

$$VPN = \frac{\text{ESPECIFICIDADE x PREVALÊNCIA DE NÃO DOENTES}}{\text{(ESPECIFICIDADE x PREVALÊNCIA) + (1 – SENSIBILIDADE) x (1 – PREVALÊNCIA)}}$$

4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – CEP/CCS/UFPE com o registro N° 387/07 (ANEXO 1). Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1).

5.0. ARTIGO

APLICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL 2F12 NA PESQUISA DE ANTI-NTPase EM LÁGRIMAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE TOXOPLASMOSE OCULAR EM RECIFE – PE.

Narjara Lopes de Melo[1], Mirelle Souza LeãoVasconcelos[2], Luiz Felipe Lynch[2], Maria Isabel Lynch[2], Wheverton Ricardo C. do Nascimento[1], Rodrigo Santana do Nascimento[1], Silvana Ferreira[3], Elizabeth Malagueño[1*]

[1]Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco-LIKA/UFPE - Brasil.

[2]Setor de Oftalmologia do Hospital das Clínicas (HC) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil.

[3]Universidade de Pernambuco (UPE)- Brasil

Elizabeth Malagueño de Santana

Campus Universitário, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil. CEP: 50670-901.

Tel.: + 55 81 2101 2515; Fax: + 55 81 2126 8485.

E-mail: malagueno@nlink.com.br

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* possui a enzima NTPase que está presente na forma taquizoíta do protozoário e vem sendo apontada como um antígeno fundamental do parasito. Foram analisados 21 pacientes portadores de toxoplasmose ocular ativa a fim de identificar a capacidade do anticorpo monoclonal 2F12, produzido contra a NTPase do parasito, para diagnosticar a presença da referida enzima, o que confirmaria a fase ativa da doença. A técnica utilizada foi a de dot blot, imobilizando a lágrima no filtro de nitrocelulose e posterior incubação com 2F12 Mab. Os resultados obtidos na análise das 41 amostras de lágrimas, revelaram uma sensibilidade de 95,27%, especificidade 55%, valor preditivo positivo de 63,31% e valor preditivo negativo 90,48%. Obtivemos pelo teste de Fisher um valor de p=0,0005 e odds ratio de 21,444 (I.C. de 95%: 2, 726 a 219,21). Os resultados demonstraram forte associação entre a presença de NTPase na lágrima, detectada pelo AcMo 2F12 e a toxoplasmose ocular ativa.

Palavras Chave: Toxoplasmose ocular, NTPase, Anticorpo monoclonal, Diagnóstico

ABSTRACT

Toxoplasma gondii tachyzoites contain a potent NTPase enzyme that it has become pointed as a very important antigen of the parasite. This study investigated the presence of NTPase in the tears of active posterior uveitis induced by *T. gondii* patients (APUPT) using the 2F12 monoclonal antibody, produced against the NTPase parasite portion, in order to associate the presence of the cited enzyme, as a marker of the active illness and to confirm the usefulness of the antibody for human ocular toxoplasmosis diagnosis The NTPase determination was accomplishment by dot blot test immobilizing the samples tears in nitrocellulose filters and

followed by 2F12 Mab. The results obtained in the analysis of 21 patients and 20 normal controls, showed a sensitivity of 92,57%, specificity 55%, positive predictive value 63,31% and negative predictive value 90,48%. Fisher's test demonstrate association between NTPase in APUPT patients and healthy controls (p=0,0005) and odds ratio associate studies was21,444 (C.I. 95%:2, 726 a 219,21). The results show strong, association between NTPase in tears, detected by 2F12 monoclonal antibody and active ocular toxoplasmosis.

Key words: OcularToxoplasmosis, NTPase, monoclonal antibody, Diagnosis

INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário cosmopolita que pode ser a causa de infecção em animais ou humanos. (ASAI 1982; KIKUCHI et al. 2001; FERGUNSON 2004). Estima-se que um terço da população adulta seja reativa para esta parasitose (KLOTZ et al.2000). A soropositividade para anticorpos antitoxoplasma é alta em todo o mundo. No Brasil, estudos relatam que 20 a 90% da população adulta é soropositiva para o *T. gondii*, este valor varia conforme as regiões do país sendo encontradas valores de 82% de prevalência no Rio Grande do Sul, 42% em São Paulo, 50% na Bahia, 66% no Paraná (LYNCH et al. 2004 , LYNCH et al. 2008) e no Recife a soropositividade varia de 64% em mulheres a 79% em homens. (COÊLHO et al. 2003).

Classicamente, o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasito. (SUZUKI, 2000, CANTOS et al.2000; RIBEIRO et al, 2008). Na fase ativa ou aguda da infecção pelo *T. gondii*, ocorre a produção de imunoglobulina M (IgM), a presença de anticorpos deste tipo caracterizam esta fase, eles perduram na circulação por cerca de 2 semanas após o início da infecção. Logo depois do início da fase aguda, ocorre o

começo da produção de imunoglobulina G (IgG).A utilização do teste que mede a avidez da IgG tem se mostrado uma boa ferramenta em combinação com a análise da IgM na determinação de quando a infecção ocorreu. (BEGHETTO et al. 2003; ROBERTS et al.2001, PELLOUX et al.1998). Porém, alguns pacientes permanecem com avidez baixa, mesmo após muitas semanas, o que enfatiza a necessidade de melhoramento da técnica. (PELLOUX et al. 1998; BEGHETTO 2003).

O diagnóstico da toxoplasmose ocular, caracterizada frequentemente por uveítes de localização posterior, se baseia nos achados clínicos oftalmológicos. Os ensaios laboratoriais sorológicos possuem apenas a capacidade de responder se o indivíduo anteriormente teve contato com o parasito, porém não confirmam o diagnóstico da doença ativa (GARWEG 2005).

A evidenciação do parasito pela pesquisa de antígeno ou segmentos de DNA é de alto valor diagnóstico (CAMARGO 1996). Desde o ano de 1980 quando foi desenvolvida a técnica de PCR a biologia molecular sofreu grandes avanços e hoje, este tipo de reação é frequentemente utilizada para detecção do DNA do *T. gondii* em amostras clínicas. A reação de PCR detecta diretamente o parasito e o resultado não depende do status imunológico do paciente. (EDVINSSON, 2006).

Apesar de esta técnica vir sofrendo modificações e aperfeiçoamentos, existem na literatura relatos de pacientes IgM-negativos com PCR positivas, o que leva a uma desconfiança de falsa positividade ou de se considerar parasitemia na fase crônica da doença. São referidos também inúmeros casos de PCR positivas em pacientes assintomáticos e o valor preditivo da técnica é desconhecido. Estes fatos levam a crer que a técnica ainda encontra-se em fase de padronização, o que ainda torna a sorologia o método de escola no diagnóstico da toxoplasmose (KOMPALIC-CRISTO et al. 2005). A utilização de anticorpos monoclonais

tem se mostrado útil para identificação, purificação e caracterização de antígenos de *T.gondii* (BRÉGANO 1994).

Em trabalho realizado por Gargew et al. (1998) avaliaram o humor aquoso e soro de 27 pacientes portadores de toxoplasmose ocular com testes de detecção de anticorpos, PCR e teste de avidez de IgG e concluíram que nenhum dos métodos foi o suficientemente sensível para estabelecer o diagnóstico da doença, mas a combinação dos quatro métodos atinge uma sensibilidade aceitável para justificar a análise do humor aquoso como método rotineiro.

A Hidrolase Nucleosídeo Trifosfato (Nucleoside Triphosphates Hydrolase – NTPase) que está presente na forma taquizoíta do protozoário *Toxoplasma gondii* localiza-se no vacúolo parasitófago do parasito e constitui de 3 a 4% do total de proteínas citosólicas encontradas no mesmo. Estudos sugerem que a NTPase esteja envolvida em processos de alto teor energético e de papel central na replicação e sobrevivência do parasito. A NTPase tem sido considerada um dos maiores antígenos do taquizoíto de *T. gondii,* (ASAI, T. et al, 1983) bem como parece ser um dos maiores antígenos estimuladores da resposta imune durante a forma aguda da infecção toxoplásmica. (ASAI et al, 1992).

A NTPase possui 2 isoformas, (NTPase I e a NTPase II), as quais diferem entre si por suas propriedades cinéticas. Cepas avirulentas de *T. gondii* possuem somente a NTPase de tipo II, enquanto que cepas virulentas apresentam os dois tipos de NTPase. (JOHNSON et al. 2003).

Baseando-se nestes estudos, este trabalho propõe-se a testar um anticorpo monoclonal produzido contra a porção NTPase do antígeno de *T. gondii* como uma possível ferramenta diagnóstica laboratorial para toxoplasmose ocular.

PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo analítico de caso-controle, onde foram estabelecidos critérios diagnósticos.

Pacientes Utilizados

Grupo Caso: Vinte e um Indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 10 anos, portadores de uveíte posterior presumivelmente por toxoplasmose (UPAPT) padrão ouro (Lynch et al 2008), atendidos no serviço de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

Nestes pacientes foi determinada a IgG sérica anti- *T. gondii* através da técnica de imunofluorescência indireta assim como a IgAs na lágrima através do método de ELISA como descrito em Lynch (2004) .

Grupo Controle: Os controles foram formados por 20 indivíduos sem apresentação de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular, nem quadro clínico compatível com toxoplasmose sistêmica.

Coleta das amostra de lágrimas: As lágrimas foram coletadas em papel de filtro ,sem estímulo prévio seguindo o protocolo proposto por LYNCH et al 2004 e foram eluídas em tampão PBS de modo a produzir uma diluição de 1/10.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – CEP/CCS/UFPE com o registro N° 387/07 e só participaram do trabalho indivíduos ou responsáveis que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após a explicação da pesquisa.

Anticorpo monoclonal (AcMo-2F12)

O hibridoma do anticorpo monoclonal (AcMo) anti - NTPase de Toxoplasma gondii (clone 2F12) utilizado na pesquisa foi cedido pelo Prof. Dr. Masashi Kobayashi da Universidade de

Medicina de Chiba – Japão . O hibridoma foi descongelado e expandido e foi realizada a sua purificação pela técnica de HPLC utilizando-se gradiente de concentração de sais em uma coluna do tipo Mono S® HR 5/5 (PHARMACIA), o protocolo utilizado na purificação baseou-se nas especificações da coluna.

Teste de Dot Blot para Toxoplasmose Ocular

O teste de dot-blot foi realizado utilizando amostras de lágrimas dos casos e controles. Alíquotas de 15 µL das amostras de lágrimas eluídas dos papéis de filtro, foram incubadas em membranas de nitrocelulose (BIORAD- Trans Blot 0,45 µm), cortadas em pedaços de 1 cm2 e aplicadas em um suporte, para sensibilização destas por 18 horas a 4º C. Após bloqueio com TBS-BSA 1% durante 1 hora, aplicou-se 100 µL do anticorpo monoclonal 2F12 anti-NTPase incubando 1 hora para captura da NTPase. Anticorpo anti-camundongo Ig total conjugado a biotina, produzido em cabra (SIGMA) foi incubado durante 1 hora, após a que foi aplicado o complexo Avidina-Peroxidase (SIGMA) durante 1 hora. Para a revelação da reação imunoenzimática utilizou-se o sistema Diaminobenzidina a 0,3%+H_2O_2 a 0,05%. A positividade foi conferida visualmente por dois observadores. Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens com TBS-Tween 0,05% e a partir do bloqueio todas as reações foram incubadas a temperatura ambiente.

Análise de dados

Para a análise dos dados foram verificadas a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo obtidos com os resultados do teste, considerando uma prevalência local de 45% visto que existem relatos de uma prevalência de 30 a 60% de retinocoroidites por *T. gondii* no nosso meio (KAWAZOE, 2001). Também foram realizados

testes estatísticos de Fisher e odds ratio, utilizando-se o programa estatístico Graphpad Instat 3.05. Para os cálculos dos valores preditivos utilizou o teorema de Bayes das probabilidades condicionais. Os cálculos foram realizados tomando como base a tabela 2x2 representada na tabela 1.

RESULTADOS

O dot blot foi positivo revelando a presença de NTPase em 20 das amostras de pacientes e em 9 dos controles negativos.Os resultados obtidos na análise dos 41 pacientes, sendo 21 pacientes portadores de uveíte presumivelmente por *T. gondii* e 20 indivíduos controle, sem sinais da doença, revelaram uma sensibilidade de 95,27%, especificidade 45%, valor preditivo positivo de 63,31% e valor preditivo negativo 90,48%, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95% e a prevalência da forma ocular da doença na população de 50%, resultados expressos na tabela 2. Em análises realizadas pelo programa estatístico Graphpad Instat 3.05, obtivemos pelo teste de Fisher um valor de p=0,0005, considerado como significante todo valor de p<0,05 e odds ratio de 21,444, (considerando I.C. de 95%: 2, 726 a 219,21) usando-se aproximação de Woolf. Demonstrando forte associação entre a presença de NTPase na lágrima, detectada pelo AcMo 2F12 e a toxoplasmose ocular ativa. Todos os indivíduos considerados como caso apresentaram reação de fluorescência positiva para anticorpos séricos IgG em títulos que variam entre 1/16 e 1/712 (dois pacientes), sendo que destes, nove pacientes apresentaram níveis de IgG em títulos abaixo de 1/32. Todos apresentaram resultado negativo para IgM sérica. Dos pacientes negativos, 18 apresentaram IgG positiva em títulos baixos e 2 apresentaram IgG negativa.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da toxoplasmose ocular, apesar do que se tem estudado com relação ao assunto, ainda utiliza-se da detecção de características clínicas típicas da lesão como "padrão ouro". Na ausência destas características passa-se a utilizar ferramentas laboratoriais, as quais revelam a positividade de 50 a 80% dos casos verdadeiros positivos (GARWEG et al. 2004).

No diagnóstico laboratorial da doença muitos tipos de testes são utilizados na tentativa de detecção de anticorpos locais específicos anti-*T. gondii* (ELISA, immunoblotting, e técnicas de amplificações de genes). Embora as sensibilidades destes testes estejam bem estabelecidas, as suas especificidades ainda são questionáveis (VILLARD et al. 2003). Os resultados obtidos no presente estudo reforçam esta idéia, pois uma alta sensibilidade (95,27%) foi encontrada em detrimento da baixa especificidade (55%).

Resultados encontrados entre os distintos testes que são utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*T gondii* na toxoplasmose ocular são divergentes. Encontramos variações de sensibilidades de 2,3 a 75% e especificidades de 75 a 100% em estudos de PCR utilizando humor aquoso (GARWEG et al, 1996; BOU et al, 1999). Como também, sensibilidades ao redor de 70% e especificidade de 77% em análises utilizando a técnica de immunoblotting para IgG e IgA (GARWEG, 2004) e sensibilidade de 63% e especificidade de 89% em um estudo utilizando ELISA para IgG. (VILLARD et al. 2003).

Por outro lado, ensaios utilizando a técnica de ELISA em seção experimental em camundongos na pesquisa de IgG anti- NTPase em comparação com a Reação de Sabin-Feldman, que utiliza parasitos vivos (método considerado como "padrão ouro" como ferramenta laboratorial diagnóstico da toxoplasmose) detectaram uma alta correlação entre a detecção de altos títulos destes anticorpos entre ambos testes. (ASAI et al. 1992).

Vale-se ressaltar também que embora a análise de humor aquoso seja útil no diagnóstico de toxoplasmose ocular, a técnica de coleta torna sua utilização limitada pois se trata de um procedimento invasivo que, mesmo raramente, pode levar a complicações como sangramentos intra-ocultares, catarata, abscessos corneanos e até endoftalmite (CHEUNG et al. 2004).

Neste trabalho utilizamos como amostra biológica a ser estudada lágrimas de pacientes que foram coletadas pela técnica proposta por LYNCH et al. 2004, que mostrou-se uma técnica de coleta menos invasiva e de riscos desprezíveis.

Contrapondo-se aos estudos que utilizam outras técnicas imunodiagnóstica para detecção de casos de toxoplasmose ocular, a técnica de dot blot foi escolhida para este estudo. Esta metodologia foi escolhida por se tratar de uma técnica mais econômica, tanto por utilizar membrana de nitrocelulose como suporte para reação, como por não necessitar de equipamentos para leitura dos resultados, fato que traria uma vantagem em relação às outras técnicas em uso, que só podem ser realizadas em laboratórios com equipamentos específicos para obtenção da leitura das amostras.

O anticorpo monoclonal utilizado neste estudo foi previamente testado para análise da ocorrência de reações cruzadas com outros parasitos, apresentando resultado negativo em todas as reações a que foi submetido. Foram realizados testes contra antígeno da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, antígeno de *Ascaris lumbricoides*, antígenos de ovo e de verme de *Schistosoma mansoni* e antígeno de *Wuchereria bancrofti* porque estas são parasitoses comuns na região.

Todos os pacientes considerados como caso apresentaram elevados títulos de IgG detectados pela reação de imunofluorescência indireta, bem como alguns destes também apresentaram níveis elevados da produção de IgA secretória determinados por ELISA. Dentre os pacientes controle, alguns possuíam IgG anti- *T. gondii*, fato que não se repetia em todos

os indivíduos do grupo. A presença de um elevado número de resultados falso-positivos, como pode ser observado pelo valor encontrado no cálculo da especificidade (55%) representa um importante questionamento deste trabalho. Não foi possível neste momento, explicar porque existiu essa reação positiva em indivíduos sem lesão ocular, pois o AcMo 2F12 não reagiu quando exposto a antígenos de parasitos diversos, como descrito acima, o que derrubaria a hipótese de reação cruzada.

Tomando como base estes estudos anteriores, entende-se que o método desenvolvido por este grupo, que utiliza a técnica de dot blot para detecção de anticorpos anti-NTPase em amostras de lágrimas coletadas de forma não invasiva e apresentando sensibilidade de 95,27%, especificidade 55%, VPP de 63,31% e VPN de 90,48% pode ser utilizado como uma ferramenta diagnóstica para a detecção da toxoplasmose ocular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAI T, O´SULLIVAN W J, KOJIMA S 1983. A potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the Parasitic Protozoan Toxoplasma gondii. J. Biol. Chem. 258: 6816-6822.

ASAI T, MIZUNO F, KOJIMA S, TAKEUCHI T, KOBAYASHI A, SUZUKI Y 1992. High Correlation in Antibody Titers between the Sabin-Feldman Dye Test and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detecting Immunoglobulin G antibodies to the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii*. Jou. of Clinical Microb., 30:1291-1293.

BEGHETTO E, BUFFOLANO W, SPADONI A, DEL PEZZO M, CRISTINA M, MINENKOVA O, PETERSEN E, FELICI F, GARGANO N 2003. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Journal of clinical Microbiology, 41: 5414-5418

BELFORT JR R, HIRATA PS, ABREU MT 1978. Uveites: estudo de 250 casos consecutivos. Arq Bras Oftalmol 41: 196-199.

BOU G, FIGUEROA M S, MARTÍ-BELDA P, NAVAS E, GUERRERO A 1999. Value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis. Jou. of Clin. Mic., 37: 3465-3458.

BRÉGANO M S 1994. Caracterização antigênica de oito amostras de *Toxoplama gondii.* Londrina. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina.

CAMARGO M E 1996. Toxoplasmose. In: FERREIRA A.W & AVILA S L M, Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 165-174.

CANTOS G A, PRANDO M D, SIQUEIRA M V, TEIXEIRA R M 2000. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* e diagnóstico. Rev. Assoc. Med. Bras., 46:335-341.

CHEUNG CMG, DURRANI OM, MURRAY PI 2004. The safety of anterior chamber paracentesis in patients with uveitis. Br J Ophthalmol 88: 582-583.

COÊLHO A L, KOBAYASHI M, CARVALHO L B 2003. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**,** 45: 229-231.

EDVINSSON B 2006. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. Karolinska university press.1-58.

FERGUSON D J P 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stages conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int. Journal for parasitology, 34: 347-360.

GARWEG J G, GARWEG S D L, FLUECKIGER F, JACQUIER P, BOEHNKE M 2004. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M and E in cases of human ocular toxoplasmosis. Jou. of Clin. Mic.**,** 42:4593-4598.

GARWEG, J G, JACQUIER, P, FLUCKIGER F 1998. Current limits in diagnosis of ocular toxoplasmosis. Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde, 212: 330-333.

GARWEG J G 2005. Determinants of immunodiagnostic successin human ocular toxoplasmosis, Parasite Immunology, 27: 61**–**68.

GARWEG J M, BOEHNKE M, KOERNER F 1996. Restricted applicability of the polymerase chain reaction for the diagnosis of ocular toxoplasmosis. Ger. J. ophtamology, 5: 104-108.

GÓMEZ-MARIN J E, MONTOYA-DE-LONDOÑO M T, CANTAÑO-OSORIO J C, HEINE F A, DUQUE A M, CHEMIA C, AUBERT D, BONHOMME A, PINON J M 2000. Frequency of specific anti – *Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95: 89-94.

JOHNSON M, BROADY K, ANGELICI M C, JOHNSON A 2003. The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis. Microbes and Infection, 5: 797-806.

KAWAZOE U, 2001. Toxoplasmose. In: D P NEVES, A L MELO, P M LINARDI, R W A VITOR. Parasitologia Humana. Ed. Atheneu , São Paulo-SP, 10ª ed., p. 147-156.

KIKUCHI T, FURUTA T, KOJIMA S 2001. Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from *Toxoplasma gondii*. Parasitology, 122:15-23.

KLOTZ S A, PENN C C, NEGVESKY G J, BRUTUS S 2000. Fungal and Parasitic infections of the eye, Clin. Microbiology Review, 13: 662-685.

KOMPALIC -CRISTO A , BRITTO C, FERNANDES O 2005.Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão**.** J Bras Patol Med Lab., 41: 229-235.

LYNCH M I, MORAES L F L, MALAGUEÑO E, FERREIRA S, CORDEIRO F, OREFICE F 2008. Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis posterior activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. Arq. Bras. Oftalmol., 71: 43-48.

LYNCH M I, CORDEIRO F, FERREIRA S**,** XIMENES R, ORÉFICE F, MALAGUEÑO E 2004. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveítes induced by *Toxoplasma gondii.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99: 851-864.

PELLOUX H, BRUN E, VERNET G, MARCILLAT S, JOVILET M, GUERGOUR D, HIDALGO H, FLEURET A, AMBROISE-THOMAS P 1998. Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the VIDAS System (BioMerieux). Diagn. Mic. Inf. 32:69-73.

RIBEIRO A C, MUTIS M S, FERNANDES O 2008. Association of the presence of residual anti- *Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and treir respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 103:591-594.

ROBERTS A, HEDMAN K, LUYASU V, ZUFFEREY J, BESSIERES M H, BLATZ R M, CANDOLFI E, DECOSTER A, ENDERS G, GROSS U, GUY E, HO-YEN D, JOHNSON J, LECOLIER B, NAESSENS A, PELLOUX H, THULLIEZ P, PETERSEN E 2001. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. Eur. J. Clin. Mic. Infec. Dis. 20: 457-474.

SUZUKI L A, ROCHA R J, ROSSI C L 2001. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis J. Med. Microbiol.,50: 62 - 70.

VILLARD O, FILISETTI D, ROCH-DERIES F, GARWEG J, FLAMENT J, CANDOLFI E 2003. Comparision of enzyme linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. Jou. Clin. Mic.,41: 3537-3541.

Tabela 1: Modelo de tabela 2 x 2 utilizada nas análises estatísticas.

Teste	**Doentes**	**Sadios**
Positivo	**20**	**9**
Negativo	**1**	**11**

Tabela 2: Análise estatística do desempenho do teste de dot blot na pesquisa de NTPase pelo AcMo 2F12 em pacientes portadores e não portadores de UPAPT.

Casos(n)	**Controles (n)**	**Sensibilidade**	**Especificidade**	**VPP***	**VPN****
21	*20*	*95,27%*	*55%*	*63,31%*	*90,48%*

* VPP (valor preditivo positivo) **VPN (valor preditivo negativo)

6.0. CONCLUSÃO

6.0. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que o teste apresenta elevada sensibilidade na detecção da enzima NTPase, porém baixa especificidade. Mas, mesmo com baixa especificidade, a utilização deste teste pode representar uma boa ferramenta no diagnóstico da toxoplasmose ocular como um método complementar a de baixa sensibilidade e alta especificidade como a PCR e o ELISA para IgG. Mais estudos serão realizados para aprimorara este método diagnóstico.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. T, et al. Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. **Arq Bras Oftalmol**.;v. 61, n.5, p. 540-5, 1998.

AMENDOEIRA, M. R. R. Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congênita. **Rev. Cubana Invest. Biomed.** v. 20, n.2, p.118-121, 2001.

AMENDOEIRA, M. R. R. et al. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndeos isolados, Mato Grosso. **Ver. Soc. Bras. de Med. Trop.** v. 36, n. 6, p.671-676, 2003

ASAI, T., O'SULLIVAN, W. J., TATIBANA, M. A potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the Parasitic Protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 11, p. 6816-6822, 1983.

ASAI, T., et al. Biochemical and Molecular characterization of Nucleoside Triphosphate Hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biol. Chemistry**, v. 270, n. 19, p. 11391-11397, 1995.

ASAI, T., et al. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.,** v. 30, n.5, p. 1291-1293, 1992.

ASAI, T., SUZUKI, Y. Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiology Letters,** v.72, p. 89-92, 1990.

BACCARIN, F. S., OLIVEIRA, T. B. Prevalência de toxoplasmose em pacientes atendidos no laboratório Osvaldo Cruz em Santo Ângelo – RS. **Newslab**, v. 80, p. 78-88, 2007.

BARRAGAN, A. et al. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasitemotility and virulence. **J. Exp Med.** v.195, n.12, p.1625-33, 2002.

BEGHETTO, E., et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of clinical Microbiology**, v.41, n.12, p. 5414-5418, 2003
.

BORGES, A. S. & FIGUEIREDO, J. F. C. Detecção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* no soro, líquor e saliva de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurotoxoplasmose. **Arq. Neuropsiquiatria**, v.62, n. 4, p. 1033-1037, 2004.

CANTOS, G. A., et al. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v. 46, n.4, p. 335-341, 2000.

COÊLHO, A.L., KOBAYASHI, M., CARVALHO, L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, n. 4, p. 229-231, 2003.

COPPENS, I., JOINER, K. A., 2001. Parasite – host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 3, n.2, p.1-20, 2001.

COUTINHO, S.G., VERGARA, T.R.C. In: COUTINHO, S.G. & VERGARA, T.R.C. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN S.A., 2005, cap. 1, p. 2096.

COUTO, J. C. F., LEITE, J. M., RODRIGUES, M. V. Diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose na gestação. **Femina.**, v.30, n.10, p. 731-737, 2002.

DODDS, E. M. Toxoplasmosis ocular. Archives soc. Esp. **Oftalmol**., v. 78, p. 531-542, 2003.

DUBEY, J. P. PARASITIC PROTOZOA. In: Kreier, J. P., **Parasitic Protozoa**. Academic Press, New York, Vol.3, p. 101-237, 1977.

DUBEY, J. P. et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin. Microb. Review.** v. 11, n.2, p. 267-299, 1998.

DUBEY JP, BEATTIE CP. Toxoplasmosis of Animals and Man. **Press**,p. 41-60, 1998.

DUMÈTRE, A., DARDÉ, ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? **Microbiology Reviews**, 27, 651-661, 2003.

EDVINSSON, B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. **Karolinska university press**, p.1-58, 2006.

FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P., MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970.

GARCIA, J. L., et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Ver. Soc. Bras. De Med. Trop.**, v.32, n.6, p. 671-676, 1999a.

GARCIA, J.R., et al. Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jaguapita (Paraná) Brazil**. Rev Panam Salud Pública** v.6, p.157-163. 1999b.

GARWEG, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis, **Parasite Immunology**, v. 27, p. 61–68, 2005.

GARWEG, J. G., JACQUIER, P., BOEHNKE, M. Early aqueous humor analysis in patients wih human ocular toxoplasmosis. **Journal Clin. Mic.,** v.38, p.996-1001, 2000.

GILBERT, R. E. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **Neglected tropical diseases**, v. 2, n. 8, p. 1-7, 2008.

GÓMEZ-MARIN, J. E., et al. Frequency of specific anti – *Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 89-94, 2000.

HARLOW, E., LANE, D. ANTIBODY: A LABORATORY MANUAL. **Cold Spring Harbor Lab. Press,** p. 495, 1998.

HAVELAAR, A. H., KEMMEREN, J. M., KORTBEEK, L.M. **Disease burden of congenital toxoplasmosis**, CID, v. 44, n.1, p. 1467-1474, 2007.

HILL, D., DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. . **Clin. Mic. Infec.**, v. 8, n.10, p. 634-640, 2002.

JACOBS, L. et al. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasit.** v. 46, p. 11- 21, 1960.

JOHNSON, M. et al. The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 797-806, 2003.

KASPER, L. et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **Int. Jour. for parasitology.** v. 34, p. 401-409, 2004.

KAWAZOE, U. 2001. Toxoplasmose In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 10ª ed., São Paulo: Ed. Atheneu , 2000, p. 147-156.

KIM, K., WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. **Microbes and infection.** v. 10, p. 978-984, 2008.

KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature,** v.256, p. 495–497, 1975.

KOMPALIC -CRISTO, A., BRITTO, C., FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão**. J Bras Patol Med Lab.**, v.41, n.4, p. 229-235, 2005.

JACQUIER, P.; HOHLFELD, P. VORKAUF, H.; ZUBER, P. Epidemiology of toxoplasmosis in switzerland: national study of seroprevalence monitored in pregnant women 1990-1991. **Schweiz. Med. Wochenschr**. v. 65, p. 29-38, 1995.

LABALETTE, P. et al. Ocular toxoplasmosis after the fifth decade. **American Journal of Ophthalmology,** v. 133, p. 506-515, 2002.

LANG, C., GROB, U., LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii.* **Parasitol. Res.** v. 100, p. 191-203, 2007.

LAPPALAINEM. M., et al. Cost - benefit analisis of screening for toxoplasmosis during pregancy. **Scand. J. Infect.** v. 27, n. 3, p.265- 272, 1995.

LYNCH, M. I., et al. Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis posterior activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 71, n.1, p. 43-48, 2008.

LYNCH, M. I., et al. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveítes induced by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n.8, p. 851-864, 2004.

LOON, A.M. et al. Enzyme linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparasion with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clin. Mic.**, v.17, n.6, p. 997-1004, 1983.

MASUR, H., et al. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. **Am. J. Med.** v. 64, p. 396-402, 1978.

MONTOYA, J. G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases** , v. 185, n. 11, p.73–82, 2002.

MONTOYA, J. G., REMINGTON, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clin. Infec. Dis.**,v. 23, p. 277-282, 1996.

NAKAJIMA-NAKANO, K., et al. Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. **Parasitology International,** v. 48, p. 215-222, 2000.

NETO, E. C, et al.. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **Int. Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 941-947, 2000.

NIELSEN, H. V., SCHMIDT, D. R., PETERSEN, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by two-dimensional immunoblot differentiation of mother and child immunoglobulin G profiles. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n.2, p. 711-715, 2005

NUSSEMBLATT, R. B., BELFORT, R. Ocular toxoplasmosis: an old disease revisited. **JAMA**, v. 271, p. 304-307, 1994.

ORÉFICE, F., CUNHA, S. E., MOREIRA Jr., C. A. Parasitárias. In: S. Abujamra, M. Ávila, C. Barsante, M. E. Farah, J. O. R. Gonçalves, J. Lavinsky, Jr. C. A. Moreira, M. B. Nehemy, H. Suzuki (eds.), São Paulo: ***Retina e vítreo: clínica cirúrgica,***2000 Roca, p. 681-687.

PAUL, M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. **Clin. Diag. Lab. Immunology**, v. 6, n.4, p.514-518, 1999.

PELLOUX, H., et al. Determination of anti- *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the VIDAS System (BioMerieux). **Diagn. Mic. Inf.** v. 32, p. 69-73, 1998.

PREZELOV, P., KOINARSKI, V., GEORGIEVA, D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in the Stara Zagora region. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, n. 2, p. 113-119, 2008.

RIBEIRO, A. C., MUTIS, M. S., FERNANDES, O. Association of the presence of residual anti- *Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and treir respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 591-594, 2008

ROBERTS, A. et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Eur. J. Clin. Mic. Infec. Dis.** v. 20, p. 457-474, 2001.

RODIER, M.H., et al. Seroprevalences of toxoplasma, malaria, rubella, cytomegalovirus, HIV and treponemal infections among pregnant women Cotonou, Republic of Benin**. Acta Tropica v.**59., p 271-77, 1995.

RONDAY, M. J., et al. Presumed acquired ocular toxoplasmosis. **Arch. Ophtamol.** v.113, p. 1524-1529, 1995.

SERVER, J.L., ELLENBERG, J.H., LEY A.C. Toxoplasmosis: Maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. **Pediatrics**, v. 82, n. 2, p.181- 192,1988.

SUZUKI, L. A., ROCHA, R. J., ROSSI, C. L. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **J Med Microbiol**., v. 50, p. 62-70, 2001.

STROEHLE, A., et al. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. **American Society of Parasitology**, v. 91, n.3, p. 561-563, 2005.

TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R. AND WEISS, L.M.*Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TONELLI E, ANDRADE GM, MARTINS M A. Toxoplasmose. In: Tonelli E. editor. Doenças infecciosas na infância. **Medsi,** p.769-76, 1987.

VASCONCELOS, M.S. L. Dinâmica da IgA secretora específica na lágrima em pacientes portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *Toxoplasma gondii* durante o primiro trimestre da doença. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, p.90, 2009.

VILLARD, O. et al. Comparision of enzyme linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. **Jou. Clin. Mic**., v. 41, n.8, p. 3537-3541, 2003.

VILLENA, I., et al. Detection of Specific Immunoglobulin E during Maternal, Fetal and Congenital Toxoplasmosis. **Jou. Of clinical Microbiology,** v. 37, p. 3487–3490, 1999.

YAZAR, S. et al. Ivestigation of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in patients with neoplasia. **Journal of Med. Mic.**, v. 53, p.1183-1186, 2004.

ZHANG, L.S.G. et al. Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with Toxoplasma tachyzoites. **Chinese Medical Journal.** v. 119, n. 8, p. 701-704, 2006.

8.0. APÊNDICES

APÊNDICE Nº1 – Termo de consentimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Dinâmica da IgA secretora da lágrima em pacientes portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *Toxoplasma gondii* durante o primeiro trimestre da doença.

Investigadora: Mirelle Souza Leão Vasconcelos

Rua Antônio Gomes de Freitas, 191- Ilha do Leite- Recife-PE. Tel: 34234166

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, ... responsável pelo (a) menor ..... concordo que ele (a) participe / em participar da pesquisa sobre a Dinâmica da cinética da IgA secretora da lágrima em pacientes portadores de uveíte posterior ativa presumivelmente por *Toxoplasma gondii* na forma clássica durante o primeiro trimestre da doença, mediante o qual virá a ser possível o esclarecimento diagnóstico da doença em questão.

Sendo assim autorizo a realização do exame oftalmológico completo, (refração, biomicroscopia, tonometria, fundoscopia) no ambulatório de oftalmologia do Hospital das Clínicas da UFPE, assim também como a retirada de amostra de sangue venosa (10ml), e algumas lágrimas, para exames laboratoriais. Esses exames não significam qualquer risco para a saúde, podendo trazer benefícios na medida que permitam o esclarecimento da doença.

Declaro que fui esclarecido (a) que utilizando algumas lágrimas virão a ser feitos dosagens de anticorpos para saber se o olho tem ou não toxoplasmose, e que entendi todas as informações que me foram fornecidas. Por este motivo, dou o meu consentimento livre e voluntário para participar do mesmo, e para que os dados obtidos sejam utilizados, desde que minha identidade seja mantida em sigilo, não podendo ser divulgada em nenhuma hipótese, a não ser que assim eu decida e autorize. Assinando este termo de consentimento concordo em participar deste estudo, tendo a liberdade de me retirar em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma e sem prejuízo aos cuidados e acompanhamento da doença.

Recife,.... de ..... de 200...

Nome do pesquisador responsável _____

Nome do pai ou responsável _____

Nome do menor _____

1ª Testemunha _____

2ª Testemunha _____

9.0. ANEXOS

ANEXO Nº1

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N. º 263/2008 - CEP/CCS

Recife, 20 de agosto de 2008

Registro do SISNEP FR – 166677
CAAE – 0379.0.172.000-08
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 387/07
Titulo: "Análise da cinética da IgA *secretora da lágrima em pacientes portadores de uveite* posterior ativa presumivelmente por *Toxoplasma gondii* na forma clássica durante o primeiro trimestre da doença"

Pesquisador Responsável: Mirelle Souza Leão Vasconcelos

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 19 de agosto de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A
Mestranda Mirelle Souza Leão Vasconcelos
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

ANEXO Nº2 – INSTRUÇÃO AOS AUTORES

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz On-lin

Instructions to Authors

Author Guidelines

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Intitutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a

review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits

• **In the text use authors' surname and date:**

Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is:

(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned:

Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

• **At the end of the paper use the following styles:**

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz 14*: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: http://www.nap.edu/books/0309074029/html/.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: http://www.cancer-pain.org/.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html

DATABASE ON THE INTERNET

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: http://www.abms.org/newsearch.asp

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html Files updated weekly. Updated June 15, 2005

• **Illustrations:** figures and tables must be understandable without reference to the text.

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with *a*, *b*, *c*, etc.) below.

•**Short communications**: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

• **Alternative format:** manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm) and will be responsible

for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.
Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
- a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.
- **Page charges:** there will be no page charges.
- **Proofs:** one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo