



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

**DETECÇÃO DE NTPASE DE *Toxoplasma gondii* ATRAVÉS DE ANTICORPO  
MONOCLONAL PURIFICADO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS  
PEG/FOSFATO**

RECIFE-PE

2005

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

DETECÇÃO DE NTPASE DE *Toxoplasma gondii* ATRAVÉS DE ANTICORPO  
MONOCLONAL PURIFICADO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS  
PEG/FOSFATO

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, visando à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coorientação: Prof. Dr. Masashi Kobayashi

RECIFE-PE  
2005

**Silva, Silvana de Fátima Ferreira da**  
**Detecção de NTPase de *Toxoplasma gondii* através de anticorpo monoclonal purificado por sistema de duas fases PEG / Fosfato. / Recife: O Autor, 2005.**

**107 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: José Luiz de Lima Filho**

**Coorientadora: Masashi Kobayashi**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2005.**

**Inclui referências e anexos**

- 1. Toxoplasmose 2. Testes imunológicos 3. Anticorpos monoclonais I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Kobayashi, Masashi (coorient.) III. Título**

**616.936**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017-381**

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

DETECÇÃO DE NTPASE DE *Toxoplasma gondii* ATRAVÉS DE ANTICORPO  
MONOCLONAL PURIFICADO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS  
PEG/FOSFATO

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, visando à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/06/2005

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto – UFRPE

---

Profa. Dra. Vladia Maria Assis Costa - UFPE

---

Profa. Dra. Elizabeth Malagueño de Santana - FIOCRUZ

---

Dra. Maria Regina Reis Amendoeira – FIOCRUZ

---

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho – UFPE (Orientador)

Programa autorizado para oferecer o título de: Doutor em Ciências

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela força, pelos anjos visíveis e invisíveis que me enviou na trajetória deste trabalho. Obrigada meu DEUS!

A meus pais Antônio Ferreira e Maria Helena pelo apoio nos momentos difíceis dessa trajetória.

A Maria da Conceição Gomes Leitão que me ajudou ativamente na construção deste trabalho, a você, o meu eterno obrigado.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, meu orientador, pela compreensão nos momentos difíceis e por acreditar sempre no meu trabalho.

Ao meu Coorientador Dr. Masashi Kobayashi pelos ensinamentos obtidos.

A Profa. Dra. Ana Lúcia Porto pelo grande apoio e colaboração.

A minha grande Mestra Profa. Dra. Elizabeth Malagueño de Santana por seus grandes ensinamentos.

As minhas amigas e amigos de trabalho do setor de imunologia do LIKA: Vlaúdia, Mônica, Valdênia, Renata, Lillyanne, Mayra, Fernanda, Gil, Fabrício, Patrícia, Sérgio, Carol, Sandriana e Socorro.

Aos amigos do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães: Valéria Pereira, Luiz Alves, Fábio Brayner, e Sérgio dos Santos.

Aos amigos do setor de biotecnologia do LIKA: Danyelle Brunaska, Keila, Daniela Viana, Cosme, Tatiana, Paulo Souza.

Aos amigos do setor de bioquímica do LIKA: Catarina, Kilma, Givanildo, Yan e Hercília.

Aos colegas da Universidade de Pernambuco: Maria Luíza, Laura, Zulma, e Patrícia.

Aos professores da UFPE, Amâncio, Ana Maria Mendonça, José Valfrido Santana e Isabel Lynch.

A todos os colegas do Doutorado em Ciências Biológicas da UFPE.

A todos que participaram de forma direta e indireta da construção deste trabalho, agradeço a Deus por tê-los ao meu lado e a todos meu eterno *OBRIGADO!!!*

*“...E aprendi que se depende sempre, de tanta, muita, diferente gente, toda pessoa sempre é as marcas, das lições diárias de outras tantas pessoas.*

*E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá.*

*E é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar...”*

***Gonzaginha***

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de larga distribuição mundial, causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório. Uma vez o indivíduo infectado, o parasito se mantém latente por vários anos, pois o rápido avanço da imunidade humoral e celular restringe eficientemente a ação patogênica do parasito. Entretanto, a imaturidade do sistema imune (como em fetos e recém-nascidos) ou a sua deficiência (no caso dos indivíduos imunodeprimidos) pode causar séria morbidade ou mortalidade. A parasitose apresenta uma variedade de sinais e sintomas clínicos, e o diagnóstico laboratorial torna-se uma ferramenta de importância fundamental. O emprego de uma metodologia diagnóstica que consiga discernir entre infecção latente e ativa é o principal meio para diminuir os danos provocados pelo parasita. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia diagnóstica na tentativa de elucidar a fase da doença. Para alcançar esse objetivo foi desenvolvido um ensaio sorológico enzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) utilizando anticorpo monoclonal da classe IgA (mab-IgA - *monoclonal antibodies IgA*) contra a enzima Nucleosil Trifosfato Hidrolase (NTPase), produzida por taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (forma ativa do parasito). Para desenvolvimento do método, o mab-IgA foi produzido por expansão celular e purificado por meio de sistema de duas fases aquosa: polietileno glicol e fosfato (SDFA: PEG-Fosfato). O anticorpo purificado foi fixado em placas de ELISA e testado frente a soros de indivíduos na fase ativa da infecção, apresentando a forma ocular da doença, diagnosticados clinicamente por meio de fundoscopia. Os resultados revelaram uma concordância entre o teste desenvolvido e o diagnóstico clínico, apresentando especificidade de 86,30% e sensibilidade de 85,18%, com eficiência de 0,89 revelando a capacidade do método em identificar infecção ativa. Diante dos resultados, o presente estudo sugere a possibilidade da utilização de anticorpo monoclonal anti-NTPase de *Toxoplasma gondii* como marcador de fase ativa.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*. Nucleosil Trifosfato Hidrolase. Toxoplasmose ocular. Sistema de duas fases aquosas: PEG-Fosfato. Testes imunológicos.

## ABSTRACT

### **Detection of NTPase's *Toxoplasma gondii* by Means of Purified Monoclonal Antibody Using an Aqueous Two-Phase System: PEG Phosphate**

Toxoplasmosis is a worldwide spread zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan. Once an individual is infected, the parasite remains latent for several years, since the fast advance of humoral and cellular immunity effectively restrains the parasite's pathogenic action. However, an immature immune system (as in fetuses and newborns) or its deficiency (as is the case of immunocompromised individuals) may cause serious morbidity or mortality. The parasitosis presents a variety of clinical signs and symptoms, and laboratory diagnosis becomes a fundamental tool. The use of a diagnostic methodology capable to distinguish between latent and active infection is the main means to reduce the damages caused by the parasite. The objective of this study was to develop a diagnostic strategy in an attempt to elucidate the stage of the disease. To achieve that goal, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed using an IgA-class monoclonal antibody against the Nucleosil Triphosphate Hydrolase enzyme (NTPase), produced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites (the parasite's active form). To develop the method, an IgA monoclonal antibody was produced by cell expansion and purified by means of an aqueous two-phase system: polyethylene glycol and phosphate (ATPS: PEG/Phosphate). The purified antibody was fixed on ELISA plates and tested against sera from individuals in the active phase of the infection, presenting the ocular form of the disease, clinically diagnosed by ophthalmoscopy. The results showed conformity between the developed test and the clinical diagnosis, presenting specificity of 86.30% and sensitivity of 85.18%, with an efficiency of 0.89 revealing the method's capability to identify active infections. In view of these results, the present study suggests the possibility of using *Toxoplasma gondii*'s anti-NTPase monoclonal antibody as an active phase marker.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. Nucleosil Triphosphate Hydrolase. Toxoplasmosis ocular. Aqueous two-phase system: PEG-Phosphate. Immunological tests.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA:

Figura 01.	Invasão e replicação do Taquizoíto na célula hospedeira .....	16
Figura 02.	Formas evolutivas do <i>T.gondii</i> .....	17
Figura 03.	Ciclo do <i>Toxoplasma gondii</i> em ambos hospedeiros.....	19
Figura 04.	Prevalência Global da Toxoplasmose (1993).....	22
Figura 05.	Exantema máculo-papular por <i>T. gondii</i> .....	23
Figura 06.	Retinocoroidite por <i>T. gondii</i> .....	24
Figura 07.	Macrocefalia e dano visual por <i>T. gondii</i> .....	25
Figura 08.	Fluxograma do diagnóstico no Imunocompetente.....	34
Figura 09.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose no Feto.....	36
Figura 10.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose no recém-nascido.....	37
Figura 11.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose em imunodeprimido (HIV/AIDS).....	39
Figura 12.	Esquema estrutural de taquizoíto de <i>T. gondii</i> .....	42
Figura 13.	Representação da curva binodal de um sistema de duas fases aquosas .....	46

### ARTIGO 1: Purification of the monoclonal antibody anti-NTPase of *Toxoplasma gondii* used aqueous two-phase system PEG-phosphate.

Figura 01.	Effect of the molar mass of the polymer and the length of tie line in the partition coefficient of total protein of crude extract of culture of 2F12.....	61
Figura 02.	Mab-2F12 detection in the different Systems PEG/Phosphate (550, 1000, 3350 e 8000). .....	62
Figura 03.	SDS-PAGE of mab-2F12 purified by the PEG 8000 / Phosphate tie line 2 saline-rich bottom phase.....	63
Figura 04.	Determination of the actiity of the mab-2F12 obtained after extraction with ATPS (Peg 8000 / Phosphate tié line 2) related to the rough extract of <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	64

### ARTIGO 2: Detecção de NTPase de *Toxoplasma gondii* em indivíduos com a forma ocular da Toxoplasmose.

Figura 01.	Presença de NTPase detectado através de ELISA ( <i>T.gondii</i> NTPase, captura) utilizando anticorpo monoclonal 2F12, em soro de indivíduos com UPAT e em indivíduos sem a lesão.....	75
------------	--	----

**ARTIGO 3: Diagnóstico da Toxoplasmose – review.**

Figura 01.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose no Imunocompetente....	79
Figura 02.	Fluxograma do Perfil Diagnóstico da Toxoplasmose em Gestantes. ....	82
Figura 03.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose no Feto. ....	84
Figura 04.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose no recém-nascido. ....	85
Figura 05.	Fluxograma do diagnóstico da Toxoplasmose em HIV/AIDS.....	87

## LISTA DE TABELAS

### **CAPITULO 1: Purification of the monoclonal antibody anti-NTPase of *Toxoplasma gondii* used aqueous two-phase system PEG - phosphate**

Tabela 01	Compositions (w/w) of PEG- $K_2HPO_4$ / $KH_2PO_4$ – Systems with PEG 550, 1000, 3350, 8000.....	65
-----------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 BIOLOGIA PARASITÁRIA</b> .....	15
2.1 <b>Ciclo Biológico</b> .....	16
2.2 <b>Mecanismos de Transmissão</b> .....	20
2.3 <b>Distribuição Geográfica e Epidemiologia</b> .....	21
<b>3 PATOLOGIA E IMUNIDADE</b> .....	23
3.1 <b>Toxoplasmose no Imunocompetente pós-natal</b> .....	23
3.2 <b>Toxoplasmose Ocular</b> .....	23
3.3 <b>Toxoplasmose Congênita</b> .....	25
3.4 <b>Toxoplasmose no Imunodeprimido</b> .....	26
3.5 <b>Imunidade na Toxoplasmose</b> .....	27
<b>4 DIAGNÓSTICO</b> .....	29
4.1 <b>Diagnóstico Parasitológico</b> .....	29
4.2 <b>Diagnóstico Molecular</b> .....	30
4.3 <b>Diagnóstico Sorológico</b> .....	30
4.3.1 <b>Reação de Sabin - Feldman ou prova do corante</b> .....	30
4.3.2 <b>Determinação de imunoglobulinas anti-<i>T. gondii</i></b> .....	31
4.3.2.1 <b>Detecção de IgM</b> .....	31
4.3.2.2 <b>Detecção de IgG</b> .....	32
4.3.2.3 <b>Detecção de IgA</b> .....	32
4.3.2.4 <b>Detecção de IgE</b> .....	32
4.3.2.5 <b>Avidéz da IgG</b> .....	33
4.3.2.6 <b>Anticorpos monoclonais</b> .....	33
4.4 <b>Fluxogramas do Diagnóstico da Toxoplasmose</b> .....	34
4.4.1 <b>Fluxograma do diagnóstico no imunocompetente</b> .....	34
4.4.2 <b>Fluxograma do diagnóstico na infecção congênita</b> .....	35
4.4.3 <b>Fluxograma do diagnóstico da infecção no imunodeprimido</b> .....	38
4.4.4 <b>Fluxograma do diagnóstico da infecção na toxoplasmose ocular</b> .....	39
4.5 <b>Proteômica – O Futuro</b> .....	40
<b>5 NUCLEOSIL TRIFOSFATO HIDROLASE – NTPase</b> .....	42
<b>6 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS</b> .....	45

<b>6. 1 Fatores que Influenciam o Sistema de Duas Fases Aquosas - S DFA.....</b>	<b>47</b>
6. 1. 1 Massa molar e concentração do polímero.....	47
6. 1. 2 pH.....	47
6. 1. 3 Temperatura .....	47
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
8.1 <b>ARTIGO 1:</b> Purification of the monoclonal antibody anti-NTPase of <i>Toxoplasma gondii</i> used aqueous two-phase system PEG-phosphate. ....	51
8.2 <b>ARTIGO 2:</b> Detecção de NTPase de <i>Toxoplasma gondii</i> em indivíduos com a forma ocular da Toxoplasmose.....	66
8.3 <b>ARTIGO 3:</b> Diagnóstico da Toxoplasmose – <i>review</i> .....	76
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE A - Indicadores de Produção.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO A - Carta de aceite e Instruções aos autores do Journal of Chromatography B.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO B - Instruções aos autores das: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO C - Instruções aos autores da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais cosmopolitas, cujo agente etiológico, o *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), é um protozoário intracelular que desenvolveu várias rotas potenciais de transmissão. A infecção pelo *T.gondii* é extremamente comum entre os seres humanos e também em várias espécies animais (herbívoros, carnívoros e onívoros) e tendo os felinos, no nosso habitat o gato doméstico, como hospedeiros completos do parasito, expelindo em suas fezes uma das formas infectantes (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970; TENTER et al, 2000).

Devido a sua grande importância como um agente causador de uma zoonose, em vários animais, o *T.gondii* foi o coccídio mais intensivamente estudado. Aproximadamente mais de 15000 artigos originais de pesquisas, mais de 500 revisões e vários livros e capítulos de livro foram publicados sobre este parasito, entretanto, há muitos aspectos de sua biologia, ciclo natural de vida, epidemiologia das infecções pelo *T. gondii* que ainda são obscuros (TENTER et al., 2000).

No homem a Toxoplasmose apresenta-se geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, pois o rápido avanço da imunidade humoral e celular restringe eficientemente a ação patogênica do parasito. Estima-se que a infecção exista na forma assintomática em cerca de 500 milhões a um bilhão de pessoas no mundo, no entanto, em gestantes e seus fetos, recém-nascidos e nos indivíduos imunodeprimidos, a toxoplasmose pode causar séria morbidade e mortalidade (GIRALDO et al., 2000).

Na economia pecuária a Toxoplasmose também causa significantes perdas econômicas nos animais de produção — suínos, caprinos, bovinos, aves, coelhos — acarretando abortos e nascimento de fetos mal formados (MEIRELES et al., 2003).

A primeira identificação de doença em seres humanos causada pelo *T.gondii* ocorreu, aproximadamente, na década de 20 por Janku na Tchecoslovaquia e Magarinos Torres no Brasil (PESSOA, 1967). Clinicamente a Toxoplasmose está dividida nas seguintes formas: toxoplasmose congênita, toxoplasmose no imunocompetente pós-natal e toxoplasmose no imunodeprimido (HINRICHSEN et al, 2001).

Devido às diversas formas clínicas apresentada e dentre elas uma variada presença de sinais e sintomas clínicos, que por vezes levam a confusão com outras entidades nosológicas, o diagnóstico laboratorial tornou-se uma ferramenta de fundamental importância na identificação da infecção (CAMARGO, 2001).

O diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose está baseado na pesquisa de anticorpos (IgG, IgM, e IgA) contra o parasita, mas embora os testes imunológicos sejam a metodologia mais aceita e realizada na rotina laboratorial clínica, os dados obtidos apresentam várias lacunas como distinguir entre infecção passada ou recente (muitos desses anticorpos permanecem na circulação por um período longo de tempo - meses ou anos sem contudo caracterizar infecção ativa), reação cruzada com fator reumatoide, no caso da imunofluorescência indireta, e o estado imunológico do hospedeiro são algumas dificuldades encontradas (GALVÁN-RAMÍREZ et al., 1998; CAMARGO, 2001).

O diagnóstico parasitológico é difícil de ser realizado, pois a parasitemia é muito fugaz e só encontrada na fase aguda ou reativa da doença, além de depender de uma série de fatores como a cepa do parasito, a carga parasitária e o local de desenvolvimento do mesmo (REY, 2002).

Com o surgimento na década de 80 da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi observado que a Toxoplasmose apresenta quadros graves na primo-infecção e nas reagudizações de infecções latentes nos indivíduos acometidos por esta Síndrome, principalmente, um aumento significativo dos casos de comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Nos portadores do vírus HIV a ocorrência de encefalite por *T.gondii* está entre as dez principais infecções oportunistas (REITER-OWONA et al., 2000).

Estes dados, aliados a uma vasta distribuição na natureza do parasito e as várias rotas de transmissão, de difícil controle, existentes (TENTER et al., 2000) fizeram com que os estudos diagnósticos da Toxoplasmose fossem intensificados nas ultimas décadas na tentativa de identificar mais precocemente a infecção ativa para aplicação da terapêutica adequada (DUTRA LEÃO et al., 2004).

No intuito de elucidar o diagnóstico (infecção ativa), vários antígenos foram identificados ar a infecção ativa, como: P30-SAG1 (TOMAVO, 1996) e P22-SAG2 (GRIMWOOD e SMITH, 1992) obtidos da membrana citoplasmática. Asai et al (1983) identificou uma Nucleosil Trifosfato Hidrolase (NTPase), presente em taquizoítos (forma ativa do parasita) de *T. gondii*, exibindo uma alta atividade enzimática na hidrólise do ATP e ADP. A enzima é uma das principais proteínas citoplasmáticas e representa cerca de 8% do total das proteínas citosólicas da célula. A existência de uma grande quantidade de NTPase em taquizoítos, levantou a possibilidade de capturar a enzima no soro ou outros fluidos biológicos de indivíduos infectados, podendo ainda, possibilitar a diferenciação da fase ativa e latente da Toxoplasmose e também utilizá-la como alvo em potencial para quimioterapia (JONHSON et al 2003).

Após a identificação da NTPase como antígeno em potencial do *T.gondii*, vários estudos foram realizados sobre a enzima como a sua caracterização (ASAI et al, 1986 ASAI et al, 1995), detecção em animais experimentalmente infectados (ASAI et al, 1987; Asai et al 1992; Kikuchi et al, 2002), a sua localização no parasita (SIBLEY et al, 1994; KIKUCHI et al, 2001), detecção de anticorpos contra NTPase em humanos e animais (ASAI et al, 2002) e codificação genética (JOHNSON et al, 1989). Entretanto, a captura da NTPase em soros e outros fluidos biológicos em humanos não foram realizados. Diante desse fato este trabalho se propôs desenvolver uma técnica imunodiagnóstica utilizando anticorpos monoclonais para captura da NTPase circulante em soros de indivíduos infectados com *T.gondii*.

O desenvolvimento do estudo foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)- da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em colaboração com a Universidade de Chiba – Japão, tendo sido implantado um conjunto de técnicas para desenvolvimento do imunodiagnóstico. Além disso, o estudo abriu uma nova linha de pesquisa no LIKA sobre umas das mais importantes parasitoses em todo o mundo.

Inicialmente para uma melhor compreensão do trabalho se faz necessário uma abordagem adequada sobre a doença: dados epidemiológicos, patologia e diagnóstico, assim como as características biológicas do *T. gondii*. Uma abordagem sobre a NTPase, também será realizada. Em seguida serão apresentados em forma de artigos os resultados obtidos até o presente submetidos em revistas especializadas na área.

## 2 BIOLOGIA PARASITÁRIA

O *T. gondii* é um dos mais polixenos parasita conhecido até o momento. Os organismos pertencentes ao gênero *Toxoplasma* foram descritos independentemente em 1908 por Splendore em coelhos no Brasil e por Nicolle e Manceaux no “gondii” (*Ctenodactylus gondii*), roedor norte-africano, sendo erroneamente classificado como um tripanossomatídeo. Em 1909, Nicolle e Manceaux criaram um novo gênero o *Toxoplasma* com a espécie *T. gondii* e Splendore denominou de *Toxoplasma cuniculi* o parasita que encontrara no coelho (KAWAZOE, 2005).

Durante vários anos, inúmeras espécies foram criadas dentro do gênero *Toxoplasma* e foram nomeadas principalmente de acordo com o hospedeiro em que eles eram encontrados (TENTER et al., 2000). Estudos de comparação imunológica e biológica realizados por Sabin, na década de 30, com *Toxoplasma* forneceram evidências que os vários parasitas de origem animal e humana eram idênticos (HINRICHSEN et al., 2001).

A classificação Sistemática do parasito está assim compreendida: Reino: **Protista**; Filo: **Apicomplexa**; Classe: **Sporozoa**; Ordem: **Eucoccidiida**; Família: **Sarcocystidae**; Gênero: ***Toxoplasma***; Espécie: ***T. gondii*** (REY, 2002).

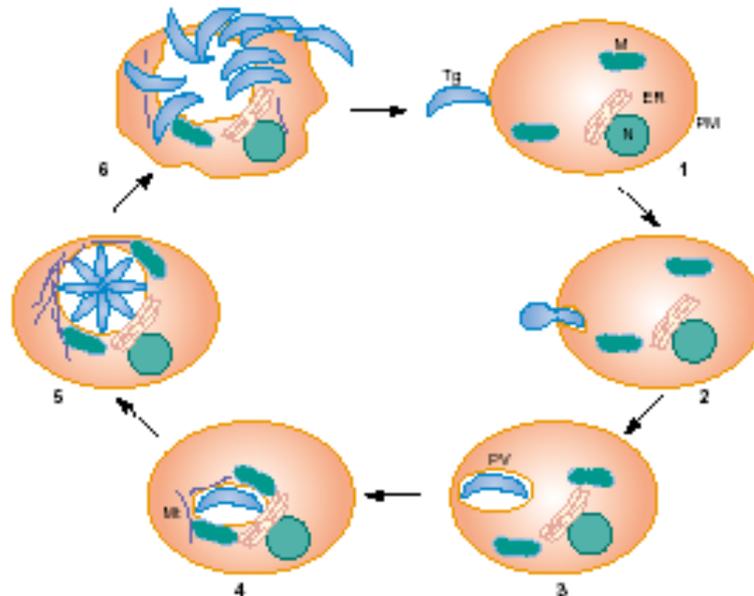
O *T.gondii* é um coccídeo intracelular obrigatório invadindo qualquer tipo de célula, exceto hemácias, no organismo dos seus hospedeiros (homens e outros animais) para se multiplicar. Durante a invasão (**Fig. 1**), o parasita constrói um vacúolo protetor no citoplasma, vacúolo parasitóforo (VP), no qual se reproduz assexuadamente por endodigenia (processo de multiplicação assexuada, onde há formação de dois organismos no interior da célula mãe) aproximadamente  $2^{11}$  parasitas são formados. A invasão do *T.gondii* na célula é um processo ativo que requer motilidade e liberação regular de proteínas, oriundas das organelas encontradas na porção anterior (sistema apical) do parasita (HOFF e CARRUTHERS, 2002).

O parasita para entrar na célula, anexa o sistema apical na membrana e secreta proteínas das micronemas, roptrias e grânulos densos (GDs) a medida que monta o vacúolo parasitóforo (VP). Uma vez no citoplasma da célula hospedeira a membrana do vacúolo, formada pela invaginação da membrana celular, é fechada. Estudos revelaram que na formação do VP, os parasitas presentes impedem a fusão do fagossomo com os lisossomos, e que a membrana do VP é permeável a moléculas menores que 1300 kDa, fazendo a composição iônica intravacuolar equivalente a do citoplasma celular. Além disso, o parasita segrega proteínas no espaço vacuolar incluindo, essencialmente, Nucleosil Trifosfato Hidrolase (NTPase) que abastece o *T.gondii* com purinas (essencial para multiplicação)

através da hidrólise do ATP e ADP da célula hospedeira. (REY, 2002; HOFF e CARRUTHERS, 2002).

Quando os parasitas estão completamente desenvolvidos, saem da célula por ruptura mecânica e mobilidade parasitária para invadir outro grupo de células vizinhas. A célula hospedeira inicial morre e esta morte conduz as patologias observadas na infecção. A entrada e saída da célula são eventos rápidos (<60 segundos), o que é crucial para a sobrevivência do parasita (REY, 2002; HOFF e CARRUTHERS, 2002).

**Figura 1: Invasão e replicação do taquizoíta na célula hospedeira.** 1- Adesão da parte anterior do parasita (Complexo apical) à membrana celular, 2- invaginação da membrana celular, 3- formação do vacúolo parasitóforo, 4-5- Multiplicação do parasita, 6- saída do parasita e morte celular.



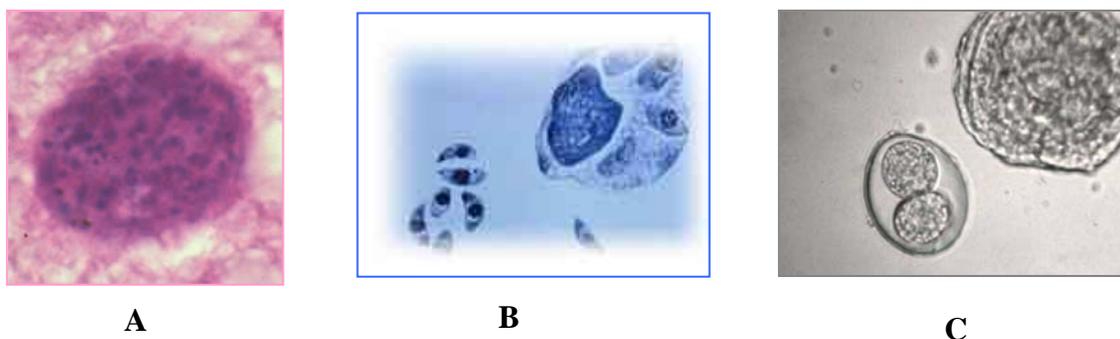
Fonte: TRENDS in Parasitology 18 (6), 2002.

## 2.1 Ciclo biológico

O *T.gondii* é um parasita de ciclo heteroxênico facultativo, apresentando hospedeiros completo (definitivo) e incompleto (intermediários). Os hospedeiros intermediários (aves e mamíferos, inclusive o homem) realizam o ciclo incompleto ou assexuado. As espécies do gênero *Felis* e *Lynx*, particularmente os gatos, são os únicos hospedeiros nos quais *T.gondii* pode completar todo o seu duplo ciclo – a fase assexuada e sexuada (coccidiana) (KAWAZOE, 2005).

Morfologicamente o *T.gondii* apresenta as seguintes formas evolutivas (**Fig 2**): taquizoíto (forma proliferativa), bradizoíto (forma cística) e oocistos, o qual contém esporozoítos (TENTER et al., 2000).

**Figura 2:** Formas evolutivas do *T.gondii*: **A:** bradizoíto e **B:** taquizoíto e **C:** oocisto



Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) e [www.icb.ufmg.br](http://www.icb.ufmg.br).

O taquizoíto é a forma de multiplicação rápida (takys = rápido) do parasita, presente na fase ativa da infecção e encontrado no vacúolo parasitóforo de várias células, nos líquidos orgânicos, excreções e secreções. O bradizoíto é a forma cística e lenta de reprodução do parasito (brady = lento) e encontra-se dentro do vacúolo parasitóforo da célula, cuja membrana vacuolar forma a cápsula do cisto. Os taquizoítos e bradizoítos são encontrados tanto no hospedeiro intermediário, quanto no hospedeiro definitivo (REY, 2002).

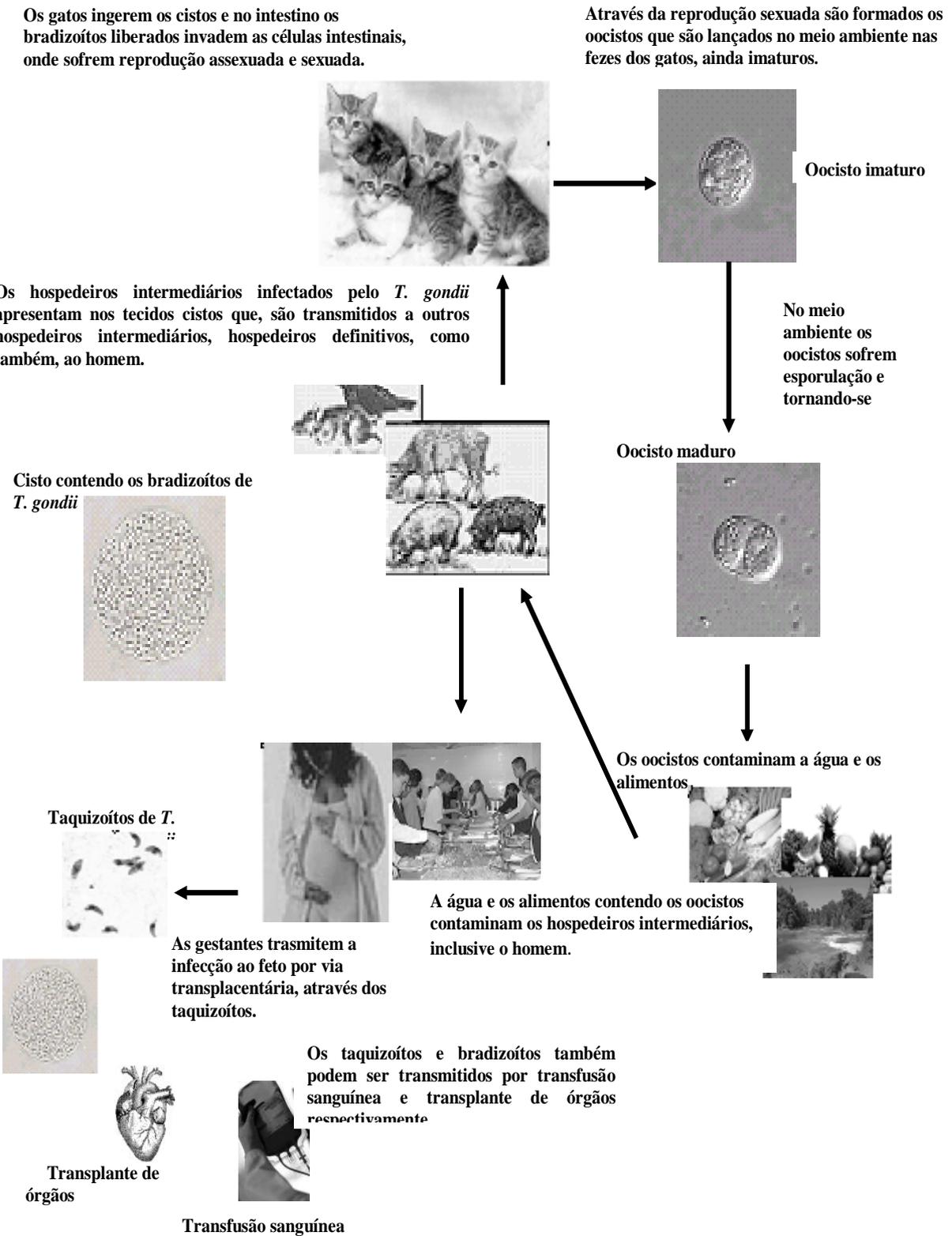
O oocisto é a forma evolutiva encontrada no intestino dos felinos e é eliminado com as fezes. O oocisto apresenta uma membrana dupla bastante resistente às condições ambientais, no seu interior observamos dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos (KAWAZOE, 2005).

A infecção dos hospedeiros intermediários, aves e mamíferos (inclusive o homem) e definitivos (gatos) ocorre através de ingestão de oocistos maduros contendo esporozoítos, taquizoítos eliminados no leite, lambadura de animais em lesões com sangue e por transmissão congênita, ou, ainda, cistos contendo bradizoítos presentes em carnes crua ou mal cozida (**Fig. 3**). Os oocistos e cistos ao passar pelo estômago sofrem a ação do suco digestivo, liberando em seguida os esporozoítos ou bradizoítos respectivamente para invasão nas células do hospedeiro. Já os taquizoítos que chegam ao estômago, são destruídos pelo suco gástrico, só sobrevivendo aqueles que penetram no organismo através da mucosa oral. Nas células do hospedeiro o taquizoíto multiplica-se por endodiogenia no interior do vacúolo parasitóforo. A grande quantidade de taquizoítos no vacúolo e sua intensa mobilidade fazem com que haja

uma ruptura do vacúolo e posteriormente da célula, colocando em liberdade o parasita para um novo processo de invasão celular (REY, 2002; HOFF E CARRUTHERS, 2002).

O ciclo coccidiano (sexuado) ocorre somente nas células do epitélio intestinal, principalmente delgado, de gatos e de outros felídeos jovens. Durante o desenvolvimento desse ciclo ocorre uma fase assexuada (merogonia) e outra sexuada (gametogonia) do parasito. A infecção nos felinos ocorre de maneira semelhante ao humano e a outros animais, no entanto os esporozoítos (oriundos de oocistos), bradizoítos e taquizoítos, penetram no epitélio intestinal do felino e sofrem um processo de multiplicação por endodiogenia e merogonia no interior do vacúolo parasitóforo da célula intestinal. O rompimento da célula parasitada liberará os merozoítos que penetrarão em novas células epiteliais e se transformarão nas formas sexuadas masculinas (microgametas) e femininas (macrogametas). Os microgametas, flagelados e móveis, fecundarão o macrogameta produzindo o ovo ou zigoto que evoluirá, formando uma parede dupla, dando origem ao oocisto. Este sairá nas fezes, ainda imaturo e no ambiente sofrerá esporulação resultando na forma final de resistência (KAWAZOE, 2005).

**Figura 3:** Ciclo do *Toxoplasma gondii* em ambos hospedeiros: completo (gato) e incompleto (aves, mamíferos e o homem).



Fonte: Esquema idealizado por Maria da Conceição Gomes Leitão.

## 2.2 Mecanismos de transmissão

Devido às diversas formas evolutivas — cistos, taquizoítos e oocistos — serem potencialmente infectantes, várias rotas de transmissão são possíveis na infecção por *T. gondii*, envolvendo todas as formas evolutivas (TENTER et al., 2000). No entanto, nem todas as rotas de infecção são importantes epidemiologicamente e as fontes de infecção podem variar sensivelmente entre grupos étnicos de diferentes localizações geográficas com diferentes hábitos alimentares (TENTER et al., 2000).

Os taquizoítos têm o principal papel na transmissão vertical do *T. gondii*, mas são muito sensíveis a condições ambientais e normalmente morrem fora do hospedeiro. Epidemiologicamente esse tipo de transmissão não é tão importante, no entanto ela pode ocorrer, haja vista que taquizoítos já foram encontrados em leite de vários hospedeiros intermediários como ovelhas, cabras, vacas, inclusive em humanos. Dados sobre esse mecanismo de transmissão foram demonstrados por Chiari e Neves (1984), onde descreveram a ocorrência de Toxoplasmose aguda em três membros de uma mesma família, relacionada à ingestão de leite de cabra, não pasteurizado e nem fervido (TENTER et al., 2000; CHIARI e NEVES, 1984).

Os cistos de *T. gondii* presentes em carnes de animais utilizadas para o consumo humano é uma importante fonte de infecção. Estudos recentes mostraram que o predomínio de *T. gondii* em carne diminuiu consideravelmente em áreas onde existe uma inspeção intensiva. Em países como Holanda, Áustria e Alemanha com predomínio de *T. gondii* em carne de porco para o consumo, após medidas sanitárias, a prevalência do *T. gondii* nesses animais diminuiu drasticamente. Considerando estes dados é improvável que a carne de porco seja uma fonte importante de infecção nestes países. No Brasil a prevalência do *T. gondii* em porcos em 1998 era de 61%. No entanto a soroprevalência é distinta em várias espécies animais de diversas regiões geográficas e alguns fatores podem contribuir como: tipo de confinamento desses animais, higiene dos estábulos e diferentes tipos de alimentos (TENTER et al., 2000).

Os oocistos esporulados no ambiente são uma fonte potencial de infecção para humanos e outros hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000). Nas Américas, por exemplo, surtos epidêmicos recentes de Toxoplasmose aguda em seres humanos foram associados com contaminação de oocisto no ambiente, ou seja, água e vegetais (AMENDOEIRA et al., 2003, BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Embora os gatos liberem oocistos durante apenas uma a duas semanas, estes são em grande quantidade (cerca de 100

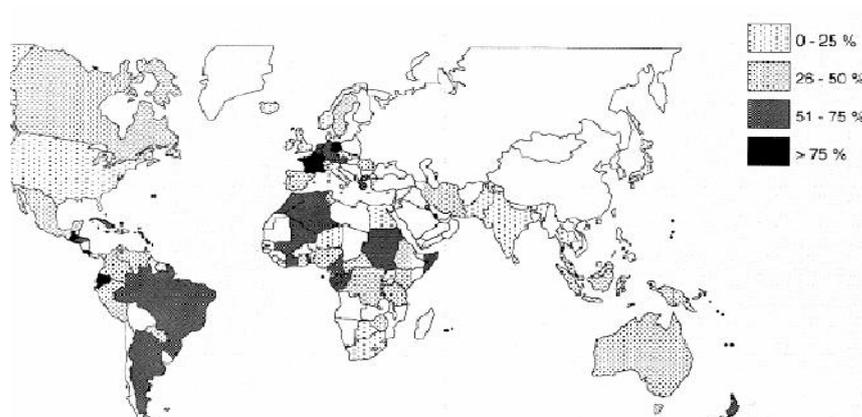
milhões), além disso, os oocistos podem sobreviver no meio ambiente por vários meses — aproximadamente 18 meses em terra úmida e temperatura adequada (CDC, 2005).

Epidemiologicamente, portanto, estudos indicam que nas infecções pelo *T.gondii* o papel do oocisto deve ser considerado como fonte potencial de infecção para seres humanos (HIRAMOTO et al., 2001; SPALDING et al., 2005; TENTER et al., 2000). No Brasil, um exemplo desta fonte de transmissão está apresentado em estudo soroepidemiológico realizados em população indígena do Mato Grosso, os Enawenê-Nawê, que apresentaram uma sorologia positiva para *T.gondii* de 80,4%. Deve-se salientar que estes índios habitam uma vasta região selvagem, com raros contatos não-índios, não possuem animais domésticos, inclusive gatos e sua dieta é baseada em insetos, mandioca, milho, mel e fungos e não se alimentam de carne, exceto peixe. A elevada ocorrência de anticorpos IgG para *T.gondii* deve-se ao fato que os Enawenê-Nawê apresentam uma dieta alimentar diferenciada, principalmente quanto a ingestão de fungos *in natura* localizados nas matas. Provavelmente estes locais devem ser visitados por felinos infectados que contaminam o ambiente com suas fezes (AMENDOEIRA, 2003).

### **2.3 Distribuição geográfica e epidemiologia**

O desenvolvimento de um teste sorológico, em 1948, para Toxoplasmose, realizado por Sabin e Feldman, possibilitou o estudo soroepidemiológico em humanos e outras espécies animais, o que forneceu evidências da larga distribuição e alta prevalência do *T.gondii* em muitas áreas do mundo. Desde então foi calculado que até 1/3 da população humana mundial tinha sido exposta ao parasita. Entretanto, as taxas de prevalência variam de acordo com hábitos sócio-culturais, alimentares, fatores geográficos (a infecção é mais comum em regiões de clima quente-úmido, do que em regiões de clima frio) e faixa etária da população, pois é observada que a infecção aumenta com a idade (COELHO et al., 2003; SPALDING et al., 2005). Assim, após três décadas, anticorpos para *T.gondii* têm sido detectados de 0 – 100% dos indivíduos em várias populações adultas ao redor do globo (**Fig: 4**) (TENTER et al., 2000).

**Figura 4:** Prevalência Global da Toxoplasmose (1993)



**Fonte:** COMBES, 2001.

Em alguns países como El Salvador, Tahiti e França a prevalência de sorologia positiva a partir da quarta década de vida é superior a 90% (CARVALHO e FARHAT, 1999). No Chile a prevalência está em aproximadamente 21,2% (ZAMORANO et al., 1999), no Irã, cerca de 50% (ASSMAR et al., 1997), na Indonésia 42,9% (FAN et al., 2002). Nos Estados Unidos, a soroprevalência está na faixa de 22,5% (JONES et al., 2003).

No Brasil aproximadamente 50 - 80% da população adulta tem sorologia positiva para toxoplasmose (ORÉFICES e BONFIOLI, 2000). A prevalência da doença no território nacional apresenta variações regionais chegando a 82% no Rio Grande do Sul, 42% em São Paulo e 66% no Paraná (GARCIA et al., 1999). Em Pernambuco a taxa entre os indivíduos adultos é de 75% (COELHO et al., 2003) e de 79,1% em crianças entre 9 e 15 anos (KOBAYASHI et al., 2002).

Na economia pecuária a Toxoplasmose também causa significantes perdas econômicas nos animais de produção — suínos, caprinos, bovinos, aves, coelhos — acarretando abortos e nascimento de fetos mal formados. No Brasil a soroprevalência de anticorpos anti *T.gondii* em matadouros no Estado de São Paulo foi de 11% para bovinos, 17% para caprinos e 31% para ovinos (MEIRELES et al., 2003). No Estado do Paraná a soroprevalência entre bovinos é de 54%, suínos 40%, ovinos 79%, eqüinos 50%, cães 84% e gatos 73% (GARCIA et al., 1999) e galinhas 10,3% (GARCIA et al., 2000).

Como descrito, o toxoplasma possui uma vasta distribuição na natureza e seu difícil controle levou Jacobs a afirmar que “*o homem vive num mar de Toxoplasma*” (PESSOA, 1967).

### 3 PATOLOGIA E IMUNIDADE

A toxoplasmose é uma doença pandêmica e, em geral, está clinicamente confinada a grupos de risco, sendo de grande importância médica em duas situações: como causa de infecção congênita e como infecção oportunista de alta mortalidade em indivíduos imunodeprimidos (FERREIRA e BORGES, 2002). Nos hospedeiros imunocompetentes, a infecção é freqüentemente benigna. A toxoplasmose apresenta-se classificada da seguinte maneira: **toxoplasmose congênita, toxoplasmose imunocompetente pós-natal e toxoplasmose no imunodeprimido** (HINRICHSEN et al., 2001).

#### 3.1 Toxoplasmose no imunocompetente pós-natal

A maioria das infecções nestes indivíduos ocorre de forma frustra (cerca de 80%), a parasitemia é autolimitada e controlada especialmente pelo sistema imunológico, resultando numa forma clínica assintomática da doença. Entretanto, cerca de 20% dos casos de infecção aguda podem apresentar um quadro sintomático acompanhado por linfadenopatia febril (manifestação clínica mais significativa), hepatoesplenomegalia, mialgia, e exantema máculo-papular (**Fig. 5**). O quadro, na maioria das vezes, tem regressão espontânea sem seqüelas (HINRICHSEN et al., 2001).

Após este período o parasita permanece viável na forma de cistos de tecidos (bradizoítos), que reproduzem lentamente por toda a vida do hospedeiro, caracterizando deste modo à fase crônica da infecção (TENTER et al., 2000, FERREIRA e BORGES, 2002).

#### 3.2 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular é uma importante das mais importantes manifestações clínicas da infecção pelo *T. gondii*, constituindo uma das principais causa de uveíte em diferentes partes do mundo. No Brasil ela representa cerca de 50 – 80% do total das uveítes. Na

**Figura 5:** Exantema maculo-papular por *T. gondii*



**Fonte:** Universidade de Erlangen Dptº de dermatologia

toxoplasmose ocular podem ser identificadas duas formas distintas: o resultado de uma infecção congênita ou de uma infecção pós-natal. Em ambas o acometimento pode ser precoce ou tardio (SAFADI, 2000; LYNCH et al., 2004). Estudos de múltiplos casos, onde a fonte de infecção foi revelada e datada, demonstraram que o período entre infecção primária e o aparecimento dos sintomas oculares variaram de um mês a 3,5 anos, numa faixa etária de 10 – 57 anos (TENTER et al., 2000).

O *T.gondii* apresenta neurotropismo, devido a isto, a lesão inicial é a retina, alcançando a mesma pela circulação retiniana, ou mais raramente, pela circulação coroídea. A proliferação dos taquizoítos provoca necrose celular resultando retinites necrotizantes, comprometendo as estruturas subjacentes, levando ao termo de retinocoroidite toxoplásmica (TABBARA, 1990). Segundo Lynch et al (2004), as lesões oculares (**Fig. 6**) consiste num foco bem definido de retinocoroidite granulomatosa com necrose única ou multifocal e pode estar associada a outras lesões preexistentes.

Os taquizoítos podem transformar-se em cistos tissulares, que podem permanecer quiescente na retina sadia ou nas cicatrizes da mesma durante anos. Cerca de 60% dos indivíduos acometidos apresentam recorrências

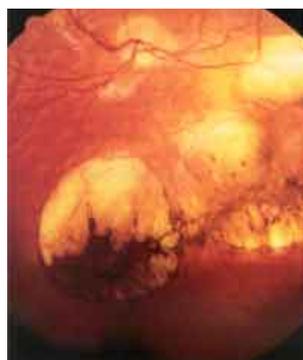
que pode ocorrer nas margens das lesões anteriores ou em áreas longe do foco primário (TABBARA, 1990).

A toxoplasmose ocular adquirida (pós-natal) apresenta retinocoroidite, habitualmente unilateral, enquanto que a congênita é geralmente bilateral. As principais manifestações da toxoplasmose ocular incluem baixa acuidade visual, embasamento e diminuição do campo visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia (SAFADI, 2000).

No Brasil, a região sul é uma das mais afetadas por esta forma clínica da toxoplasmose. Estudos epidemiológicos realizados na população de Erechim, no Rio Grande do Sul, indicaram que 95% da população estavam soropositivos para *T.gondii* e cerca de 20% desta, apresentavam toxoplasmose ocular, segundo os autores esta prevalência é 30 vezes mais alta do que as observadas em outras regiões do mundo (YAMAMOTO et al., 2000).

A lesão ocular predomina em jovens da segunda e terceira décadas e é considerada a maior causa de perda da acuidade visual e cegueira em indivíduos jovens (HINRICHSEN et al., 2001).

**Figura 6:** Retinocoroidite por *T.gondii*



**Fonte:** Lynch et al., 2004

### 3.3 Toxoplasmose congênita

Quando uma infecção primária é adquirida quatro a seis meses antes da concepção a imunidade protetora da mãe, normalmente, prevenirá a transmissão vertical ao feto, exceto naquela com algum comprometimento do sistema imune. Entretanto, se o primeiro contato ocorreu durante a gravidez, existe a possibilidade de o parasita ser transmitido ao feto, mesmo em mulheres imunocompetentes (TENTER et al., 2000).

Para a abordagem correta da toxoplasmose na gravidez é fundamental a caracterização da fase aguda, no entanto, 80% dos casos têm curso subclínico sem qualquer sinal ou sintoma. Os casos com manifestações clínicas geralmente simulam um estado gripal com mialgia e linfadenopatia de curso rápido. O diagnóstico sorológico em tais casos deve ser realizado, e para tal é útil o conhecimento do estado sorológico prévio da gestante para a interpretação correta evitando-se assim, indicação de aborto para fetos sem nenhum risco ou a condutas negligentes em fetos que estão em grande risco de infecção pelo *T. gondii* (DUTRA LEÃO, 2002).

A Toxoplasmose pode passar despercebida no momento do nascimento, porém poderá se manifestar meses ou até anos após a infecção. A ocorrência da gravidade da protozoose e das seqüelas para o feto depende do período gestacional, sendo mais grave no primeiro trimestre, resultando muitas vezes em aborto, no segundo trimestre, podem ocorrer partos prematuros e seqüelas severas para o concepto, tais como a Tétrade de Sabin: microcefalia ou macrocefalia, retinocoroidite, perturbações neurológicas e calcificações intracranianas (**Fig. 7**) (REY, 2002). Entretanto, se ocorre tardiamente, o resultado usual é o parto de um recém-nascido apresentando infecção subclínica (COUTO et al., 2002). Embora estas crianças pareçam saudáveis ao nascimento, elas podem desenvolver sintomas clínicos e deficiências mais tarde em vida. Estas deficiências predominantemente afetam os olhos (retinocoroidites, estrabismo, cegueira), o Sistema Nervoso Central (físicomotorial ou outras deficiências neurológica, convulsões, atraso mental) ou surdez. Calcula-se que 1/3 de crianças infectadas pré-natalmente desenvolverá dano visual (TENTER

**Figura 7:** Macrocefalia e dano visual por *T.gondii*



Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br) – Dr. V. Rhein.

et al., 2000; SPALDING, 2003). Estudo prospectivo realizado em lactentes com Toxoplasmose congênita apresentou em 11% dos casos, doença grave, em 33%, doença leve e em 56% a doença era inicialmente assintomática (SÁFADI, 2000).

As condições ótimas de transmissão ocorrem quando a parasitemia inicial, sobrevém em gestante próxima ao termo, isto é, o risco de infecção fetal aumenta com o decorrer da gestação. Deste modo, a taxa de infecção no primeiro trimestre é de 14%, no segundo de 29% e no terceiro, é de 59%. A gravidade da infecção fetal, ao contrário, diminui à medida que se aproxima ao termo. A explicação para tal fato é que o feto no início da gestação pouco se beneficia da imunidade passiva materna, pois pouca ou quase nenhuma IgG atravessa a barreira placentária. A infecção estabelecida neste momento com sistema imune imaturo permite a ocorrência de uma doença grave. Ao redor da 20ª semana a IgG materna aparece no sangue fetal, em resposta a infecção fetal, mas seus níveis permanecem baixos até a 30ª semana. Após a 30ª semana a quantidade de IgG cresce rapidamente (COUTO, 1998; DUTRA LEÃO, 2002; HINRICHSEN et al., 2001).

Devido às várias manifestações clínicas, que levam a uma elevada morbidade nos recém-nascidos acometidos, ressalta-se a grande importância do rastreamento da toxoplasmose. A infecção fetal pode ser atenuada ou prevenida quando há tratamento materno após um diagnóstico precoce. Em alguns países, como França e Áustria a pesquisa sorológica é, por lei, obrigatória. Tal procedimento reduziu a incidência da toxoplasmose fetal de 40% para 7%. No Brasil aproximadamente 30% das gestantes (Recife – 28,2%, Cuiabá – 29,3%, Rio Grande do Sul – 25,5%) possuem sorologia negativa para toxoplasmose estando, estas gestantes sob o risco de contaminação (NÓBREGA et al., 1999; SPALDING et al, 2003; DUTRA LEÃO et al., 2004).

### **3.4 Toxoplasmose no imunodeprimido**

Nos indivíduos portadores de doenças imunossupressoras (leucemia, linfomas, agamaglobulinemia, AIDS), ou em vigência de terapêutica imunossupressora, a infecção por *T.gondii* pode assumir formas graves e fatais (SÁFADI, 2000). A doença tornou-se um problema preocupante, a partir dos anos 80, com a epidemia da AIDS, pois a imunodeficiência possui capacidade de agudizar as formas crônicas (císticas) da infecção, tornando-a uma das principais causa de morte dos aidéticos (REY, 2002). Especialmente em indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, o *T. gondii* apresenta-se como importante patógeno oportunista, podendo ocorrer comprometimento neurológico (encefalite

e mielopatia), pulmonar (pneumonite), cardíaco (miocardite) e ocular (retinocoroidite) (HINRICHSEN et al., 2001).

O quadro neurológico da toxoplasmose é uma das principais manifestações em indivíduos HIV, sendo uma doença definidora de AIDS. O comprometimento do SNC pela toxoplasmose representa cerca de 40% do total das doenças oportunistas nesses indivíduos, destes 10 – 30% sucumbe à doença (TENTER et al., 2000). A neurotoxoplasmose ocorre mais freqüentemente como reativação de foco infeccioso latente, é mais comum em pacientes com uma contagem de linfócitos TCD4+, em sangue periférico, abaixo de 200/mm<sup>3</sup>. A toxoplasmose tornou a causa mais comum de encefalite em HIV nos Estados Unidos entre os anos 80 - 90. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, a toxoplasmose chega a 15,4% das principais doenças oportunistas que afeta este grupo de risco e quando não diagnosticada e tratada cedo tem curso clínico fatal (FERREIRA e BORGES, 2002; Manual de Cond. Médicas - MS, 2004).

### **3.5 Imunidade na toxoplasmose**

Os mecanismos relacionados à resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos do *T.gondii* continuam ainda sem resposta clara. Embora existam estudos referentes à avaliação da resposta imune em indivíduos infectados, ainda não se conhece todo o mecanismo envolvido no controle da infecção. No entanto, o estabelecimento de uma fase crônica assintomática, deixa clara a associação da modulação da resposta imune no hospedeiro infectado (COUTO et al., 2002).

O *T. gondii* infecta diversos tipos de células através de um processo ativo, ao penetrar em macrófagos por uma via não fagocítica, evita o desencadeamento do processo oxidativo e impede a fusão dos lisossomos no vacúolo parasitóforo (VP), formado ao penetrar na célula (HENRICHSEN et al., 2001). A resposta imune ao parasita se dá por ação humoral e celular, sendo a última de grande importância para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (FERREIRA e BORGES, 2002).

Uma série de estudos experimentais demonstrou a importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que agem sinergicamente na prevenção da reativação da doença. Estes linfócitos representam uma fonte importante de IFN- $\gamma$  que é responsável pela resistência durante a fase crônica da doença e pela ativação de macrófagos que promove a morte intracelular do parasita. A infecção é reativada devido à redução da expressão de IFN- $\gamma$ . Além disso, macrófagos ativados, células NK e diferentes tipos de citocinas como IL 2, IL 12 são também

de importância para resposta imune contra o *T.gondii*. É importante salientar que a resposta imune representa um somatório de interações entre a resposta celular e humoral. Assim, a modulação da resposta do hospedeiro a antígenos do *T.gondii*, não deve ser limitada, restrita a funções celulares. O papel da imunidade humoral, também é de fundamental importância no controle da doença, como será abordado (HENRICHSEN et al., 2001).

## 4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da toxoplasmose apresenta-se como um dos mais complexos e em contínua evolução. A maioria das publicações nos últimos anos sobre metodologia diagnóstica se dedicaram à busca de técnicas que possam diferenciar entre infecções subclínicas (latentes) e infecção ativa. No entanto tal busca não tem sido fácil. O grande número de indivíduos infectados assintomáticos possui uma resposta imune (basal) variável. Esta variação de intensidade da resposta imune faz com que exista uma grande variação de cut off em várias regiões e o que parece ser normal para uns para outros não o são. Além disso, o *T. gondii* é um parasita complexo apresentando formas evolutivas ativas (taquizoíto) e latentes (císticas) no mesmo hospedeiro, dificultando o diagnóstico (TENTER et al., 2000).

### 4.1 Diagnóstico Parasitológico

A infecção produzida por *T. gondii* apresenta uma parasitemia muito fugaz e só observada na fase aguda da infecção, pois o rápido avanço da imunidade restringe a proliferação do parasito (CAMARGO, 1996).

Em geral a demonstração do parasito no sangue e /ou outros fluidos biológicos estabelece um diagnóstico de fase ativa. O diagnóstico parasitológico utiliza técnicas de isolamento do parasito em meios de cultura, inoculação em camundongos e diagnóstico histológico (SÁFADI, 2000; CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

Os materiais biológicos utilizados para tais diagnósticos podem ser oriundos da camada leucocitária do sangue, do Líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido amniótico, lavado brônquico alveolar, suspensões de triturados de biópsia ou placenta. Estes materiais podem ser inoculados por via intraperitoneal em camundongos, semeados em cultura de células ou preparados para exames histopatológicos. A detecção da positividade do teste é realizada da seguinte maneira: **1-** Isolamento em camundongos — achado de taquizoíto no líquido peritoneal; **2-** Cultivo de células — presença de taquizoítos no interior das células ou livres no meio; **3-** Histopatológico — presença do parasita (taquizoíto ou cisto – bradizoíto) presente no material seccionado (SÁFADI, 2000; CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

Essas técnicas, no entanto não são utilizadas de rotina, pois necessitam de pessoal qualificado para coleta e realização dos testes, estrutura adequada e alguns métodos são invasivos levando a alguns riscos. Além disso, a obtenção dos resultados requer às vezes,

prazos longos, alguns testes possuem baixa sensibilidade o que pode levar a resultado falso negativo.

## 4.2 Diagnóstico Molecular

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) forneceu um grande avanço no diagnóstico da Toxoplasmose, a detecção de segmentos do DNA do *T.gondii* em fluidos corpóreos e tecidos tem sido usada com sucesso no diagnóstico da Toxoplasmose congênita, ocular, cerebral e disseminada. Os genes P30, TRG1, B1 ou DNA ribossomal são preferidos pela sua maior sensibilidade (CAMARGO, 2001; MONTROYA, 2002).

O uso da PCR forneceu um grande avanço no diagnóstico pré-natal da Toxoplasmose, permitindo o diagnóstico em amostras de líquido amniótico, sem haver coleta percutânea de sangue do cordão umbilical do feto. Além disso, também permite o diagnóstico da infecção antes das 20 semanas de gestação o que é de vital importância, pois o diagnóstico imunológico de infecção fetal antes das 20 semanas não é recomendado devido à imaturidade do sistema imune (SÁFADI, 2000; AMENDOEIRA, 2001).

Deve-se salientar que embora a PCR tem ajudado significativamente, no diagnóstico da infecção por *T.gondii* em gestantes durante o pré-natal, auxiliando na detecção da toxoplasmose congênita. Não obstante, a PCR sofre de falta de padronização conduzindo a um desempenho variável de acordo com o laboratório e há ainda lacunas e novos parâmetros técnicos devem ser achados para evitar suas limitações (KOMPALIC-CRISTO et al., 2004).

## 4.3 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico da infecção pelo *T.gondii*, está classicamente baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasita, no entanto outras metodologias diagnósticas podem ser utilizadas, caso a sorologia continue duvidosa. Serão abordadas a seguir as técnicas diagnósticas sorológicas empregadas, atualmente, em toxoplasmose.

### 4.3.1 Reação de Sabin - Feldman ou Prova do Corante

Descrito por Sabin e Feldman em 1948, este método se baseia no fato de que em meio alcalino (pH 11) os toxoplasmas vivos se coram intensamente com uma solução de azul de metileno, os parasitas assumem forma arredondada ou ligeiramente oval. Incubando-os, no

entanto, com soro contendo anticorpos, os parasitas perdem a sua afinidade tintorial de modo que só o núcleo aparece corado, ficando o citoplasma incolor. Além disso, sua forma se altera apresentando-se mais delgada, falciforme (PESSOA, 1967).

A reação também é quantitativa permitindo demonstrar os anticorpos mesmo em diluições muito elevadas do soro (diluição de 1: 16.000 ou mais, durante a fase aguda da infecção). Este teste detecta primariamente anticorpos IgG que normalmente são observados 1 – 2 semanas após a infecção, alcançando o pico em 6 – 8 semanas, e então gradualmente declinam (CAMARGO, 2001).

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade a reação de Sabin – Feldman é considerada **padrão ouro**, entretanto, este tipo de diagnóstico encontra-se em desuso pelo fato utilizar Toxoplasmas vivos, sendo disponível apenas em centros de pesquisas (CAMARGO, 2001).

#### *4.3.2 Determinação de imunoglobulinas anti-T. gondii*

O diagnóstico de rotina laboratorial para Toxoplasmose se baseia na análise das imunoglobulinas no soro e outros líquidos biológicos.

##### *4.3.2.1 Detecção de IgM*

Os anticorpos IgM são detectados entre 7 e 15 dias após a infecção, atingindo pico em 1 mês após a contaminação, quando a sua concentração diminui progressivamente (COUTO et al, 2002).

A pesquisa de anticorpos IgM é realizada através de imunofluorescência (utilizando taquizoítos íntegros) e ELISA (utilizando antígeno particulado do parasita). Entretanto a técnica de IFI leva a resultados falso positivos pela interferência com Fator Reumatóide (FR). O desenvolvimento de técnicas de captura de IgM ( ISAGA, fluorométrico - VIDAS) possibilitou eliminar os resultados falsos positivos, no entanto tais metodologias detectam a presença da IgM um ano ou mais após a infecção, podendo levar a interpretações errôneas (CAMARGO, 2001, MONTOYA, 2002).

#### 4.3.2.2 Detecção de IgG

Os anticorpos IgG são detectados após 2 semanas de infecção. Na ausência do tratamento atingem concentrações máximas após 1- 2 meses, mantendo-se elevados por 3 a 4 meses e a seguir decrescem a concentrações variáveis permanecendo nesses níveis por um período indeterminado, geralmente por toda vida do hospedeiro. A IgG é considerada marcador de fase crônica e anticorpo de memória (CARVALHO e FARHAT, 1999; COUTO et al., 2002). Em indivíduos com reativação da infecção os títulos de IgG aumentam

A detecção da IgG pode ser realizada através dos seguintes métodos: ELISA, Imunofluorescência Indireta e Hemaglutinação.

#### 4.3.2.3 Detecção de IgA

Os anticorpos IgA em níveis elevados, estão presentes em todos os casos de toxoplasmose sistêmica aguda e congênita. A IgA se eleva quase ao mesmo tempo que os anticorpos IgM, entretanto negativa com 6 a 8 meses após a infecção. Entretanto, a IgA se eleva, novamente, em reativação da infecção. (DUTRA LEÃO, 2002).

Alguns dados da literatura relatam a elevação da IgA em indivíduos com reativação de infecção latente. Estudos realizados por Lynch (2004) demonstraram a elevação dessa imunoglobulina no soro de indivíduos com reativação da toxoplasmose ocular. Além disso, Lynch (2004) relata a elevação da IgA secretória na lágrima desses indivíduos, demonstrando dessa maneira a produção local do anticorpo. O aumento local da IgA também, foi detectado em líquido de indivíduos alérgicos com neurotoxoplasmose (FERREIRA e BORGES, 2002).

#### 4.3.2.4 Detecção de IgE

A IgE até o momento se mantém pouco estudada, recentes pesquisas realizadas por Gómez-Marin (2000) estudando casos de reativação ocular por *T.gondii* e toxoplasmose adquirida e congênita respectivamente detectaram a elevação de IgE no soro desses indivíduos, demonstrando a possibilidade da utilização dessa imunoglobulina como marcador de infecção ativa. Entretanto os estudos deverão ser intensificados.

#### 4.3.2.5 Avidéz da IgG

O teste de avidéz foi desenvolvido por Hedman et al (1989) com o objetivo de discriminar infecção recente e passada na Toxoplasmose. O resultado é baseado na medida de afinidade do anticorpo IgG aos antígenos do *T. gondii* (REMINGTON et al., 2004).

Nas reações antígeno – anticorpo, a interação é realizada por meio de ligações atrativas (pontes de hidrogênio, ligações eletrostática e forças de Van Der Waals), a quebra com maior ou menor facilidade dessa ligação mede a avidéz (constante de associação em equilíbrio,  $K_a$ ) com que um anticorpo se liga ao seu respectivo antígeno. Em qualquer resposta imunológica primária, os anticorpos desencadeados por um estímulo antigênico inicialmente apresentam baixa avidéz a medida que a resposta imunológica amadurece a avidéz aumenta (SHARON, 2000; CAMARGO, 2001; COUTO et al., 2002).

O teste para determinar a avidéz da IgG é o ELISA – Uréia 6M. A utilização de agentes desnaturantes como a uréia rompem as ligações fracas (baixa avidéz). O teste é realizado em duas etapas: primeiramente com soro tratado com uréia e medida a densidade ótica e uma segunda parte com soro não tratado com uréia. O resultado é fornecido pela relação da densidade ótica entre o soro tratado com uréia e o sem tratamento, multiplicado por 100, determinando assim a percentagem da avidéz. Percentagens de avidéz de IgG inferiores a 30% sugerem infecção aguda ou que tenha ocorrido nos últimos três meses; índices superiores a 60% indicam doença progressa, que tenha acometido o indivíduo a mais de três meses (LESER, 2005).

Um ponto crítico no teste da avidéz para IgG é o fato de que em alguns resultados, a baixa avidéz (<30%) não significa infecção recentemente adquirida, pois a baixa avidéz para IgG pode persistir por um período longo, aproximadamente 1 ano. Um outro problema é um número significativo de resultados inconclusivos (30% - 60%), isto é não confirma infecção recente ou passada (REMINGTON et al., 2004).

#### 4.3.2.6 Anticorpos Monoclonais

O uso de anticorpo monoclonal na captura de antígenos circulantes no soro ou outros líquidos biológicos, em indivíduos infectados com *T. gondii* está atualmente limitado à pesquisa científica. Os monoclonais atualmente mais estudados estão direcionados a antígenos caracterizados do parasita como o P30 (SAG1), P22 (SAG2), ambos, proteínas da membrana de taquizoíto e NTPase, proteína citoplasmática também de taquizoíto (ASAI et al., 1992;

CHAVES-BORGES et al, 1999; CASTAÑO OSÓRIO et al., 2001 ). O P30 já está disponível comercialmente em KITS de ELISA (Roche), sendo utilizado na detecção indireta de anticorpo para P30.

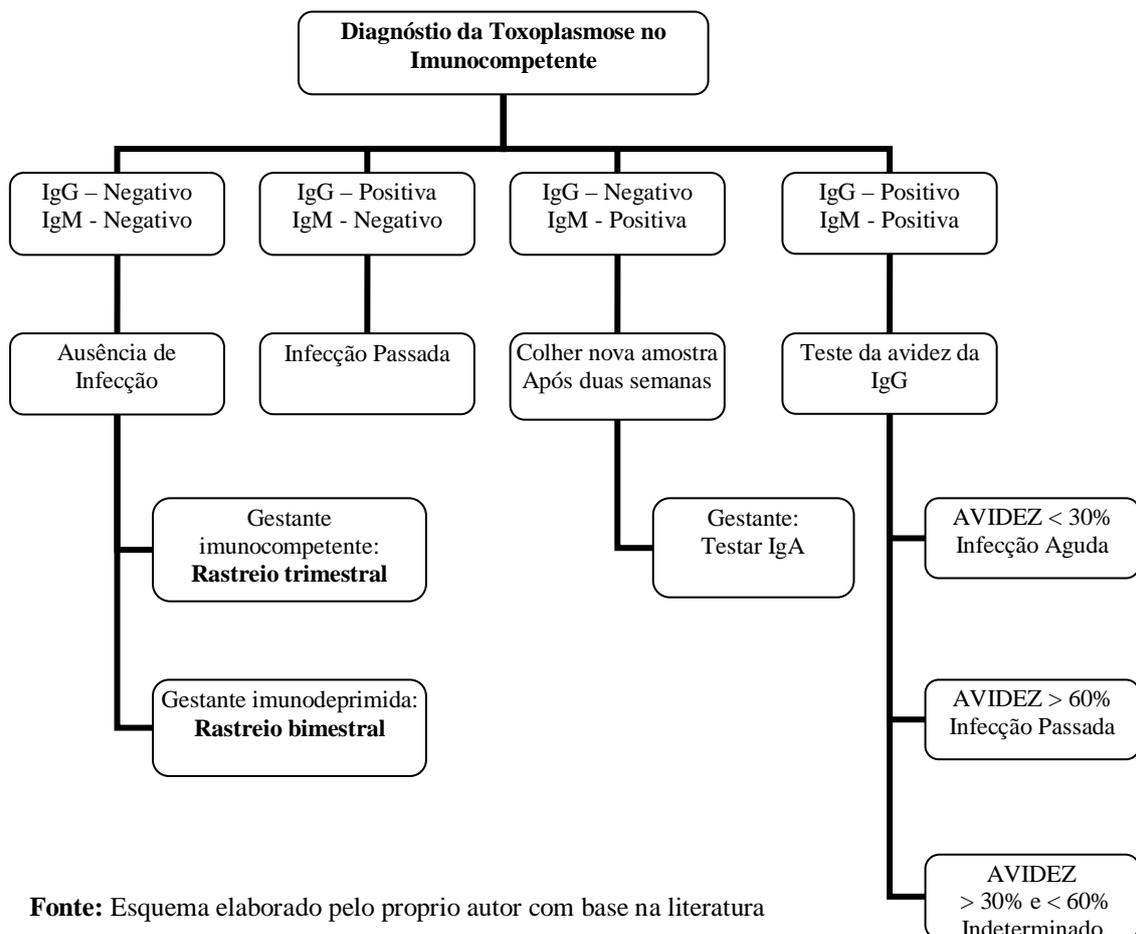
#### 4.4 Fluxogramas do Diagnóstico da Toxoplasmose

Devido às dificuldades existentes na elucidação do diagnóstico de infecção recente (ativa) ou tardia da toxoplasmose, através de um único método diagnóstico, a associação de várias metodologias pode ser mais efetiva, formando um verdadeiro fluxograma.

##### 4.4.1 Fluxograma do diagnóstico no imunocompetente

No imunocompetente o diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é, basicamente, sorológico (**Fig 8**). A primoinfecção é indicada pela soroconversão com ou sem manifestações clínicas de fase aguda da toxoplasmose (CAMARGO, 2001).

**Figura 8:** Fluxograma do Diagnóstico da Toxoplasmose no Imunocompetente



**Fonte:** Esquema elaborado pelo proprio autor com base na literatura

Na gestante o fluxograma apresentado acima é de grande importância na prevenção da toxoplasmose congênita. No Brasil aproximadamente 30% das gestantes são soronegativas para toxoplasmose. A condição de soronegatividade aliada a uma prevalência de cerca de 80% da infecção no nosso meio (uma prevalência maior de soropositividade é um indicador de maior exposição da população aos fatores determinantes da infecção), faz com que estas gestantes corram um elevado risco de soroconverter na vigência de uma gravidez (NÓBREGA et al., 1999; VARELLA et al., 2003; SPALDING et al., 2003).

Em alguns países com alta prevalência como Áustria, Bélgica e França o programa de rastreio para detecção imediata e tratamento de infecções pelo *Toxoplasma* durante a gestação foi implantado. As gestantes não imunes realizam rastreio cada trimestre, para detectar soroconversão. No Brasil um programa de rastreio ainda não foi estabelecido (VARELLA et al., 2003). É importante notificar que as gestantes soronegativas quando infectadas pelo *T.gondii* usualmente apresentam uma infecção assintomática, aparentemente elas têm uma resposta imunológica adequada e pronta. Sintomas semelhantes à influenza, de curta duração, ocasionalmente enfartamento ganglionar às vezes são relatados (FRENKEL, 1996; NOGUEIRA et al, 2002).

Particular atenção deve ser dada as gestantes imunodeprimidas, pois as manifestações sintomáticas dependerão dos níveis de CD4, a maioria desse grupo de risco apresenta um perfil sorológico de toxoplasmose crônica (IgG positiva e IgM negativa) podendo ter reativação da infecção a qualquer momento da gestação, nesse caso a avaliação deverá ser a cada dois meses (NOGUEIRA et al., 2002; Manual de condutas médicas - MS).

#### 4.4.2 Fluxogramas do diagnóstico na infecção congênita

O *T. gondii* pode atingir o feto a partir da parasitemia materna e conseqüentemente infecção da placenta. Quanto mais desenvolvida, melhor irrigação, maior facilidade de infecção. A média global geral de infecção fetal das gestantes que apresentaram soroconversão está na faixa de 30 – 40%. O diagnóstico fetal é recomendado quando se estabelece um diagnóstico de Toxoplasmose adquirida durante a gravidez, tendo como referência provas sorológicas. O esquema abaixo (**Fig. 9**) descreve as provas utilizadas no diagnóstico fetal (CAMARGO, 2001).

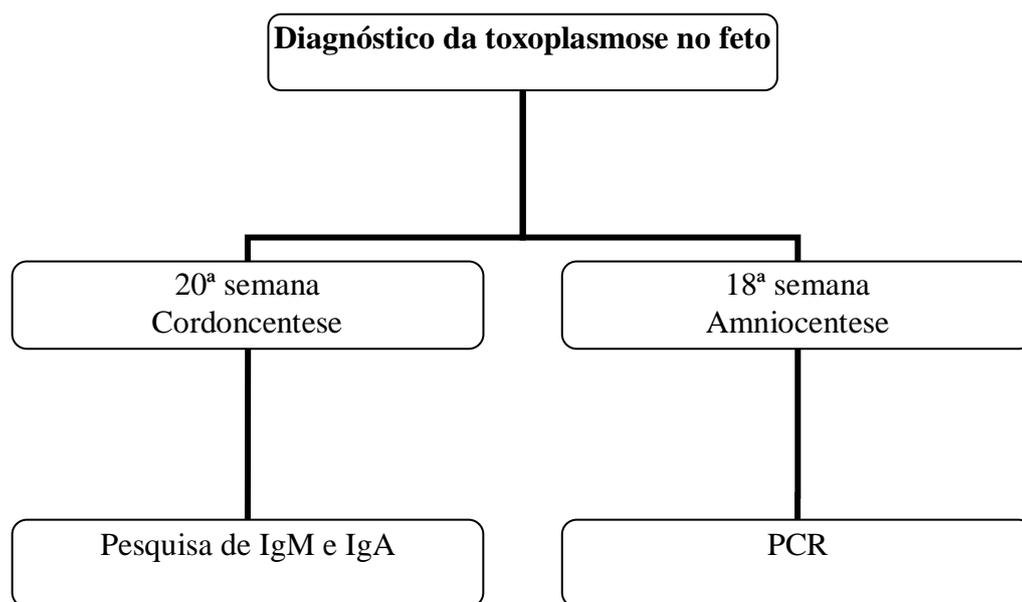
A cordoncentese (punção da veia umbilical) é realizada na 20ª semana de gravidez, buscando identificar IgM ou IgA contra o parasita. O fator limitante é a imaturidade

imunológica, apenas 30 – 50% dos fetos infectados apresentam positividade para IgM e IgA nesta fase (CAMARGO 2001, MONTOYA 2002).

A identificação do DNA parasitário através de PCR tem uma sensibilidade de 92%, podendo ser realizada no líquido amniótico (16<sup>a</sup> - 18<sup>a</sup> semanas) com menores riscos para o feto. É um exame que está limitado, ainda, aos grandes centros. Além disso, pela sua sofisticação e custo, só é realizado após certeza de que a mãe está na fase aguda (CAMARGO 2001; DUTRA LEÃO, 2002; MONTOYA, 2002).

Outros métodos como inoculação em camundongo também pode ser realizado com sangue fetal (cordocentese) ou líquido amniótico (amniocentese), entretanto necessita de 3 a 6 semanas para obter resultado, a cultura de células pode ser realizada com menos tempo — 4 a 5 dias — mas, possui pouca sensibilidade (MONTOYA, 2002).

**Figura 9:** Fluxograma do diagnóstico de toxoplasmose no feto.



**Fonte:** Esquema elaborado pelo proprio autor com base na literatura

A infecção pelo *T.gondii* no recém-nascido, ao contrário da rubéola que ocorre durante toda a gravidez, a taxa de infecção fetal é diretamente proporcional à idade gestacional. As condições de transmissão ótimas ocorrem quando a parasitemia inicial sobrevém em gestante próxima ao termo. A infecção no recém-nascido pode ocorrer inadvertidamente no momento do nascimento e pode se manifestar meses ou anos após a contaminação (COUTO, 1998; AMENDOEIRA, 2001; CAMARGO, 2001; DUTRA LEÃO, 2002).

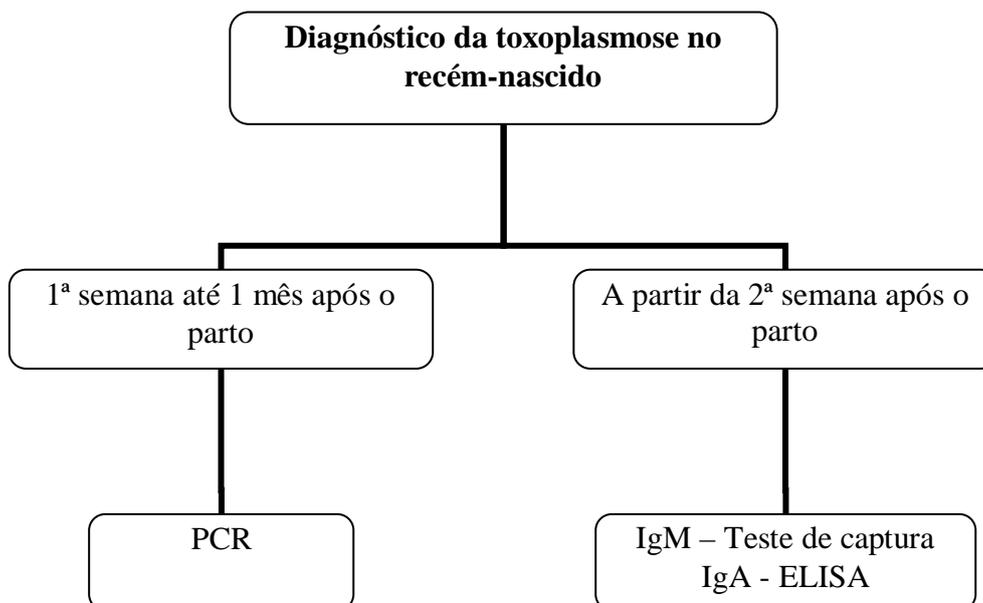
O diagnóstico neonatal de toxoplasmose é realizado através do exame físico geral, exames oftalmológicos, neurológicos, tomografia computadorizada crânio-encéfalo, isolamento do parasita, detecção de anticorpos, análise do LCR (Líquido céfalo-raquidiano) e PCR (BEHRMAN et al., 2002; CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

Deve-se salientar que as medidas diagnósticas deverão ser executadas mediante um acompanhamento prévio (pré-natal) da gestante de risco, que no caso incluem as soronegativas e aquelas com alguma forma de imunossupressão.

O diagnóstico de rotina (**Fig.10**) do neonato está ligado à detecção de imunoglobulinas no soro e no LCR. Entretanto a cinética de produção das mesmas deve ser avaliada com cautela. O perfil sorológico do recém-nascido é comparado com o perfil sorológico materno; o soro do recém-nascido não infectado irá originar um perfil semelhante ao materno, caso infectado produzirá seus próprios anticorpos (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002) .

Os anticorpos a serem detectados são IgM, IgA e IgG. Entretanto a presença de anticorpos IgG no recém-nascido não é evidencia de infecção, visto que a IgG materna atravessa a placenta. Os anticorpos IgG maternos transferidos passivamente levam alguns meses (ou até 1 ano) para desaparecer do soro do lactente, de acordo com a magnitude do título original (BEHRMAN et al., 2002; CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002) .

**Figura 10:** Fluxograma do diagnóstico de toxoplasmose no recém-nascido



**Fonte:** Esquema elaborado pelo proprio autor com base na literatura

A detecção de IgM é de grande valor diagnóstico, pois indica síntese de anticorpo pelo neonato, entretanto ele pode não estar presente devido a imaturidade do sistema imune, devendo ser repetida 1 a 2 meses após o nascimento. Além disso, a técnica de escolha para detecção desse anticorpo deve ser o teste de captura da IgM para eliminar os falsos positivos, devido a reações cruzadas com o fator reumatóide que é muito frequente em neonatos (BEHRMAN et al., 2002; CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

A detecção de IgA também tem sido recomendada no diagnóstico da infecção neonatal, aparecendo tão ou mais sensível quanto a detecção de IgM (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

A produção de IgM ou IgG no LCR demonstra produção local, estabelecendo assim diagnóstico definitivo de infecção congênita (BEHRMAN et al., 2002).

Caso as dúvidas sobre a infecção persistam o PCR é o método a ser utilizado, podendo ser realizado no sangue venoso até um mês do nascimento (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

#### 4.4.3 Fluxograma do diagnóstico da infecção no imunodeprimido

Nos indivíduos imunodeprimidos (HIV) e nos transplantados, a Toxoplasmose apresenta quadros graves na primoinfecções e nas frequentes reativações de infecções latentes (CAMARGO, 2001).

Nos transplantados ou aqueles com doenças malignas, previamente infectados pelo *T.gondii*, apresentam um perfil sorológico compatível com reativação, isto é aumento de IgG e IgA (CAMARGO, 2001; FERREIRA e BORGES, 2002).

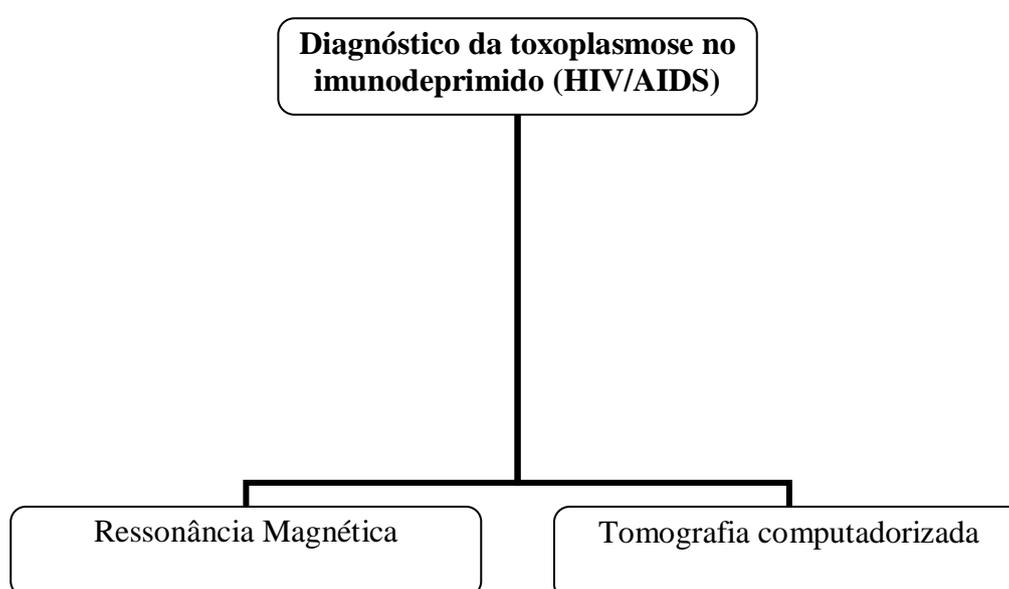
Depois da ocorrência da AIDS, a Toxoplasmose tornou a causa mais comum de encefalite. Nesses indivíduos a doença normalmente é resultado da reativação da infecção crônica com alta prevalência (40%) de encefalite causada por *T.gondii* (CAMARGO, 2001; FERREIRA e BORGES, 2002).

O diagnóstico precoce de neurotoxoplasmose em HIV tem sido limitado devido à falta de testes não invasivos de alta sensibilidade e especificidade (FERREIRA e BORGES, 2002). O diagnóstico imunológico é dificultado pelo perfil anômalo sorológico. O padrão sorológico se comporta de maneira semelhante a um perfil de infecção latente, ou seja, não há detecção de IgM e não há elevação de IgG. O LCR encontra-se normal ou apresenta alterações não específicas (CAMARGO, 2001; FERREIRA e BORGES, 2002; MONTOYA, 2002).

Em termos gerais o diagnóstico no indivíduo imunodeprimido está restrito a exames de análise de imagem (**Fig 11**), como a tomografia computadorizada do crânio-encéfalo demonstrando lesões iso ou hipodensas uni ou multifocais e a ressonância magnética do crânio-encéfalo, demonstrando lesões iso ou hipodensas, únicas ou múltiplas (OSBORN, 1999).

O uso da PCR em pacientes com AIDS e encefalite por *Toxoplasma* é somente úteis nos casos de infecção disseminada (FERREIRA e BORGES, 2002).

**Figura 11:** Fluxograma do diagnóstico da toxoplasmose em imunodeprimido (HIV/AIDS).



**Fonte:** Esquema elaborado pelo proprio autor com base na literatura

#### 4.4.4 Fluxograma do diagnóstico da infecção na toxoplasmose ocular

O diagnóstico da Toxoplasmose ocular está apoiado, freqüentemente, em aspectos clínicos típicos, como a presença de uma lesão ativa branco-amarelada com cicatriz pigmentada e perivasculite. Entretanto outras causas podem conduzir ao mesmo aspecto clínico. O diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico diferencial de tais lesões (LYNCH et al, 2004).

No diagnóstico da Toxoplasmose ocular, geralmente não há correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e a sintomatologia ocular, sendo comum à ocorrência de títulos baixos (ORÉFICES e BONFIOLI, 2000). Caracteristicamente a lesão ocular pelo *Toxoplasma* tem, como uma das marcas imunológicas, a produção intraocular de anticorpos

antitoxoplasma, devido a isto temos a carga de anticorpos no humor aquoso maior que a carga respectiva no soro, o que indicaria toxoplasmose ocular ativa. Isto expressa o índice de Desmonts-Witner, dado pelo quociente entre ambas as cargas. A aplicação desse índice resultou um nítido aumento da sensibilidade diagnóstica nos casos atípicos de toxoplasmose ocular (CAMARGO, 2001; LYNCH et al, 2004).

A avidéz da IgG no humor aquoso, constitui um bom marcador, em contraste com alta avidéz no soro (CAMARGO, 2001). A detecção de IgA ocular também tem sido estudada como um bom marcador, Lynch et al (2004) relataram uma forte associação entre a doença e a produção lacrimal de IgA, demonstrando essa imunoglobulina ser um auxílio no diagnóstico da toxoplasmose ocular. Pesquisas para detecção do DNA do parasita, também estão sendo avaliadas com a técnica de PCR (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

#### **4.5 Proteômica – O Futuro**

A seqüência genômica e/ou a seqüência **tag** expressada (EST) já estão agora disponíveis em bancos de dados para muitos protozoários de importância médica e veterinária, o que revolucionou o estudo dos genes funcionais destes organismos. No passado, dificuldades práticas consideráveis, impossibilitavam a análise da expressão gênica, agora, milhares de genes podem ser monitorados simultaneamente para caracterizar eventos moleculares que ocorrem durante processos biológicos fundamentais, como crescimento e diferenciação parasitária (COHEN et al., 2002).

Os avanços presentes na genômica possibilitaram novos desafios; a obtenção da seqüência gênica não é agora mais um passo limitado, de forma que desenvolver e empregar métodos, para identificar qual dos milhares de genes expresso por um organismo é relevante para questões biológicas em particular se tornou uma prioridade. Este imperativo tem conduzido ao desenvolvimento denominado tecnologia pós-genoma como análise de microarray para caracterização de expressão global de mRNA e análise proteômica de expressão global de proteínas (COHEN et al., 2002).

Os avanços na separação de proteínas na eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa têm capacitado a proteômica tornar-se uma tecnologia fundamental para a investigação de proteínas durante processos celulares, validação e caracterização de novos alvos terapêuticos, diagnóstico e análise toxicológica (COHEN et al., 2002., ZHOU et al., 2004).

O estudo da seqüência genômica do *T. gondii* está mais limitada nos bancos de dados de EST e os estudos proteômicos estão sendo inicializados e muitos estão voltados para a chave da patogênese da toxoplasmose, a transição de bradizoíto para taquizoíto, e mecanismos da resposta imune que envolve este parasita. A caracterização dos genes e expressão de proteínas dentro das diferentes fases do protozoário são essenciais para entender os mecanismos pelo qual o mesmo tem sucesso como parasita intracelular. Além disso, é importante salientar que as pesquisas neste campo são importantes para detectar os genes e as proteínas para a obtenção de antígenos diagnósticos, vacinas e drogas terapêuticas para este importante parasita de humanos e animais (JOHNSON et al., 1989; COHEN et al., 2002; KISSINGER et al., 2003; BANNENBERG et al., 2004; ZHOU et al., 2004).

## 5 NUCLEOSIL TRIFOSFATO HIDROLASE (NTPASE)

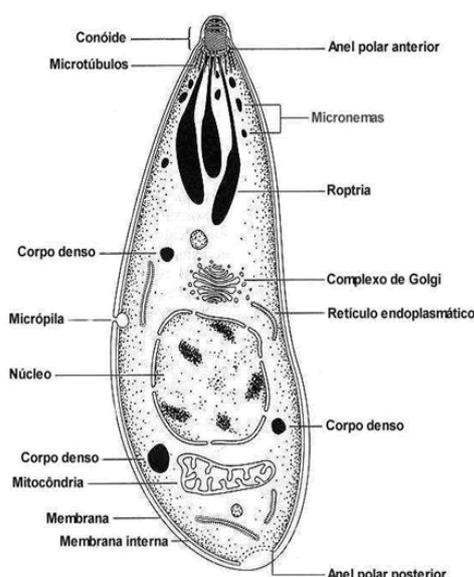
A NTPase é uma Nucleosil Trifosfato Hidrolase de taquizoítos de *T.gondii* descrita por Asai (1983). A NTPase exibe uma alta atividade enzimática na hidrólise do ATP e ADP em presença de compostos ditioneitol. Apresenta um peso molecular de aproximadamente 240 – 260 kDa, sendo formada de quatro subunidades de cerca de 63 kDa. A enzima está presente em outros protozoários, no entanto em *T.gondii* a NTPase apresenta uma elevada atividade (ASAI et al, 1983; ASAI et al 1986).

A NTPase é uma das principais proteínas constituintes do taquizoíto, cerca de 8% do total das proteínas citosólicas e está localizada em pequenas vesículas chamadas de grânulos denso (Fig. 12), espalhada em todo o citoplasma celular. Após a invasão da célula hospedeira, a NTPase é secretada dos grânulos denso para o lúmen do vacúolo parasitóforo, onde está frequentemente associada a rede vacuolar (ASAI et al., 1987; SIBLEY et al., 1994). Entretanto estudos de microscopia eletrônica, realizados por Kikuchi (2001), utilizando anticorpo monoclonal (6C6 – IgG<sub>1</sub>) também localizou esta enzima na membrana de taquizoítos.

A NTPase foi codificada por Johnson et al (1989), o gene *ntp* é formado por 571 pares de base e um mRNA com aproximadamente 2800 nucleotídeos.

Asai et al (1995) identificou a presença de duas isoformas de NTPase presente em cepas de *T.gondii*, NTPase I e NTPase II. As duas enzimas têm massas moleculares semelhantes, e contém quatro subunidades idênticas. Ambas as formas são ativadas por compostos ditioneitol, entretanto a NTPase I hidrolisa ATP cerca de 75 vezes mais eficiente do que ADP, enquanto NTPase II hidrolisa ATP e ADP semelhantemente isto é, com baixa eficiência. Cepas avirulentas de *T.gondii* (Berveley, FuKaya, Nakayama) contém apenas NTPase II, enquanto cepas virulentas (RH) apresentam NTPase I e II (ASAI et al., 1995; KIKUCHI et al., 2001).

**Figura 12:** Esquema estrutural de taquizoíto de *T.gondii*.



Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

A NTPase apresenta várias funções entre elas a função reguladora no crescimento e replicação do parasita, pois a enzima abastece o *T.gondii* com purinas (essencial para multiplicação do parasita), através da hidrólise do ATP e ADP da célula hospedeira (HOFF e CARRUNTERS, 2002). Devido a isto, a NTPase possui grande atividade em taquizoítos e baixa atividade em bradizoítos (NAKAAR et al., 1999).

A NTPase está envolvida no mecanismo de infecção. O parasita para entrar na célula anexa o sistema apical à membrana da célula hospedeira e secreta proteínas das micronemas, roptrias e grânulos densos (produtores de NTPase). Experimentos com taquizoítos tratados com anticorpo monoclonal anti-NTPase demonstraram a inibição da invasão em células vero (KIKUCHI et al., 2001; HOFF e CARRUNTERS, 2002).

A existência de uma grande quantidade de NTPase em taquizoíto, levantou a possibilidade da mesma ser detectada como antígeno circulante no sangue de indivíduos infectados e também um alvo em potencial para quimioterapia (ASAI et al., 1987; NAKAAR et al., 1999; ASAI et al., 2002).

Baseando-se nas potencialidades desta enzima, vários estudos foram surgindo, sobretudo em abordagem diagnóstica. Asai et al (1987) e Kikuchi et al (2002) utilizando anticorpos monoclonais anti-NTPase, detectaram a presença de NTPase em soro de camundongos infectados com cepas virulentas a avirulentas de *T.gondii*. Os autores obtiveram os mesmos resultados em animais inoculados com a cepa virulenta, a NTPase foi detectada com apenas um dia após a infecção e aumentou gradativamente chegando ao pico em 5 a 6 dias, onde todos os animais estavam mortos. Nos camundongos inoculados com cepas avirulentas a NTPase foi detectada ao redor do 7º - 14º dia após a infecção, diminuindo em seguida. Asai et al (1987) detectaram a NTPase até o 56º dia e Kikuchi et al (2002) não detectaram a enzima após o 21 dia pós-infecção.

Anticorpos anti-NTPase em soros humanos, foram detectados por Asai et al (1992) e os resultados comparados com a reação de Sabin-Feldman (teste do corante), considerada padrão ouro. Foram estudados 37 indivíduos positivos para *T.gondii* e 50 indivíduos negativos, os resultados revelaram uma correlação de 100% entre os dois testes, pois todos os 37 soros positivos no teste do corante foram positivos para NTPase e os 50 soros controles negativos no teste do corante, também foram negativos para NTPase.

Nakajima-Nakano et al (2002) produziram um recombinante de isoformas de NTPase (NTPase I e II) e utilizaram como antígeno em teste imunoenzimático (ELISA) na detecção de anticorpos anti NTPase em soros de indivíduos imunocompetentes na fase aguda da toxoplasmose (73 soros) e soros controles negativos (30). Os mesmos soros foram testados,

também pela reação de Sabin-Feldman. Os resultados obtidos demonstraram uma percentagem de 93% e uma correlação de 0,964 ( $r^2$ ) entre o ELISA (formado com antígeno recombinante) e a reação de Sabin- Feldman.

Diante dos relatos da literatura, citados acima, os estudos demonstram ser a NTPase um excelente antígeno para diagnóstico da toxoplasmose, principalmente tendo poder de diferenciar fase latente e ativa da doença.

## 5 NUCLEOSIL TRIFOSFATO HIDROLASE (NTPASE)

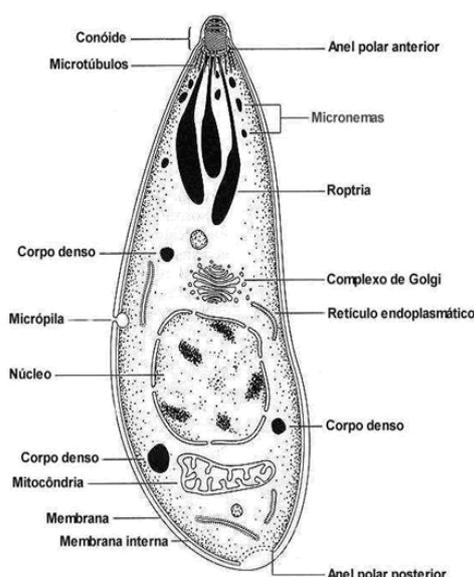
A NTPase é uma Nucleosil Trifosfato Hidrolase de taquizoítos de *T.gondii* descrita por Asai (1983). A NTPase exibe uma alta atividade enzimática na hidrólise do ATP e ADP em presença de compostos ditioneitol. Apresenta um peso molecular de aproximadamente 240 – 260 kDa, sendo formada de quatro subunidades de cerca de 63 kDa. A enzima está presente em outros protozoários, no entanto em *T.gondii* a NTPase apresenta uma elevada atividade (ASAI et al, 1983; ASAI et al 1986).

A NTPase é uma das principais proteínas constituintes do taquizoíto, cerca de 8% do total das proteínas citosólicas e está localizada em pequenas vesículas chamadas de grânulos denso (Fig. 12), espalhada em todo o citoplasma celular. Após a invasão da célula hospedeira, a NTPase é secretada dos grânulos denso para o lúmen do vacúolo parasitóforo, onde está frequentemente associada a rede vacuolar (ASAI et al., 1987; SIBLEY et al., 1994). Entretanto estudos de microscopia eletrônica, realizados por Kikuchi (2001), utilizando anticorpo monoclonal (6C6 – IgG<sub>1</sub>) também localizou esta enzima na membrana de taquizoítos.

A NTPase foi codificada por Johnson et al (1989), o gene *ntp* é formado por 571 pares de base e um mRNA com aproximadamente 2800 nucleotídeos.

Asai et al (1995) identificou a presença de duas isoformas de NTPase presente em cepas de *T.gondii*, NTPase I e NTPase II. As duas enzimas têm massas moleculares semelhantes, e contém quatro subunidades idênticas. Ambas as formas são ativadas por compostos ditioneitol, entretanto a NTPase I hidrolisa ATP cerca de 75 vezes mais eficiente do que ADP, enquanto NTPase II hidrolisa ATP e ADP semelhantemente isto é, com baixa eficiência. Cepas avirulentas de *T.gondii* (Berveley, FuKaya, Nakayama) contém apenas NTPase II, enquanto cepas virulentas (RH) apresentam NTPase I e II (ASAI et al., 1995; KIKUCHI et al., 2001).

**Figura 12:** Esquema estrutural de taquizoíto de *T.gondii*.



Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

A NTPase apresenta várias funções entre elas a função reguladora no crescimento e replicação do parasita, pois a enzima abastece o *T.gondii* com purinas (essencial para multiplicação do parasita), através da hidrólise do ATP e ADP da célula hospedeira (HOFF e CARRUNTERS, 2002). Devido a isto, a NTPase possui grande atividade em taquizoítos e baixa atividade em bradizoítos (NAKAAR et al., 1999).

A NTPase está envolvida no mecanismo de infecção. O parasita para entrar na célula anexa o sistema apical à membrana da célula hospedeira e secreta proteínas das micronemas, roptrias e grânulos densos (produtores de NTPase). Experimentos com taquizoítos tratados com anticorpo monoclonal anti-NTPase demonstraram a inibição da invasão em células vero (KIKUCHI et al., 2001; HOFF e CARRUNTERS, 2002).

A existência de uma grande quantidade de NTPase em taquizoíto, levantou a possibilidade da mesma ser detectada como antígeno circulante no sangue de indivíduos infectados e também um alvo em potencial para quimioterapia (ASAI et al., 1987; NAKAAR et al., 1999; ASAI et al., 2002).

Baseando-se nas potencialidades desta enzima, vários estudos foram surgindo, sobretudo em abordagem diagnóstica. Asai et al (1987) e Kikuchi et al (2002) utilizando anticorpos monoclonais anti-NTPase, detectaram a presença de NTPase em soro de camundongos infectados com cepas virulentas a avirulentas de *T.gondii*. Os autores obtiveram os mesmos resultados em animais inoculados com a cepa virulenta, a NTPase foi detectada com apenas um dia após a infecção e aumentou gradativamente chegando ao pico em 5 a 6 dias, onde todos os animais estavam mortos. Nos camundongos inoculados com cepas avirulentas a NTPase foi detectada ao redor do 7º - 14º dia após a infecção, diminuindo em seguida. Asai et al (1987) detectaram a NTPase até o 56º dia e Kikuchi et al (2002) não detectaram a enzima após o 21 dia pós-infecção.

Anticorpos anti-NTPase em soros humanos, foram detectados por Asai et al (1992) e os resultados comparados com a reação de Sabin-Feldman (teste do corante), considerada padrão ouro. Foram estudados 37 indivíduos positivos para *T.gondii* e 50 indivíduos negativos, os resultados revelaram uma correlação de 100% entre os dois testes, pois todos os 37 soros positivos no teste do corante foram positivos para NTPase e os 50 soros controles negativos no teste do corante, também foram negativos para NTPase.

Nakajima-Nakano et al (2002) produziram um recombinante de isoformas de NTPase (NTPase I e II) e utilizaram como antígeno em teste imunoenzimático (ELISA) na detecção de anticorpos anti NTPase em soros de indivíduos imunocompetentes na fase aguda da toxoplasmose (73 soros) e soros controles negativos (30). Os mesmos soros foram testados,

também pela reação de Sabin-Feldman. Os resultados obtidos demonstraram uma percentagem de 93% e uma correlação de 0,964 ( $r^2$ ) entre o ELISA (formado com antígeno recombinante) e a reação de Sabin- Feldman.

Diante dos relatos da literatura, citados acima, os estudos demonstram ser a NTPase um excelente antígeno para diagnóstico da toxoplasmose, principalmente tendo poder de diferenciar fase latente e ativa da doença.

## 6 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Os Sistemas de duas fases aquosas foram descritos por Beijerick (1896), quando descobriu que ao se misturar gelatina, ágar e água em certas concentrações formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em água. Per-Aka Albertsson, nos anos 50, descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água formavam sistemas de duas fases, desde então este sistema vem sendo freqüentemente investigado e utilizado para purificação de um grande número de biomoléculas (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

Albertsson (1986) reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomoléculas, partículas celulares e células intactas sob condições que preservem a sua atividade biológica (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrófilos ou um polímero com determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação de fases, predominando um ou outro componente em cada uma das duas fases resultantes (TUBIO et al., 2004).

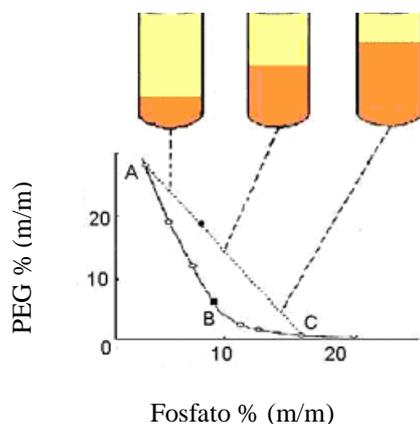
Uma das características importantes dos sistemas de duas fases aquosas é sua elevada composição em água (cerca de 90-99%) o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes. As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações, que de outro modo seriam difíceis de serem realizadas (GAVASANE e GAIKAR, 2003).

As principais vantagens na purificação de biomoléculas pelo sistema de duas fases aquosas são: a facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de operação rápida, seletiva e a temperatura ambiente, além de mais econômico que os outros processos de separação (ALBERTSSON, 1986).

Para a utilização de SDFA é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto o SDFA é representado em um diagrama de fases no qual a ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase superior (Ex: PEG) e abscissa representa a composição da molécula de maior concentração na fase inferior (Ex: Sal). Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, curva binodal, (curva que indica a mudança de solubilidade das fases) (**Fig.13**), levam à

formação de duas fases e pontos abaixo da curva, de uma só fase. A formação de um SDFA depende da concentração dos componentes do sistema (FRANCO et al., 2005).

**Figura 13:** Representação da curva binodal de um sistema de duas fases aquosas



Após o estabelecimento do equilíbrio, o sistema está representado pelos pontos A (fase superior) e C (fase inferior), a reta que liga A e C é chamada linha de amarração (*tie-line*). Sistemas cuja composição inicial encontra-se sobre uma mesma linha de amarração possuem a mesma composição final (fases superior e inferior), no entanto a relação de volume entre as duas fases é diferente para cada composição, a qual é igual à razão entre os volumes de fase inferior e superior (FRANCO et al., 2005).

A partição de proteínas ou outras biomoléculas entre as duas fases é representada pela relação entre as concentrações da molécula de interesse na fase superior e na fase inferior, denominado de coeficiente de partição (K), representada pela equação:

$$K = C_S / C_I$$

K: Coeficiente de partição.

$C_S$  – Concentração do soluto na fase superior.

$C_I$  – Concentração do soluto na fase inferior.

O valor de K é utilizado para avaliação da extensão das separações nos sistemas de duas fases aquosas. Coeficientes de partição significativamente distintos para a molécula de interesse e para as demais moléculas indicam ocorrência de purificação.

## 6. 1 Fatores que Influenciam o Sistema de Duas Fases Aquosas - SDFA.

Vários fatores influenciam na formação e na partição de biomoléculas nos sistemas de duas fases aquosas (SDFA). No entanto, um fator importante para todos os SDFA é o equilíbrio e a separação das fases. Para cada sistema (polímero/polímero ou polímero/sal) existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases e alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura (ALBERTSSON, 1986).

Fatores como temperatura, pH, massa molar e concentração do polímero influenciam na partição da molécula.

### 6. 1. 1 Massa molar e concentração do polímero

O aumento da massa molar do polímero do SDFA diminui a partição do material biológico para a fase rica em polímero. Quanto maior a massa molar do polímero, menor é o volume do solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição. Em geral, o aumento na massa molar do polímero levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase (ALBERTSSON, 1986).

Com o aumento da concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fase desloca-se em direção a região bifásica. A concentração do polímero a ser usada para a separação de fase depende da massa molar do mesmo (ASENJO, 1990).

### 6. 1. 2 pH

Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seu comportamento de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Em geral a partição de proteínas, desnaturadas, é diferente da partição das proteínas na forma nativa (ALBERTSSON, 1986).

### 6. 1. 3 Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema,

polímero/polímero ou polímero/sal. Para o sistema PEG/Sal, observa-se que o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e, conseqüentemente, uma redução da concentração do polímero na fase inferior (ZASLAVSKY, 1995).

Os anticorpos monoclonais (mab) são altamente empregados na maioria dos ensaios sorológicos, imunohistoquímica, cromatografia de afinidade e imunoterapia. No entanto, essas aplicações requerem elevado teor de pureza com atividade biológica preservada. Os protocolos atuais utilizados para purificação de anticorpo monoclonal, muitas vezes, requerem várias etapas, tempo demasiado, mão de obra qualificada, alto custo, pouco rendimento e muitas vezes, com atividade biológica não preservada (ANDREWS et al., 1996; CLAUSEN, et al.,1999).

A purificação de anticorpos monoclonais (mab) através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) foi empregada na purificação de mab-IgG apresentando resultados com alto rendimento e elevado grau de purificação. O SDFA tem sido usado para distinguir a superfície hidrofóbica de proteínas, por isto são escolhidos como método de purificação de anticorpo monoclonal a partir de cultura de hibridomas (ANDREWS et al., 1996).

## **7 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos utilizados no presente trabalho serão relatados nos artigos originados do estudo e descritos adiante.

## **8 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão do presente trabalho serão relatados nos artigos originados do estudo e descritos adiante.

## 8.1 Artigo 1

Artigo submetido ao Journal Chromatography B

### **PURIFICATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY ANTI-NTPASE OF *Toxoplasma gondii* THROUGH AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM PEG-PHOSPHATE**

Ferreira, S<sup>\*,1, a</sup>; Porto, A. L. F<sup>\*, 2</sup>; Malagueño, E<sup>\*</sup>; Kobayashi, M<sup>3</sup>; Albuquerque, B.F<sup>\*,b</sup>; Gomes Leitão, M. C<sup>\*,c</sup>; Lima Filho, J.L<sup>\*/+</sup>.

*\*Laboratory of Immunopathology, Keizo Asami (LIKA)/ UFPE – Brazil.*

*1University of Pernambuco (UPE), Depart. of Pathology, ICB, Recife, PE, Brazil.*

*a Pos-graduate Program in Biological Science / UFPE, Recife, PE, Brazil.*

*2 University Rural Federal of Pernambuco (UFRPE), Department of Morphology and Physiology Animal, Recife, PE, Brazil.*

*3University of Chiba, School of Parasitology, Department of Parasitology ,Inohana, Chiba 280, Japan.*

*b Academy of Medicine / UFPE, Recife, PE, Brazil.*

*c Pos-graduate program in Biological Science / UFPE, Recife, PE, Brazil.*

#### **Abstract**

Toxoplasmosis is an infection caused by *Toxoplasma gondii* which affects from about 20% to 90% of the world population. The diagnosis is based on antibody research against the parasite, but difficulty to distinguish between active and latent infection are the main problems of the diagnosis. Methods of detection of the circulating antigens of the parasite, such as the use of monoclonal antibodies (mab), are being researched so as to clarify the diagnosis. However, that methodology requires highly pure antibodies with preserved biological activity. The objective of this work was the utilization of two-phase aqueous system - PEG/Phosphate in the purification of the mab-2F12 (IgA) from the supernatant of culture of hybridomas as the goal, by studying the molar mass and the concentration of the polymers in this process. The results obtained showed that the mab partitioning preferably in the saline phase, being the purification obtained with the PEG 8000/Phosphate (14.0% and 11.8% m/m) the best one, pH7.0 presenting an electrophoresis profile similar to the IgA pattern. The method appeared to be promising due to the ease of the performance and preservation of the biological activity of the immunoglobulin.

**Key words:** Monoclonal antibodies. IgA. Aqueous two-phase systems. Purification.

## INTRODUCTION

The monoclonal antibodies are highly used in most of serological diagnostic, immunohistochemistry, affinity chromatography and immunotherapy. However, these applications require high level of purity along with preserved biological activity [1- 4].

The current protocols of purification involve not only precipitation but also ammonia sulphate to affinity chromatography. However, such protocols very often require several steps, a lot of time, qualified personnel, high cost, with few results sometimes, with non-preserved biological activity [2, 4]. In this way, it is necessary the development of the protocols of purification which will increase the performance, preserve biological activity e reduce the steps and the operational costs of the process.

The aqueous two-phase systems possess a great number of advantages related to traditional methods of separation and purification of biomolecules, these advantages include: high content of water in both phases (70%-80% w/w), reduction of the degradation due to high biocompatibility and low interface tension, good performance, high facility with the increase of the scale, high transference of mass; possibility of operation at room temperature, recycling of the polymer and low operational cost [3 - 7]. The two-phase aqueous system has been used in the separation of proteins, cells and other biological materials at laboratorial scale. The ATPS is made up of aqueous solutions of two polymers solvable in water, usually Polyethylene glycol (PEG) e Dextran, or a polymer and salt, generally PEG and Phosphate or Sulphate. The PEG/Salt are preferable for its practical application in separating proteins [8].

The purification of the monoclonal antibodies through the aqueous two-phase System (ATPS) was applied in the purification of mab - IgG presenting outcomes with high performance and high level of purification. The ATPS has been used to distinguish the hydrophobic surface of the proteins, therefore they are chosen as method of purification of the monoclonal antibody from the culture of hybridomes [3].

The monoclonal antibodies have been studied in the diagnosis of Toxoplasmosis, one the biggest infections universally spread caused by an intercellular parasite: *Toxoplasma gondii*. The disease affects about 20% to 90% of the world population and is generally asymptomatic in subjects who are immunocompetents; however, it causes serious morbidity and mortality in fetuses and in immunodeficient persons [9 - 12].

The research of the antibodies (IgM, IgA, and IgG) against the parasite is the routine laboratorial diagnosis; however, as it is an indirect method of identification, false results - positive or negative - may occur. Furthermore, the difficulty to distinguish between the active

infection and the latent one and the positive false results with rheumatoid factor are among the main problems of the diagnosis [13].

Due to these facts, the studies of diagnosis of Toxoplasmosis are being directed towards methodologies based on identification of the circulating antigens of the parasite with the utilization of the monoclonal antibodies. The utilization of the mabs has opened a new opportunity for the diagnosis of the disease considering that, depending on the target antigen; the methodology can lead to the distinction of the active or latent phase of the infection [12].

Studies performed by Asai et al.[14] identified an enzyme located in the cytosol of the tachyzoites (active form) of *T. gondii*, the Nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase), presenting a molecular weight of approximately 240 – 260 kDa, made up of four subunits of about 63 kDa. The enzyme is one of the main cytosolic proteins, about 8%, showing several functions: among them are the regulation of the growth and replication of the parasite, this being one of the best antigen stimulators of the immune response in the acute phase of the infection making it possible to be used as a differential diagnosis of the active and latent phase of the Toxoplasmosis [9, 10, 15, 16].

In the present work, we used the aqueous two-phase system (ATPS) PEG-Phosphate, for the purification of the monoclonal antibody, class IgA, against NTPase of *Toxoplasma gondii*.

## **MATERIALS AND METHODS**

PEGs (Polyethylene glycol): 550, 1000, 3500 and 8000 of Sigma, St. Louis, MO, USA. The salts, the proteins, the means of culture, material for electrophoresis, conjugated (anti IgA-mouse) and revealers; all of analytical degree manufactured by Sigma, St. Louis, MO, USA.

### **Expansion of the monoclonal antibody (Mab-2f12)**

Hybridomas of Mab-2F12 of class IgA were donation by Prof. Dr. Masashi Kobayashi of the University of Medicine of Chiba - Japan. The maintenance of the hybridomas and the process of expansion were performed in the Immunology sector at Keiso Asami Immunopathology Laboratory - LIKA at Federal University of Pernambuco - UFPE.

The method of proliferation was performed according to Coligan et al [17]. After each process of expansion the cell culture was centrifuged at 120 x g and the supernatant matter was collected and frozen at - 80°C.

### **Production of the antigen of *Toxoplasma gondii***

The virulent strain (RH) of *Toxoplasma gondii* kept in liquid nitrogen was reactivated by intraperitoneal passage in Swiss mouse, at intervals from 3 to 5 days, according to Asai et al [18]. After the reactivation, the ascitic fluid containing the parasite was collected in conical tubes under ice bath. The matter was centrifuged at 800 x g for ten minutes. The precipitated was washed with PBS 0.067 M, pH 7.2. This procedure was repeated twice. After the steps of washing, the precipitated was kept suspended at 5.0 ml buffer PBS 0.067 M, pH 7.2 and transferred in to a Becker under ice bath. The suspension was sonicated (Vbracell Branson - Mod CV17) at 40W, at the frequency of 50MHz at periods of 20s under ice bath. This procedure was repeated six times. The material was frozen at -80°C for 30 minutes and then thawed at room temperature. Both the freezing and thawing procedure were performed three times. The material was centrifuged at 7500 x g in refrigerated centrifuge (4°C) for 30 minutes. The supernatant (crude extract), which contains the NTPase, was then collected, its protein concentration determined through Bradford [19] method and preserved at - 80°C.

### **Preparation of the aqueous two-phase systems**

The systems (total mass of 3g) were prepared from stock solutions of the polymers (PEG 550, 1000, 3350 and 8000) with water, 50% (w/w) and 40% of a mixture of stock solutions of salts of monobasic Phosphate potassium and dibasic Phosphate of potassium. All the systems were prepared in graded centrifuge tubes. The pH of the systems PEG-phosphate was considered as being approximately equal to pH 7.0. The study of partition of the antibody in different tie lines was performed by varying the concentrations of PEG and salts as shown on **table 1** according to the bimodal partition diagram reported by Albertsson [20].

The coefficient of the protein K was defined as the relation between concentration of protein in the superior and inferior phase. The average values were obtained from the three independent experiments performed in each condition. The results reported are an average of the three independent experiments, with 5% of error.

### **Purification of mab-2f12 for aqueous two-phase systems**

Samples of 250  $\mu$ l (=3.357 mg) of mab-2F12 were added to different aqueous two-phase systems. After the clear separation of the phases through centrifugation during 5 minutes at 5000 x g, the samples of each phase were put in separate tubes. The determination of the content of the protein of each Phase was performed according to the methodology of Bradford [19], the detection of the mab-2F12 were assessed through the technique of Blot [21]. After the detection of the antibody the samples were dialysing against buffer PBS 0.01M, pH 7.4 over-night and concentrated through the membrane of centricon, 100MW. The extraction experiments were performed at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **Detection of mab-2f12.**

Rectangles of nitrocellulose ( $1\text{cm}^2$ ) were sensibility with  $2\mu$ l of each phase in the different systems of the two- aqueous phases for an hour at  $25^\circ\text{C}$ . After this period the material was incubated for 30 min. at  $25^\circ\text{C}$ , with 300  $\mu$ l of buffer TRIS-NaCl - 0.025M, pH 7.4 containing 1% of bovine serum albumin (BSA). After the finishing of this period the samples were incubated with conjugated anti-IgA of mouse for an hour at  $25^\circ\text{C}$  and the material was revealed with DAB (3,3' Diaminobenzine - Tetrahydrochloride). After each step 3 cycles of washing were performed with TRIS-NaCl - 0.025M, pH 7.4 containing 0.05% of Tween.

### **Determination of the activity and titulation of the mab-2f12.**

The activity of the mab-2F12 was performed through Dot Blot, rectangles of nitrocellulose (1cm<sup>2</sup>) were sensibility with 3µl of the antigen - NTPase of *Toxoplasma gondii* - in the following concentrations: 41µg/ml, 83 µg/ml, 167 µg/ml and 333 µg/ml for an hour at 25°C. After this period, the material was incubated for 30 min. at 25°C, with 300µl buffer TRIS-NaCl - 0.025M, pH 7.4 containing 1% of BSA. The material was incubated with 200µl of mab - 2 F12, extracted form the aqueous 2-phase system (the initial concentration of the mab-2F12 = 640 µg / mL), in the following dilutions: 1/50, 1/500, 1/1000, 1/2000 for an hour at 25°C, at the end of this period the samples were incubated with conjugated anti-IgA of mouse for an hour at 25 °C and the material was revealed with DAB. After each step, 3 cycles of washing were performed with TRIS-NaCl - 0.025M, pH 7.4 containing 0.05% of Tween.

### **Asesement of purification of 2f12 through electrophorese.**

Electrophoresis in polyacrylamide gel 6.5% (SDS-PAGE), according to Laemmli [22] was performed for the assessment of purity of the samples. 15µl of the samples was applied (7, 68 mg of the protein). The patterns molecular weight patterns utilized in this technique were: miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), Phosphorilase B (97 kDa), bovine serum albumin(66 kDa) and Ovoalbumin (45 kDa). All the analytical level obtained from the Sigma, after the electrophoresis run, the gel was stained with Comassie Brilliant blue R250 for better visualization of the bands.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Partition of mab-2f12 in peg / phosphate system.

The hybridoma culture is characterized by a wide range of potential protein products such as insulin, bovine serum albumin fetal, which all have potential added-value in the purified state. There has been comparatively little work undertaken using aqueous two-phase systems for extraction of blood proteins from human, animal origin or cell culture [23].

The effects of the molar mass of the polymer and length of the tie line in the total protein partition coefficient from the crude extract of culture of 2F12 can be seen on **Fig. 1**. Total protein partition coefficient in the aqueous two-phase systems showed same behavior, increase in their partition coefficient when increasing the length of the tie line and PEG molecular mass. In the PEG 3350/Phosphate we observed that the partition coefficient increases as the tie line length increases, and the protein partitioning in the saline phase to the polymeric phase ( $K$  varied from 0.56 -4.2). This finding, which is a general rule in protein partition, indicates that the protein transfer to the bottom phase may be due to an exclusion effect of PEG of higher molecular weight [24].

The **Fig 2** presents the Dot Blot of the systems where mab-2F12 was detected. We can observe that there is a small concentration of antibody in the PEG 500/Phosphate initial system, however, as the molar mass of the polymer increases, so does the concentration of antibody in the samples, which is clearly observed in the tie line 2 PEG 8000/Phosphate system; showing an improved separation efficiency of this system in the purification of the mab-2F12 (IgA).

These results are not concordance with the ones obtained through Rito Palomares et al, Andrews et al [3] and Sulk et al [25]. Rito Palomares et al [23] are studying protein recovery from animal blood (BSA, IgG, hemoglobin), Andrews et al [3] and Sulk et al [25] working with rough supernatant of hybridoma culture (IgG). Andrews et al [3], by using PEG/Phosphate system at pH 7.0 (PEG 1450, 4000 and 6000) saw that a partitioning of IgG occurred in the superior phase, making it necessary a re-extraction. The findings of Sulk et al [25] also present a partition of the immunoglobulin (IgG) in the PEG phase, making it necessary a new step of purification through thiophilic chromatography.

### **Evaluation of the mab-2f12 purity**

The **Fig. 3** presents the results obtained through analyses SDS-PAGE of the samples of IgA - mouse - pattern/Sigma, mab-2F12 purified by the PEG 8000/Phosphate system, tie line 2 saline-rich bottom phase and mab-2F12 crude supernatant. The analyses of the gel revealed the presence of bands which seem to correspond the heavy chain of the IgA, approximately 54kDa, observed in the lines 1, 2 and 3. The presence of BSA (66kDa) was also detected; however the intensity band appears in the crude supernatant of mab-2F12, as well as in the IgA-mouse pattern and less intensity band in the purified mab-2F12, it can be attributed the BSA partition into the polymeric-rich top phase as described by Rito-Palomares et al [23 ]. The presence of other contaminant molecules was evident in the samples, as being observed, in minor quantities, in the samples purified by ATPS.

### **Determination of the biological activity of mab-2f12 extracted with peg-phosphate aqueous two-phase system.**

The biological activity and titulation of the mab-2F12 extracted with the PEG 8000/Phosphate, tie line 2 in the saline-rich bottom phase was chosen for assessment, due to the presence of the bigger of antibody, according to the data presented in **Fig. 2**. The antibody presented biological activity up to the dilution of 1:2000, related to an antigenic concentration of 41µg /mL of the crude extract of *T. gondii*. The data presented on **Fig. 4** showed that the aqueous two-phase system was able to keep the original structure of the protein. There has been comparatively little work undertaken using aqueous two-phase systems for the extraction of proteins from hybridome culture. In this context, the implementation of a single-stage ATPS process study might be expected to enhance the application of this technique as an alternative and combinatorial primary step for the production of Kit diagnostic.

## **CONCLUSION**

The PEG 8000/Phosphate, tie line 2, saline-rich bottom phase presented the best conditions to separate, purify and keep the structural integrity of the IgA molecule from the culture of hybridoma cells. This system presented an advantage over the other ones studied so far which the partition of the antibody occurred preferably in the inferior phase, rich in salt. This makes the recuperation of the protein, which consists of a simple dialyze and concentration easier.

The study shows a possibility of use of the ATPS as a method of purification of class IgA monoclonal antibody, from the culture of cells (hybridoma) with ease at execution, high performance and preserved biological activity making its use possible in large scale.

## **ACKNOWLEDGEMENTS:**

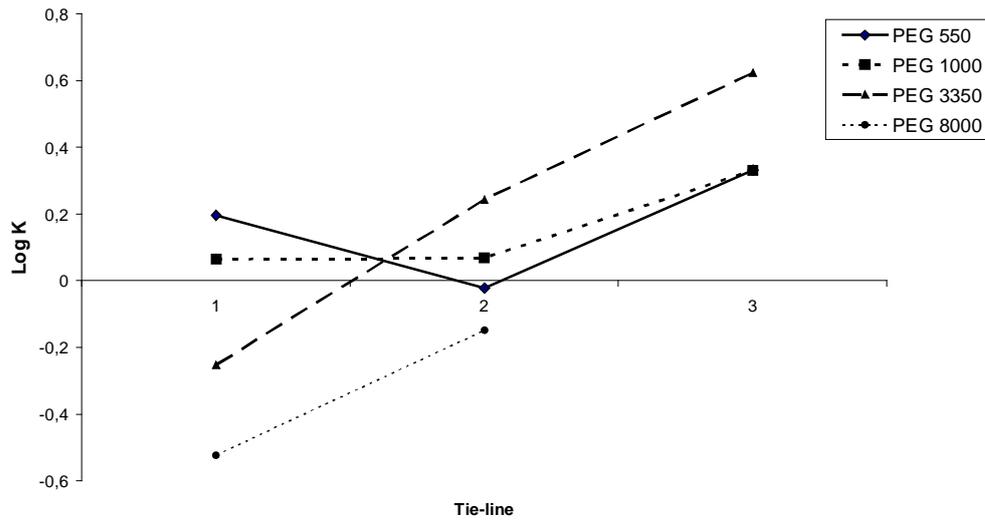
The authors wish to acknowledge the financial support by FACEPE - Foundation for the Support of Science of the State of Pernambuco. We are grateful to Dr. Valeria R. A. Pereira, Dr Roberto P. Werkhauser, Sergio dos Santos Silva - Center of Research Aggeu Magalhães – FIOCRUZ and Daniela Viana de Araújo – Pos-graduate Program in Biological Science – UFPE.

## REFERENCES

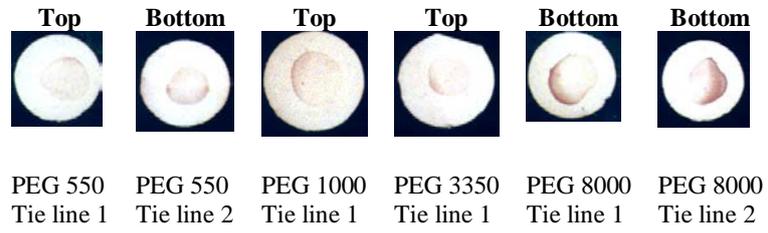
- [1] R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, Kuby Imunologia, Revinter Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- [2] A.M. Clausen, A. Subramanian, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 831 (1999) 63 – 72.
- [3] B.A. Andrews, S. Nielsen, J.A. Asenjo, *Bioseparation* 6 (1996) 303 – 313.
- [4] Rito-Palomares, M. J. *Chromatogr. B* 807 (2004) 3-11.
- [5] T.T. Franco, B. V. Kilikian, J. S. R. Coimbra, A. J. A. Meirelles, in A. Pessoa Jr, B. V. Kilikian (Editors), *Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas*, Manole, Barueri, SP, 2005, p. 117-169.
- [6] R. hatti-Kaul, *Mol Biotechnol* 19 (3), (2001) 269 – 277.
- [7] K.A. Moreira, B.F. Albuquerque, M.F.S. Texeira, A.L.F. Porto, J.L. Lima-Filho, *World J microbial Biotechnol* 18 (2002) 307 –312.
- [8] L. H. M. Silva, A. J.A. Meirelles, *Carbohydrate Polymers* 42 (2000) 279-282.
- [9] T. Asai, F. Mizuno, S. Kojima, T. Takeuchi, A. Kobayashi, Y. Suzuki, *J. Clin. Microbiol.* 30 (5), (1992) 1291-1293.
- [10] M. Johnson, K. Broady, M. C. Angelici, A. Johnson, *Microbes and Infection* 5 (2003) 797-806.
- [11] A. M. Tenter, A. R. Heckerth, L. M. Weiss, *International Journal for Parasitology* 30 (2000) 1217-1258.
- [12] Y. Suzuki, R. Ramirez, C. Press, S. Li, S. Parmley, P. Thulliez, J. S. Remington, *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11), (2000), 3967-3970.
- [13] M. E. Camargo, *Toxoplasmose in Diagnóstico Laboratorial*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p. 278-288.
- [14] T. Asai, W.J O’Sullivan, M. Tatibana, *The Journal of Biological Chemistry* 258 (11), (1983) 6816-6822.
- [15] T. Asai, T. takeuchi, J. Diffenderfer, L. D. Sibley, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (8), (2002) 2393-2399.
- [16] K. Nakajima-Nakano, A. Makioka, N. Yamashita, N. Matsuo, T. Asai, *Parasitology International* 48 (2000) 215-222.
- [17] J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober in *Currents Protocols Immunology* 1 (1991) 2.6.1.
- [18] T. Asai, T. Kim, M. Kobayashi, S. Kojima *Infection and Immunity* (1987) 1332-1335.
- [19] M.M. Bradford, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- [20] P. A. Albertson, *Partition of cells particles and micromolecules* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Wiley, 1986.
- [21] J. Sambrook , E. F. Fritsch , T. Maniatis. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor. 1989
- [22] U.K. laemmli, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [23] Rito-Palomares, M., Dale, C., Lyddiatt, A. *Process Biochemistry* 35 (2000) 665-673.
- [24] Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A., Nerli, B. J. *Chromatography B* 819 (2005) 25-31.
- [25] B. Sulk, G. Birkenmeier, G. Kopperschläger. *J. Immunol. Methods* 149 (1992) 165-171.

## ATTACHMENT

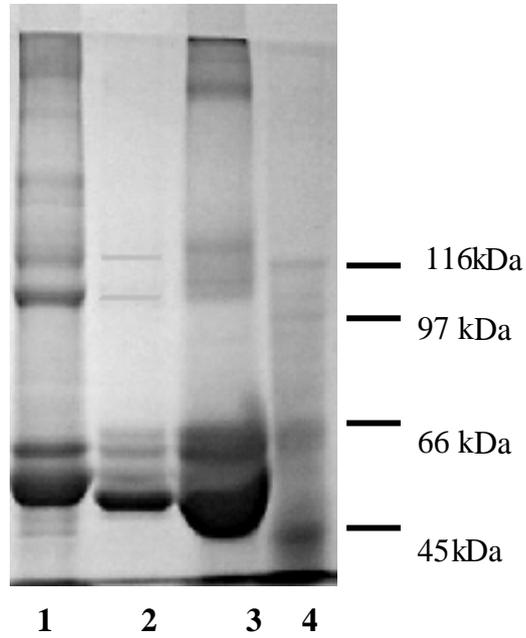
FIGURE 1:



**Figure 1:** Effect of the molar mass of the polymer and the length of tie line in the partition coefficient of total protein of crude extract of culture of 2F12.

**FIGURE 2**

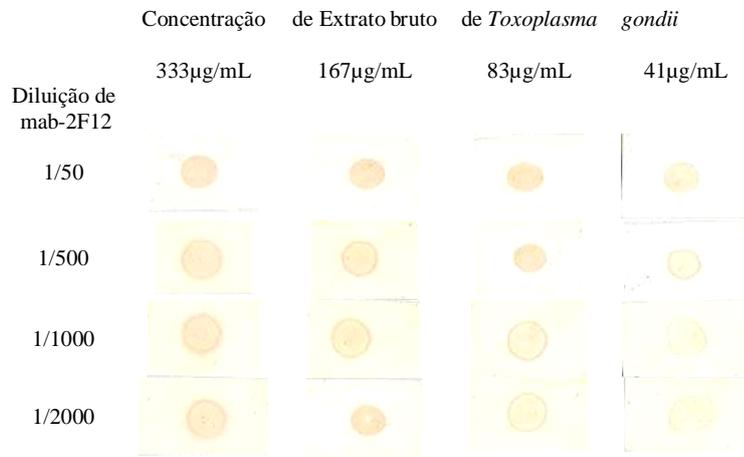
**Figure 2:** Mab-2F12 detection in the different Systems PEG / Phosphate (550, 1000, 3350 and 8000).

**FIGURE 3:**

**Figure 3:** SDS-PAGE of mab-2F12 purified by the PEG 8000/Phosphate tie line 2 saline-rich bottom phase.

**Line 1:** IgA-mouse (pattern), **Line 2:** purified mab-2F12, **line 3:** crude supernatant of mab-2F12, and **line 4:** molecular weight pattern.

**FIGURE 4:**



**Figure 3:** Determination of the activity of the mab-2F12 obtained after extraction with SDFA (PEG 8000/Phosphate tie line 2) related to the rough extract of *Toxoplasma gondii*.

**Table 1:** Compositions (w/w) of PEG-  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  - Systems with PEG 550, 1000, 335, 8000

System	Tie Line	PEG (%)	$K_2HPO_4/KH_2PO_4$ (%)
<b>PEG 550</b>	1	16.7	<b>14.8</b>
	2	17.7	<b>15.7</b>
	3	19.7	<b>17.7</b>
<b>PEG 1000</b>	1	16.2	<b>14.3</b>
	2	17.7	<b>15.7</b>
	3	19.7	<b>17.7</b>
<b>PEG 3350</b>	1	14.0	<b>11.8</b>
	2	17.7	<b>15.7</b>
	3	19.7	<b>17.7</b>
<b>PEG 8000</b>	1	11.8	<b>9.8</b>
	2	14.0	<b>11.8</b>

## 8.2 Artigo 2

Artigo a ser submetido às Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

### DETECÇÃO DE NTPASE DE *Toxoplasma gondii* EM INDIVÍDUOS COM A FORMA OCULAR DA TOXOPLASMOSE.

Ferreira, S<sup>\*, 1, a</sup>; Kobayashi, M<sup>2</sup>; Malagueño, E<sup>\*</sup>; Porto, A. L. F<sup>\*, 3</sup>; Gomes Leitão, M. C<sup>\*, b</sup>; Lynch, M. I.<sup>1</sup>; T. Asai<sup>2</sup>; Lima Filho, J.L.<sup>\*/+</sup>.

*\*Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (UFPE), Recife, PE, Brasil,*

*1Universidade de Pernambuco (UPE), Deptº. de Patologia, ICB, Recife, PE, Brasil,*

*a Doutorado em Ciências Biológicas / UFPE, Recife, PE, Brasil,*

*2Universidade de Chiba, Escola de Medicina, Deptº. de Parasitologia, Inohana, Chiba 280, Japan,*

*3Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Deptº. de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, PE, Brasil*

*b Mestranda em Ciências Biológicas / UFPE, Recife, PE, Brasil,*

---

#### Resumo

A Toxoplasmose é uma das mais frequentes infecções cosmopolita, causada pelo *Toxoplasma gondii* atingido cerca de 20 – 90% da população mundial. A protozoose é uma importante causa de uveítes em diferentes partes do mundo e no Brasil cerca de 50 – 80% das uveítes tem origem etiológica a infecção pelo *Toxoplasma gondii*. O diagnóstico da Toxoplasmose ocular está apoiado, frequentemente, nos aspectos clínicos das lesões oculares, entretanto outras entidades nosológicas podem conduzir ao mesmo quadro. O diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico clínico. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um ELISA de captura para antígeno (NTPase) de *Toxoplasma gondii*, em soros de indivíduos com a forma ocular da doença, com a finalidade de confirmar a origem etiológica das lesões. A técnica utilizou anticorpo monoclonal (mab-2F12) contra uma enzima (NTPase) produzida por taquizoítos – forma ativa do parasito. A metodologia empregada demonstrou uma concordância com o diagnóstico clínico, apresentando especificidade de 86,30% e sensibilidade de 85,18%, com eficiência de 0,96, revelando a capacidade do teste em diferenciar os verdadeiros resultados positivos dos verdadeiros resultados negativos, podendo ser o teste uma alternativa, promissora, a baixos custos, para auxiliar no diagnóstico etiológico da infecção.

**Palavras-chaves:** Diagnóstico da Toxoplasmose ocular. Toxoplasmose ocular-NTPase. ELISA de captura.

<sup>+</sup> Autor de Correspondência – Rua Arnónio Marques s/n 50732-901 – Recife, PE, Brasil, Tel. +55 21 81 21011393; e-mail: [silferreira@icb.upe.br](mailto:silferreira@icb.upe.br)

## INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma das infecções de maior ocorrência universalmente disseminada. É causado por um parasita intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) atinge cerca de 20% a 90% da população mundial. No Brasil 50 a 80% da população adulta são soropositivos (ORÉFICE e BONFIOLI 2000). No entanto algumas regiões variam na taxa de prevalência: no Rio Grande do Sul 74,5% (SPALDING et al. 2005), em São Paulo 42% (LYNCH et al. 2004), em Pernambuco as taxas de prevalência em adultos é cerca de 75% (COELHO et al., 2003) e em crianças na faixa etária de 9 a 15 anos é de 79,1% (KOBAYASHI et al. 2002). O parasita possui características oportunistas e devido a este fato as manifestações clínicas apresentam geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, no entanto a doença causa séria morbidade e mortalidade em fetos e pessoas imunodeprimidas. Estima-se que, a Toxoplasmose exista, na sua forma assintomática, em cerca de 500 milhões a um bilhão de pessoas no mundo (GIRALDO et al. 2000, REMINGTON et al. 2004).

A Toxoplasmose é uma importante causa de uveítes em diferentes partes do mundo e no Brasil cerca de 50 a 80% das uveítes tem como origem etiológica o *T.gondii* (LYNCH et al. 2004). A Toxoplasmose ocular pode ser proveniente do resultado de uma infecção congênita ou pós-natal. Em ambas o acometimento pode ser precoce ou tardio (Safadi 2000, LYNCH et al. 2004). Resultados de estudos de múltiplos casos, onde a fonte de infecção foi revelada e datada, demonstraram que o período entre infecção primária e o aparecimento dos sintomas oculares variaram de 1 mês a 3,5 anos, numa faixa etária de 10 – 57 anos (TENTER et al. 2000).

O diagnóstico da Toxoplasmose ocular está apoiado, frequentemente em critérios clínicos típicos, como a presença de uma lesão ativa branco-amarelada com cicatriz pigmentada e perivasculite na imagem de fundo de olho. Entretanto outras causas etiológicas podem conduzir ao mesmo aspecto clínico e o diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico diferencial de tais lesões (LYNCH et al., 2004).

O isolamento ou detecção do agente em questão é de grande auxílio na caracterização da infecção (UCHOA, 1999). Entretanto na Toxoplasmose ocular a detecção do agente torna-se difícil, pois o parasita encontra-se em local de difícil acesso (LYNCH et al., 2004). A detecção na circulação de antígenos do *T.gondii* tem sido investigada e pode constituir uma alternativa como diagnóstico etiológico. Hafid et al (1995) detectou a presença de antígeno circulante (6, 8, 14, 18, 22, 30, 36, 40 e 48 kDa) em grávidas obtendo positividade em 26,5%.

Chaves-Borges et al (1999) detectou a presença do antígeno de membrana p30 em LCR (líquido cefalorraquidiano) em indivíduos HIV, obtendo 45% de positividade utilizando para isto ELISA de captura usando anticorpos monoclonais 6A8 e 6E9

No diagnóstico da Toxoplasmose ocular, geralmente não há correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e as alterações oculares, sendo comum à ocorrência de títulos baixos (ORÉFICE 2002). Caracteristicamente a lesão ocular pelo *Toxoplasma* tem, como uma das marcas imunológicas, a produção intra-ocular de anticorpos anti-toxoplasma. Deste modo, a carga de anticorpos no humor aquoso é maior do que a carga respectiva no soro, o que indicaria toxoplasmose ocular ativa (CAMARGO, 2001; LYNCH et al. 2004).

A avidéz da IgG no humor aquoso, constitui um bom marcador, em contraste com alta avidéz no soro (CAMARGO, 2001). A detecção de IgA ocular também tem sido estudada como um bom marcador, Lynch et al (2004) relataram uma forte associação entre a doença e a produção lacrimal de IgA, demonstrando essa imunoglobulina ser um auxílio no diagnóstico da Toxoplasmose Ocular. Pesquisas para detecção de antígenos, também estão sendo avaliadas com a técnica de PCR (CAMARGO, 2001; MONTOYA, 2002).

A pesquisa de anticorpos (IgM, IgA, IgG) contra o parasita é o diagnóstico laboratorial de rotina, no entanto, por se tratar de um método indireto de identificação, resultados falso positivo ou negativo podem ocorrer. Adicionalmente, dificuldade em distinguir entre a infecção ativa e latente (crônica) e resultados falso-positivos com anticorpo antinuclear e fator reumatóide estão entre os problemas principais do diagnóstico (CESBRON et al. 1985, REMINGTON et al. 2004). Devido ao problema demonstrado, os estudos diagnósticos da Toxoplasmose estão sendo direcionado para metodologias baseadas na identificação de antígenos circulantes do parasita, como PCR e utilização de anticorpos monoclonais O emprego de anticorpos monoclonais (Mabs) abriu uma nova possibilidade para diagnóstico da doença haja vista que dependendo do antígeno alvo, a metodologia pode levar a distinção da fase ativa ou latente da infecção (CASTAÑO OSÓRIO et al. 2001, REMINGTON et al. 2004).

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), Apresentando um peso molecular de aproximadamente 240 – 260 KDa, sendo formada de quatro subunidades de cerca de 63 kDa. A enzima é uma das principais proteínas citosólicas, cerca de 8%, com várias funções, entre elas a reguladora no crescimento e replicação do parasita e específica para o mesmo, sendo um dos melhores antígenos estimuladores da resposta imune na fase aguda da infecção (ASAI et al. 1992).

A enzima vem sendo alvo de vários estudos nas últimas décadas, e a existência da larga quantidade de NTPase em taquizoíto aumentou a possibilidade que a NTPase possa ser detectada como um antígeno circulante de fase ativa em sangue ou outros fluidos de indivíduos infectados com *T. gondii* pois possui grande atividade em taquizoítos e baixa atividade em bradizoítos (NAKAAR et al., 1999) podendo ser utilizada no diagnóstico da Toxoplasmose (ASAI et al. 1987, ASAI et al. 1992, KIKUCHI et al. 2002). Além disso, a NTPase foi recentemente sugerida como um alvo para estratégia quimioterapêutica no controle da doença (ASAI et al., 2002).

No presente estudo foi descrito um ELISA de captura para NTPase de *T. gondii* utilizando anticorpo monoclonal (mab-2F12) em soros de indivíduos com a forma ativa ocular da Toxoplasmose.

## MATERIAIS E MÉTODOS

***Expansão de anticorpo monoclonal*** - Hibridomas secretando anticorpo monoclonal (mab) anti NTPase de *Toxoplasma gondii* (clone 2F12 / IgA) foram cedidos pelo Prof. Dr. Masashi Kobayashi da Universidade de Medicina de Chiba – Japão. O método de proliferação foi executado segundo Coligan et al (1991). Após cada processo de expansão a cultura de células foi centrifugada a 120 x g e o sobrenadante coletado e congelado a -80°C.

***Purificação de anticorpo monoclonal*** (mab-2F12) – O mab-2F12 foi purificado através do Sistema de duas fases aquosas (SDFA) utilizando Polyethylene glycol (PEG) /Fosfato segundo Porto et al (2003).

***Produção de NTPase*** – A NTPase foi produzida a partir da cepa virulenta (RH) de *Toxoplasma gondii*. O método de extração foi realizado segundo Asai et al (1986).

***Produção e purificação de anticorpo policlonal*** – Coelho New Zealand de 6 meses foi inoculado via intramuscular (i.m) com 0,5 mL de solução fisiológica contendo 100 µg de NTPase purificada emulsificada com 0,5 mL de adjuvante de Freud completo Três inoculações de reforço foram feitas com a mesma via a intervalos de duas semanas, duas com adjuvante de Freud incompleto e uma terceira com mesma concentração protéica de NTPase em alúmen de potássio. O soro foi obtido após 7 dias da última inoculação, por punção cardíaca sob anestesia. A IgG anti-NTPase foi obtida por precipitação em sulfato de amônio saturado 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 18 horas, segundo Coligan et al (1991) o sal foi retirado em uma coluna Sephadex G25, eluído com tampão PBS 0,001M, pH 7,2. Em seguida o eluente

foi aplicado a coluna de proteína A Sepharose e eluído com Tampão GLICINA-HCl 0,1M, pH 7,2.

**Amostras de soros humanos** – O grupo (i) foi formado por 22 pacientes com Toxoplasmose ocular, acima de 10 anos, com Uveíte Posterior Ativa Presumivelmente por *Toxoplasma*. (UPAPT) diagnosticada indiretamente por exame oftalmológico, realizado na clínica de olhos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Para considerar Toxoplasmose ativa foram considerados aspectos clínicos definidos segundo Lynch et al (2004) e elevados títulos de IgG. O grupo (ii) controle foi formado por 20 indivíduos, escolhidos entre voluntários saudáveis, sem qualquer doença ocular, IgG positiva para *T.gondii* e acima de 10 anos. Preferência foi dada aos parentes dos pacientes ou vizinhos desde que fossem da mesma localidade. Este trabalho foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

**Deteção de NTPase através de ELISA de captura** – Alíquotas de 50µl de Mab-2F12 na concentração de 50 µg/ml, foram distribuídas em microplacas de PVC (Maxisorb, Nunc, USA) e incubadas em câmara úmida por 18 h a 4°C. O Tampão bloqueador PBS-BSA 1% foi adicionado em cada poço e incubado por 1h a 37°C. Foram adicionados em cada poço 50µl dos soros sem diluir de pacientes e controles. Os poços foram incubados por 18 h a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas e incubadas com 50µl de IgG de coelho anti NTPase de *T.gondii*, na concentração de 25 µg/ por 2h a 37°C. Seguidamente as placas foram incubadas com anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA), diluído 1/8000 durante 1 hora. A reação foi revelada com o-phenylenediamine (OPD - Merk, Schardt, Germany – 32 mg em 10mL de tampão citrato) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% e parada após 15 minutos com 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Todas as incubações foram realizadas a 37°C em câmara úmida e após cada etapa, as placas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-T 0,05%. As absorbâncias foram lidas a 492 nm em leitor para microplacas da BioRad. O cut off foi à média das absorbâncias do controle negativo mais quatro vezes o desvio padrão (CAMARGO, 2001).

**Análise dos resultados** – A análise dos resultados foi realizada através do Programa Statistica versão 6.0, os resultados obtidos para NTPase foram tratados como variável independente. A sensibilidade, especificidade e eficiência do teste foram determinadas segundo Camargo (2001).

## RESULTADOS

Quarenta e dois (42) indivíduos, 22 com UPAPT - Uveíte posterior ativa presumivelmente por *Toxoplasma*. e 20 indivíduos controles, com média de idade de 30 anos, foram avaliados quanto a presença de NTPase de *T.gondii*, através de ELISA de captura utilizando anticorpo monoclonal 2F12. O limiar de reatividade (cut off) foi estabelecido a 0,364 (média dos valores negativos + 4DP) e o diagnóstico de UPAPT foi estabelecido através de critérios clínicos, conforme descrito em material e métodos.

No grupo (i) representado pelos indivíduos acometidos com UPAPT, 18 (81,8%) apresentaram reação positiva, com valores de absorvância variando de 0,368 a 0,965. No grupo controle (ii) 19 (95%) apresentaram reação negativa para NTPase, com valores de absorvância variando de 0,223 a 0,360. Neste grupo apenas um (5%) apresentou reação falso positiva para enzima. Estes dados estão representados na figura 1.

A sensibilidade e especificidade demonstradas pelo teste foram de 81,8% e 95%, respectivamente. A eficiência do teste foi de 0,89.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo caracterizou a presença de NTPase de *T.gondii* através de ELISA (*T. gondii* NTPase, captura) utilizando anticorpo monoclonal 2F12 nos grupos: (i) com UPAPT e (ii) sem a lesão. A análise estatística através do teste t, variável independente, revelou diferença significativa ( $p = 0,00001$ ) entre as absorvâncias dos dois grupos, no nível de 95% de confiança. O valor diagnóstico deste resultado é ressaltado quando se observa que os indivíduos do grupo (i) apresentam lesão ativa, com elevada multiplicação parasitária e acentuada produção de NTPase como antígeno livre.

Os resultados obtidos com o teste de ELISA (*T.gondii* NTPase, captura) correlacionados com os achados clínicos consistentes de Toxoplasmose ocular ativa sugerem ser a enzima um índice adequado para realização de diagnóstico em indivíduos com infecção ativa, principalmente naqueles com resposta imune deficiente, como os portadores do vírus HIV, em que apresentam resposta imune para *T. gondii* compatível com infecção latente, isto é, sem aumento de anticorpos. Além disso, o teste poderá ser de grande auxílio em gestantes, cujo teste de avidéz para IgG em alguns momentos pode apresentar-se inconclusivo.

**AGRADECIMENTOS:**

Os autores agradecem a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vláudia Costa (UFPE), Prof. Dr. Luiz Carlos (CPqAM – FIOCRUZ), Prof. Dr. Fábio Brayner (CPqAM – FIOCRUZ) por reagentes cedidos para conclusão deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ASAI, T., KANAZAWA, T., KOBAYASHI, S., TAKEUCHI, T., KIM, T. Do protozoa Conceal a high potency of Nucleoside Triphosphate Hydrolysis present in *Toxoplasma gondii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B (2): 365-367, 1986.
- ASAI, T., KIM, T., KOBAYASHI, M., KOJIMA, S. Detection of Nucleoside Triphosphate Hydrolase as a Circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 55 (5): 1332-1335, 1987.
- ASAI, T., MIZUNO, F., KOJIMA, S., TAKEUCHI, T., KOBAYASHI, A., SUZUKI, Y. 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.* 30 (5): 1291-1293, 1992.
- ASAI, T., O'SULLIVAN, W. J., TATIBANA, M. A potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the Parasitic Protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 258 (11): 6816-6822, 1983.
- ASAI, T., TAKEUCHI, T., Diffenderfer, J., Sibley, L. D. Identification of small-molecule inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (8): 2393-2399, 2002.
- CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in *Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e auto-ímmunes*. Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 2ª ed., pp: 278 -288, 2001.
- CASTAÑO OSÓRIO, J. C., SÁNCHEZ, R. M., IRAOLA, R. C., PÉREZ, J. S. Inhibición de la invasión y multiplicación de *Toxoplasma gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. *Rev. Cubana Méd Trop.* 53 (3): 161-169, 2001.
- CESBRON, J. Y., CAPRON, A., Ovlaque, G., Santoro, F. Use of a Monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). *J. Immunol. Methods*, 83: 151-158, 1985.
- CHAVES-BORGES, F.A., SOUZA, M. A., SILVA, D. A. O., KASPER, L. H., MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1(p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41 (6): 329-338, 1999.
- COELHO, R. 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.* 45 (4): 229-231, 2003.
- COLIGAN, E., KRUISBEEK, A. M., MARGULIES, D. H., SHEVACH, E. M., STROBER, W. in *Currents Protocols Immunology* 1: 2.6.1, 1991.
- GIRALDO, M., CANNIZZARO, H., FERGUSON, M. A. J., ALMEIDA, I. C., GAZZINELLI, R. T. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: Differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4): 1453-1460, 2000.
- HAFID, J., SUNG, R. T. M., RABERIN, H., AKONO, Z. Y., POZZETTO, B., JANA, M. Detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in human infection. *Am. J. Trop. Méd.*

*Hyg.* 52 (4): 336-339, 1995.

KIKUCHI, T., FURUTA, T., KOJIMA, S. Kinetics of the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii* in mice with acute and chronic Toxoplasmosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 96 (1): 35-41, 2002.

KOBAYASHI, M., MALAGUEÑO, E., SANTANA, V., PEREZ E. P., YANO, A. Prevalence of Toxoplasmosis in Northeastern Brazil. *Jpn J. Trop. Méd. Hyg.* 30: 305-310, 2002.

LYNCH, M. I., CORDEIRO, F., FERREIRA, S., XIMENES, R., ORÉFICE, F., MALAGUEÑO, E. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99 (8): 861-864, 2004.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl. 1): S73- 82, 2002.

NAKAAR, V., SAMUEL, B. U., NGO, E. O., JOINER, K. A. Targeted reduction of Nucleoside Triphosphate Hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J. Biol. Chem.* 274 (8): 5083-5087, 1999.

ORÉFICE, F., BONFIOLI, A. Toxoplasmose. in *Uveíte Clínica e Cirúrgica*, Org: Fernando Oréfice, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 620-678, 2000.

REMINGTON, J. S., THULLIEZ, P., MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of Toxoplasmosis. *J. Clin Microbiol.* 42 (3): 941-945, 2004.

SÁFADI, M. A. P., Toxoplasmose. *Pediatr. Mod.* 36 (1/2): 7 – 16, 2000.

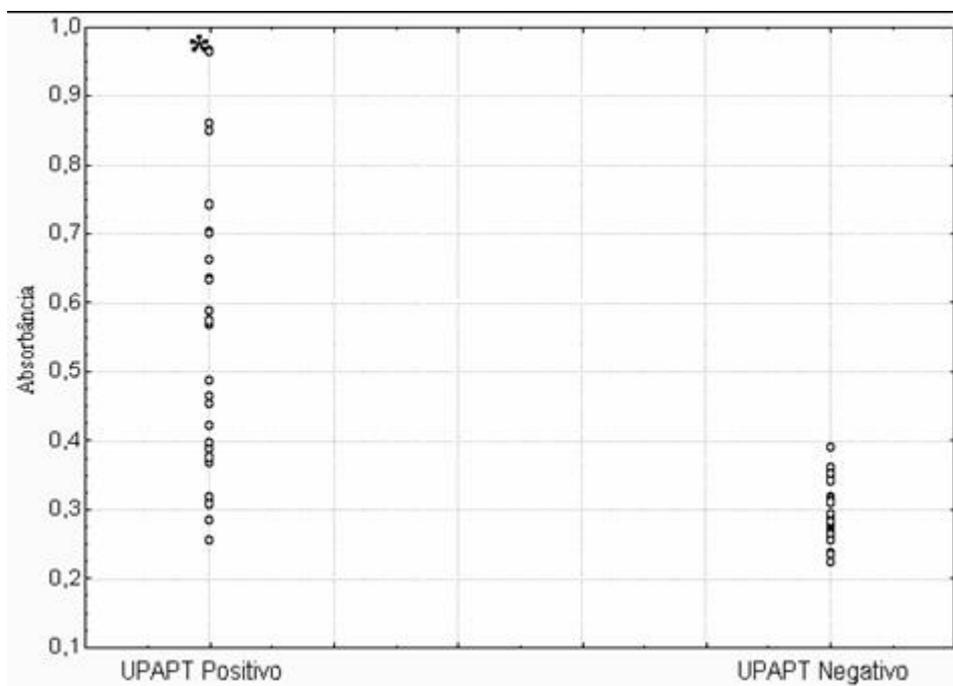
SPALDING, S.M., AMENDOEIRA, M. R. R., KLEI, C. H., RIBEIRO, L. C. Serological screening and Toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (2): 173 – 177, 2005.

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

UCHÔA, C. M. A., DUARTE, R., LAURENTINO-SILVA, V., COUTINHO ALEXANDRE, G. M., FERREIRA, H. G., AMENDOEIRA, M. R. R. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti- *Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 (6): 661-669, 1999.

## ANEXOS

## FIGURAS:



**Figura 1:** Presença de NTPase detectado através de ELISA (*T. gondii* NTPase, captura) utilizando anticorpo monoclonal 2F12, em soro de indivíduos com UPAPT e em indivíduos sem a lesão.

**Legenda:** \* Estatisticamente significativo  $p < 0.001$

### 8.3 Artigo 3

A ser submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

#### DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE - REVIEW

##### Diagnosis of Toxoplasmosis - Review

Ferreira, S\*, <sup>1, a/+</sup>; Malagueño, E\*; Porto, A. L. F<sup>2</sup>; Kobayashi, M<sup>3</sup>; Gomes Leitão, M. C\* ; Lima Filho, J.L\* .

\*Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) / UFPE, Recife, PE, Brasil,

<sup>1</sup>Universidade de Pernambuco (UPE), Deptº. de Patologia, ICB, Recife, PE, Brasil,

<sup>a</sup> Doutorado em Ciências Biológicas / UFPE, Recife, PE, Brasil,

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Deptº. de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, PE, Brasil,

<sup>3</sup>Universidade de Chiba, Escola de Medicina, Deptº. de Parasitologia, Inohana, Chiba/Japan.

#### Resumo

A toxoplasmose é uma zoonose de larga distribuição mundial, causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório. Uma vez o indivíduo infectado, o parasito se mantém latente por vários anos, pois o rápido avanço da imunidade humoral e celular restringe eficientemente a ação patogênica do parasito. Entretanto, a imaturidade do sistema imune (como em fetos e recém-nascidos) ou a sua deficiência (no caso dos indivíduos imunodeprimidos) pode causar séria morbidade ou mortalidade. A parasitose apresenta uma variedade de sinais e sintomas clínicos, e o diagnóstico laboratorial torna-se uma ferramenta de importância fundamental. A presente revisão tem como objetivo relatar as diferentes abordagens metodológicas utilizadas, atualmente, no diagnóstico da Toxoplasmose nas suas diferentes formas clínicas na tentativa de elucidar entre infecção latente e ativa que apresenta a principal estratégia para diminuir os danos provocados pelo parasita.

**Palavras - chaves:** Diagnóstico. Toxoplasmose. Revisão.

#### Abstract

Toxoplasmosis is a worldwide spread zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan. Once an individual is infected, the parasite remains latent for several years, since the fast advance of humoral and cellular immunity effectively restrains the parasite's pathogenic action. However, an immature immune system (as in fetuses and newborns) or its deficiency (as is the case of immunocompromised individuals) may cause serious morbidity or mortality. The parasitosis presents a variety of clinical signs and symptoms, and laboratory diagnosis becomes a fundamental tool. The current review has, as a goal, to report the different methodological approaches in their different clinical forms so as to try to make it clear between latent and active infection which presents the main strategy to reduce the damage caused by the parasite.

**Keywords:** Diagnosis. Toxoplasmosis. Review.

+ Autor de Correspondência – Rua Arnônio Marques s/n 50732-901 – Recife - PE, Brasil.  
Tel. +55 81 31841324; e-mail: [silvana.fatima@gmail.com](mailto:silvana.fatima@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais difundidas no mundo. O agente etiológico o *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), é um protozoário intracelular que desenvolveu várias rotas potenciais de transmissão. A infecção pelo *T.gondii* é extremamente comum entre os seres humanos e também em várias espécies de outros animais (herbívoros, carnívoros e onívoros), tendo os felinos, no nosso habitat o gato doméstico, como hospedeiros completos do parasito, eliminando em suas fezes uma das formas infectantes <sup>(1,2)</sup>.

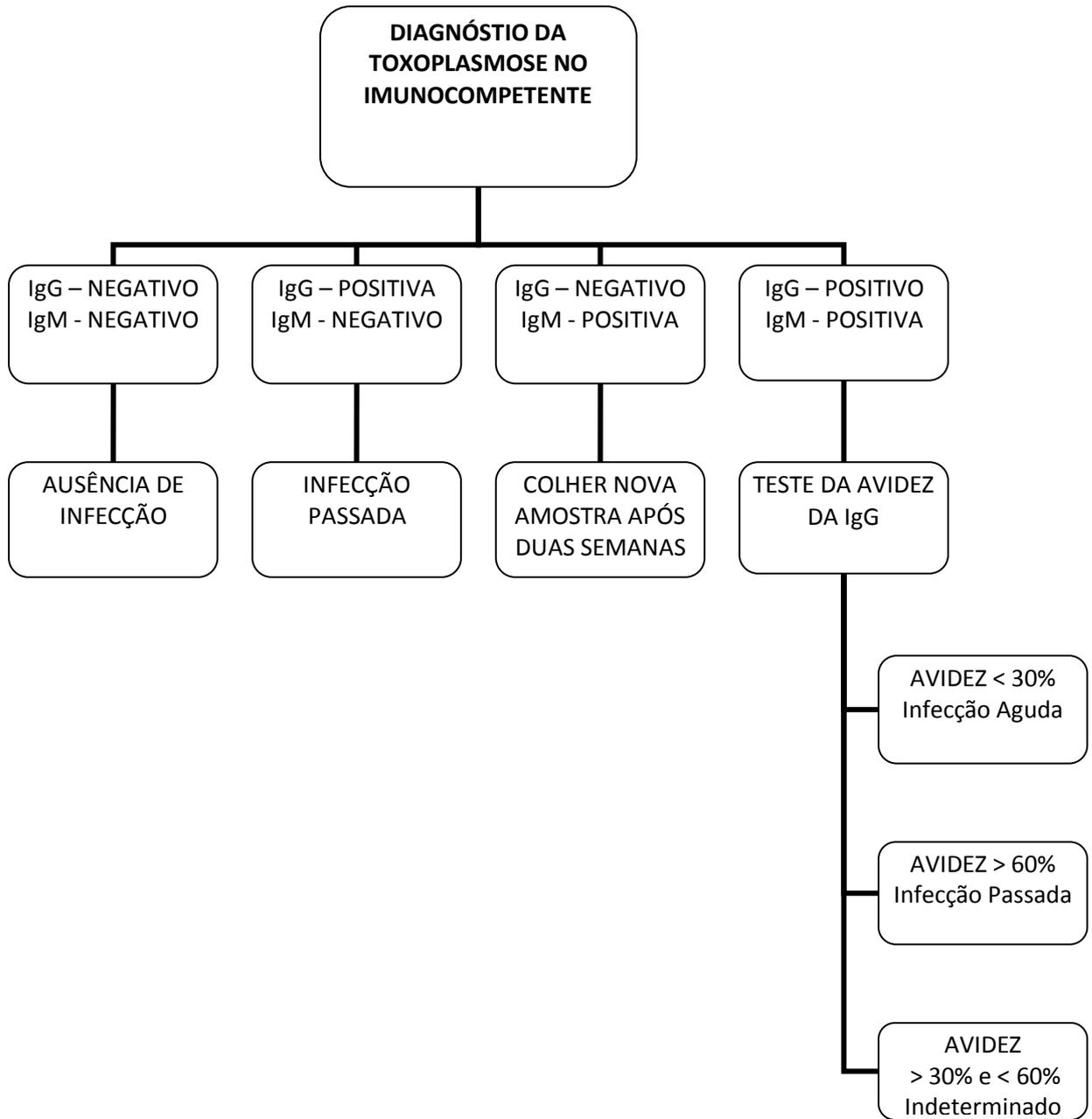
A Toxoplasmose é uma doença pandêmica e clinicamente está confinada a grupos de risco. No homem a doença apresenta-se geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, pois o rápido avanço da imunidade humoral e celular restringe eficientemente a ação patogênica do parasito. É estimado que a infecção possa existir na forma assintomática em cerca de 500 milhões a um bilhão de pessoas no mundo, no entanto, em fetos, recém-nascidos e nos indivíduos imunodeprimidos, a toxoplasmose pode causar séria morbidade e mortalidade <sup>(3)</sup>. A protozoose é classificada da seguinte maneira: **toxoplasmose congênita, toxoplasmose imunocompetente pós-natal e toxoplasmose no imunodeprimido** <sup>(4)</sup>.

O diagnóstico da Toxoplasmose apresenta-se como um dos mais complexos e em continua evolução no sentido de buscar novas técnicas que possam diferenciar entre infecções subclínicas (latentes) e infecção ativa, no entanto tal busca não tem sido fácil. É grande o número de indivíduos infectados assintomáticos, que possuem uma resposta imune (basal) variável. Esta diversidade da intensidade da resposta imune faz com que exista uma grande variação de limiar de reatividade (cut off) em várias regiões, além disso, o *T. gondii* é um parasita complexo apresentando formas evolutivas ativas (taquizoítos) e latentes (císticas) no mesmo hospedeiro, dificultando o diagnóstico <sup>(2)</sup>. Devido às dificuldades existentes na elucidação da infecção ativa a associação de várias metodologias diagnósticas pode ser mais efetiva na elucidação da fase da doença. Desta maneira a presente revisão tem como objetivo relatar as diferentes abordagens metodológicas utilizadas no diagnóstico da Toxoplasmose nas suas diferentes formas clínicas.

## Diagnóstico da Toxoplasmose no Imunocompetente

Na maioria dos indivíduos imunocompetentes a infecção ocorre de forma frustrada (cerca de 80%), a parasitemia é autolimitada e controlada especialmente pelo sistema imunológico, resultando numa forma clínica assintomática da doença. Entretanto, cerca de 20% dos casos de infecção aguda podem apresentar um quadro sintomático. Após este período o parasita permanece viável na forma de cistos de tecidos (bradizoítos), que reproduzem lentamente por toda a vida do hospedeiro, caracterizando deste modo a fase crônica da infecção <sup>(2,5)</sup>.

No imunocompetente o diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é, basicamente sorológico (**Fig 1**). A primeira infecção é indicada pela soroconversão com ou sem manifestações clínicas de fase aguda <sup>(6)</sup>. Interpretação cuidadosa deve ser realizada na presença de IgG e IgM positivos. A presença de IgM nem sempre caracteriza fase aguda, pois este anticorpo pode ser detectado um ano ou mais, após a infecção. A medida adotada nesta situação é a detecção da avididade da IgG que mede a afinidade do anticorpo aos antígenos do *T.gondii*. Caso a avididade seja elevada (>60%), significa infecção passada e no caso de baixa avididade (<30%) a infecção é recente <sup>(7)</sup>. A detecção da IgA pode ser de grande auxílio como marcador de fase aguda. A IgA se eleva quase ao mesmo tempo que os anticorpos IgM, entretanto negativa antes destes <sup>(8,9)</sup>.



**Figura 1:** Fluxograma do Diagnóstico da Toxoplasmose no Imunocompetente

**Fonte:** Esquema elaborado pelo autor com base na literatura

## Diagnóstico da Toxoplasmose Ocular

A Toxoplasmose é uma importante causa de uveíte em diferentes partes do mundo. No Brasil ela representa cerca de 50 – 80% do total das uveítes. Na Toxoplasmose ocular podem ser identificadas duas formas distintas: o resultado de uma infecção congênita ou de uma infecção pós-natal. Em ambas o acometimento pode ser precoce ou tardio<sup>(10, 11, 12)</sup>. Estudos de múltiplos casos, onde a fonte de infecção foi revelada e datada, demonstraram que o período entre infecção primária e o aparecimento dos sintomas oculares variaram de 1 mês a 3,5 anos, numa faixa etária de 10 – 57 anos<sup>(2)</sup>.

O diagnóstico da Toxoplasmose ocular está apoiado, freqüentemente, em aspectos clínicos típicos, como a presença de uma lesão ativa branco-amarelada com cicatriz pigmentada e perivasculite. Entretanto outras causas podem conduzir ao mesmo aspecto clínico. O diagnóstico laboratorial vem auxiliar no diagnóstico diferencial de tais lesões<sup>(12)</sup>.

Na Toxoplasmose ocular, geralmente não há correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e a sintomatologia ocular, sendo comum à ocorrência de títulos baixos de anticorpos<sup>(13)</sup>. Caracteristicamente a lesão ocular pelo *Toxoplasma* tem, como uma das marcas imunológicas, a produção intra-ocular de anticorpos anti-toxoplasma, devido a isto temos a carga de anticorpos no humor aquoso maior que a carga respectiva no soro, o que indicaria toxoplasmose ocular ativa. Isto expressa o índice de Desmonts-Witner, dado pelo quociente entre ambas as cargas. A aplicação desse índice resultou um nítido aumento da sensibilidade diagnóstica nos casos atípicos de Toxoplasmose ocular<sup>(6, 12)</sup>.

A avidéz da IgG no humor aquoso, constitui um bom marcador, em contraste com alta avidéz no soro<sup>(6, 14)</sup>. A detecção de IgA ocular também tem sido estudada como um bom marcador, estudos relatam uma forte associação entre a doença e a produção lacrimal de IgA, demonstrando ser esta imunoglobulina um auxílio no diagnóstico da Toxoplasmose Ocular<sup>(12, 15)</sup>. Outras pesquisas como a detecção do DNA do parasita, através de PCR, também estão sendo avaliadas<sup>(6, 16)</sup>.

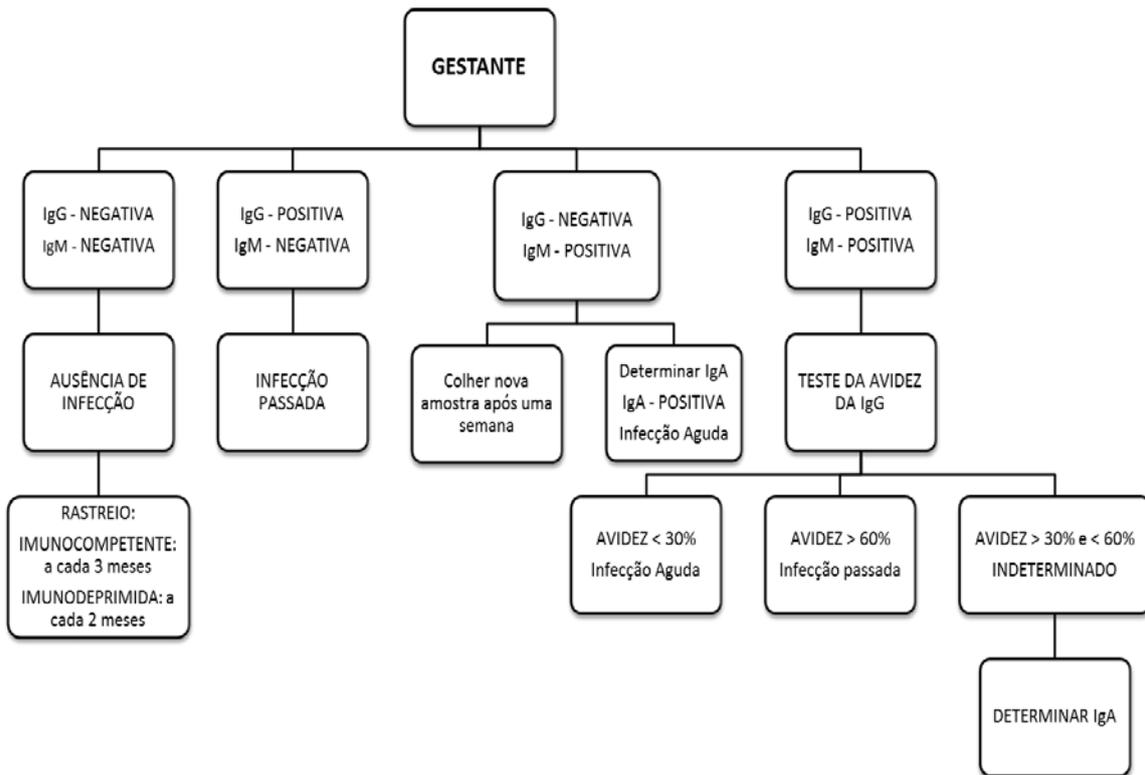
## Diagnóstico da Toxoplasmose na Gestante

Quando uma infecção primária por *T.gondii* é adquirida 4 a 6 meses antes da concepção ou mais cedo a imunidade protetora da mãe, normalmente, prevenirá a transmissão vertical ao feto, exceto naquela com algum comprometimento do sistema imune. Entretanto, se o primeiro contato ocorreu durante a gravidez, existe a possibilidade do parasita ser transmitido ao feto, mesmo em mulheres imunocompetentes <sup>(2)</sup>.

O rastreio da Toxoplasmose na gestação assume grande importância na prevenção da Toxoplasmose congênita. No Brasil aproximadamente 30% das gestantes são soronegativas para Toxoplasmose. A condição de soronegatividade aliada a uma prevalência de cerca de 80% da infecção no nosso meio (uma prevalência maior de soropositividade é um indicador de maior exposição da população aos fatores determinantes da doença), faz com que estas gestantes corram um elevado risco de soroconverter na vigência de uma gravidez <sup>(17, 18, 19)</sup>.

É importante notificar que as gestantes soronegativas contaminadas pelo *T.gondii* usualmente apresentam uma infecção assintomática, colocando em risco o feto. A doença só é detectada através do diagnóstico laboratorial <sup>(20, 21)</sup>. Em alguns países com alta prevalência como Áustria, Bélgica e França o programa de rastreio para detecção imediata e tratamento de infecções pelo *Toxoplasma* durante a gestação foi implantado. As gestantes imunocompetente, mas soro negativas são testadas trimestralmente para detectar soro conversão. No Brasil um programa de rastreio ainda não foi estabelecido <sup>(18)</sup>.

Particular atenção deve ser dada as gestantes imunodeprimidas, pois apresentam perfil sorológico de Toxoplasmose crônica (IgG positiva e IgM negativa) podendo ter reativação da infecção a qualquer momento da gestação sem sintomatologia evidente, as manifestações sintomáticas dependerão dos níveis de CD<sub>4</sub> <sup>(20, 21)</sup>. Devido a isto a avaliação deverá ser a cada dois meses <sup>(22)</sup>. O fluxograma abaixo (**Fig. 2**) representa as medidas diagnóstica utilizadas no rastreio da Toxoplasmose em gestantes com base na literatura.



**Figura 2:** Fluxograma do Perfil Diagnóstico da Toxoplasmose em Gestantes

**Fonte:** Esquema elaborado pelo autor com base na literatura

Atenção dobrada deve ser dada à interpretação diagnóstica, pois este grupo apresenta uma modulação da resposta imunológica podendo apresentar algumas variáveis individuais, como por exemplo, em 5% das gestantes a IgA não é detectada durante a fase aguda da infecção <sup>(23)</sup>.

### Diagnóstico da Toxoplasmose no Feto

A Toxoplasmose pode passar despercebida no momento do nascimento, porém poderá se manifestar meses ou até anos após a infecção. A ocorrência da gravidade da infecção e das implicações para o feto depende do momento da gestação, sendo mais grave no primeiro trimestre, resultando muitas vezes em aborto, partos prematuros e sequelas severas. Entretanto, se ocorre tardiamente, o resultado usual é o parto de um recém-nascido apresentando infecção subclínica <sup>(23)</sup> e embora estas crianças apareçam saudáveis ao nascimento, podem desenvolver sintomas clínicos e deficiências mais tarde em suas vidas.

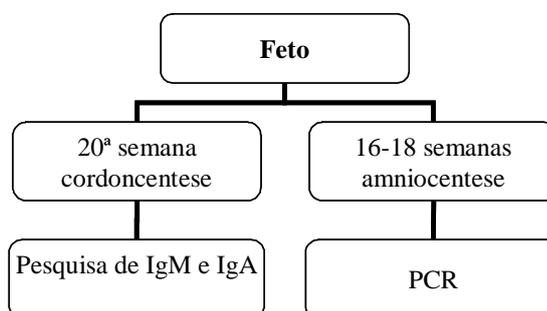
Estas deficiências predominantemente afetam os olhos (retinocoroidites, estrabismo, cegueira), o Sistema Nervoso Central (físicomotorial ou outras deficiências neurológica, convulsões, atraso mental) ou surdez. Calcula-se que 1/3 de crianças infectadas pré-natalmente desenvolverá dano visual <sup>(2, 19)</sup>. Estudo prospectivo realizado em lactentes com Toxoplasmose congênita apresentou em 11% dos casos, doença grave, em 33%, doença leve e em 56% a doença era inicialmente assintomática <sup>(10)</sup>.

As condições de transmissão ótimas ocorrem quando a parasitemia inicial, sobrevém em gestante próxima ao termo, isto é, o risco de infecção fetal aumenta com o decorrer da gestação. Deste modo, durante a gravidez a taxa de contaminação no primeiro trimestre é de 14%, no segundo de 29% e no terceiro, é de 59%. A gravidade da infecção fetal, ao contrário, diminui à medida que se aproxima ao termo. A explicação para tal fato é que o feto no início da gestação pouco se beneficia da imunidade passiva materna, pois pouca ou quase nenhuma IgG atravessa a barreira placentária. A infecção estabelecida neste momento com sistema imune imaturo permite a ocorrência de uma doença grave. Ao redor da 20ª semana a IgG materna aparece no sangue fetal, em resposta a infecção fetal, mas seus níveis permanecem baixos até a 30ª semana. Após a 30ª semana a quantidade de IgG cresce rapidamente se houver infecção fetal <sup>(4, 9, 24)</sup>.

O diagnóstico fetal é recomendado quando se estabelece um diagnóstico de Toxoplasmose adquirida durante a gravidez, tendo como referência provas sorológicas. A média global geral de infecção fetal das gestantes que apresentaram soro conversão está na faixa de 30 – 40%. O esquema abaixo (**Fig. 3**) descreve resumidamente as principais provas utilizadas no diagnóstico fetal <sup>(6, 8)</sup>.

A cordoncentese é realizada na 20ª semana de gravidez, buscando identificar IgM ou IgA contra o parasita. O fator limitante é a imaturidade imunológica, apenas 30 – 50% dos fetos infectados apresentam positividade para IgM e IgA nesta fase <sup>(6, 8, 16)</sup>.

A identificação do DNA parasitário através de PCR tem uma sensibilidade de 92%, podendo ser realizada no líquido amniótico (16ª - 18ª semanas) com menores riscos para o feto. É um exame que está limitado, ainda, aos grandes centros. Além disso, pela sua sofisticação e custo, só é realizado após certeza de que a mãe está na fase aguda <sup>(6, 8, 9, 16)</sup>.



**Figura 3:** Fluxograma do diagnóstico de Toxoplasmose no Feto.  
**Fonte:** Esquema elaborado pelo autor com base na literatura

### Diagnóstico da Toxoplasmose no Neonato

O diagnóstico neonatal de Toxoplasmose é realizado através do exame físico geral, exames oftalmológicos, neurológicos, tomografia computadorizada crânio-encéfalo, tentativa de isolamento do parasita, detecção de anticorpos, análise do LCR (Líquido céfalo-raquidiano) e PCR <sup>(6, 16, 25)</sup>. Deve-se salientar que as medidas diagnósticas deverão ser executadas mediante um acompanhamento prévio (pré-natal) da gestante de risco, que no caso incluem as soronegativas e aquelas com alguma forma de imunossupressão.

O diagnóstico de rotina (**Fig. 4**) do neonato está ligado à detecção de imunoglobulinas no soro e em casos especiais no LCR. Entretanto a cinética de produção das imunoglobulinas deve ser avaliada com cautela. O perfil sorológico do recém-nascido é comparado com o perfil sorológico materno; o soro do recém-nascido não infectado irá originar um perfil semelhante ao materno, caso infectado produzirá seus próprios anticorpos <sup>(6, 16)</sup>.

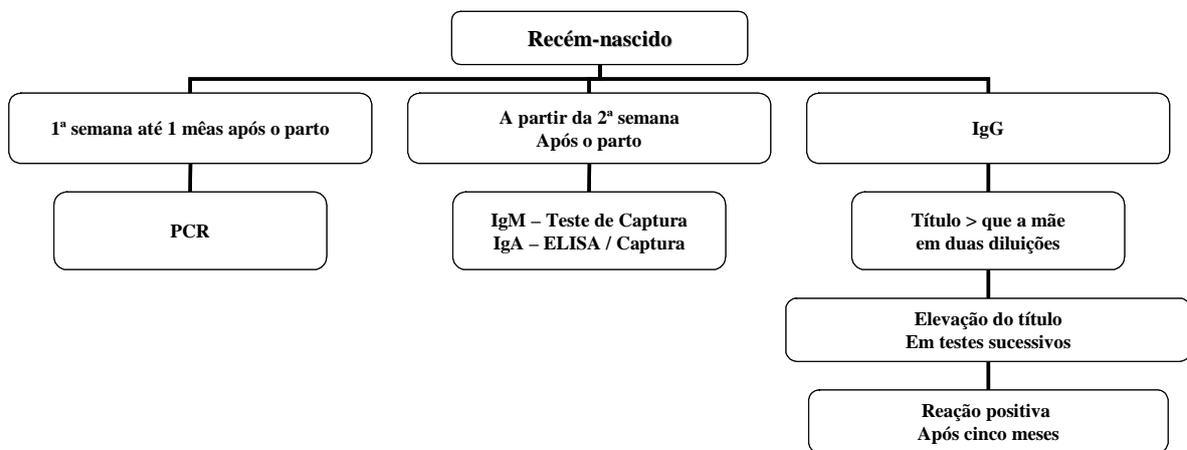
Os anticorpos a serem detectados são IgM, IgA e IgG. Entretanto a presença de anticorpos IgG no recém-nascido não é evidencia de infecção, visto que a IgG materna atravessa a placenta. Os anticorpos IgG maternos transferidos passivamente levam alguns meses (ou até 1 ano) para desaparecer do soro do lactente, de acordo com a magnitude do título original <sup>(6, 16, 25)</sup>.

A detecção de IgM é de grande valor diagnóstico, pois indica síntese de anticorpo pelo neonato, entretanto ele pode não está presente devido a imaturidade do sistema imune, devendo ser repetida 1 a 2 meses após o nascimento. Além disso, a técnica de escolha para detecção desse anticorpo deve ser o teste de captura da IgM para eliminar os falsos positivos, devido a reações cruzadas com o fator reumatóide que é muito freqüente em neonatos <sup>(6, 16, 25)</sup>.

A detecção de IgA também tem sido recomendada no diagnóstico da infecção neonatal, aparecendo tão ou mais sensível quanto a detecção de IgM <sup>(6, 8, 16)</sup>.

A produção de IgM ou IgG no LCR demonstra produção local, estabelecendo assim diagnóstico definitivo de infecção congênita <sup>(25)</sup>.

Caso as dúvidas sobre a infecção persistam o PCR é o método a ser utilizado, podendo ser realizado no sangue venoso até um mês do nascimento <sup>(6, 16)</sup>.



**Figura 4:** Fluxograma do diagnóstico de Toxoplasmose no recém-nascido.

**Fonte:** Esquema elaborado pelo autor com base na literatura

## Diagnóstico da Toxoplasmose no Imunodeprimido

Nos indivíduos portadores de doenças imunossupressoras (leucemia, linfomas, agamaglobulinemia, AIDS), ou em vigência de terapêutica imunossupressora, a infecção por *T.gondii* pode assumir formas graves e fatais <sup>(10)</sup>. Nos transplantados ou aqueles com doenças malignas, previamente infectados pelo *T.gondii*, o perfil sorológico é compatível com reativação, isto é aumento de IgG e IgA <sup>(5,6)</sup>.

A Toxoplasmose tornou-se um problema preocupante, a partir dos anos 80, com a epidemia da AIDS, pois a imunodeficiência possui capacidade de agudizar as formas crônicas (císticas) da infecção, tornando-a uma das principais causa de morte dos aidéticos <sup>(26)</sup>. Nesses indivíduos o *T. gondii* apresenta-se como importante patógeno oportunista, podendo ocorrer comprometimento neurológico (encefalite e mielopatia), pulmonar (pneumonite), cardíaco (miocardite) e ocular (retinocoroidite) <sup>(4)</sup>.

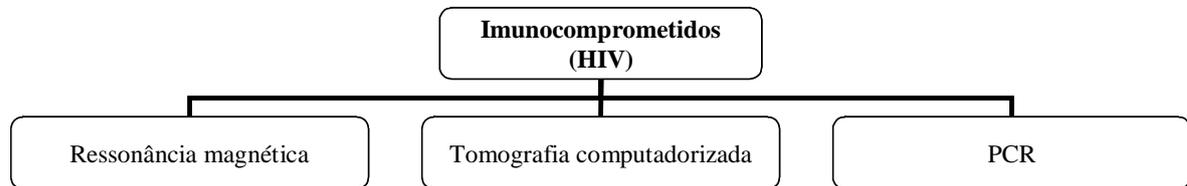
A neurotoxoplasmose ocorre mais freqüentemente como reativação de foco infeccioso latente, é mais comum em pacientes com uma contagem de linfócitos TCD4+ , em sangue periférico, abaixo de 200/mm<sup>3</sup>. A toxoplasmose tornou a causa mais comum de encefalite em HIV nos Estados Unidos entre os anos 80 - 90. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, a Toxoplasmose chega a 15,4% das principais doenças oportunistas que afeta este grupo de risco e quando não diagnosticada e tratada cedo tem curso clínico fatal <sup>(5,22)</sup>.

O diagnóstico precoce de neurotoxoplasmose em HIV tem sido limitado devido à falta de testes não invasivos de alta sensibilidade e especificidade <sup>(5)</sup>. O diagnóstico imunológico é dificultado pelo perfil anômalo sorológico. O padrão sorológico se comporta de maneira semelhante a um perfil de infecção latente, ou seja, não há detecção de IgM e não há elevação de IgG. O LCR encontra-se normal ou apresenta alterações não específicas <sup>(5,6,16)</sup>.

O uso da PCR em pacientes com AIDS e encefalite por *Toxoplasma gondii* é útil em casos de infecção disseminada, além disso, a PCR para detecção do *Toxoplasma gondii* sofre de falta de padronização conduzindo a um desempenho variável de acordo com o laboratório. Embora o ganho inquestionável que a PCR trouxe para o difícil diagnóstico da Toxoplasmose, há ainda lacunas e novos parâmetros técnicos devem ser desenvolvidos para evitar as limitações <sup>(5,27)</sup>.

Em termos gerais o diagnóstico da toxoplasmose em indivíduo imunodeprimido está restrito a exames de análise de imagem (**Fig 5**), como a tomografia computadorizada do crânio-encéfalo demonstrando lesões iso ou hipodensas uni ou multifocais e a ressonância

magnética do crânio-encéfalo, demonstrando lesões iso ou hipodensas, únicas ou múltiplas (28).



**Figura 5:** Fluxograma do diagnóstico de Toxoplasmose em indivíduos com HIV/AIDS.

**Fonte:** Esquema elaborado pelo autor com base na literatura

### Proteômica – O Futuro

A sequência genômica e/ou a sequência **tag** expressada (EST) já estão agora disponíveis em bancos de dados para muitos protozoários de importância médica e veterinária, o que revolucionou o estudo dos genes funcionais destes organismos. No passado, dificuldades práticas consideráveis, impossibilitavam a análise da expressão gênica, agora, milhares de genes podem ser monitorados simultaneamente para caracterizar eventos moleculares que ocorrem durante processos biológicos fundamentais, como crescimento e diferenciação parasitária (29).

Os avanços presentes na genômica possibilitaram novos desafios; a obtenção da sequência gênica não é agora mais um passo limitado, de forma que desenvolver e empregar métodos, para identificar qual dos milhares de genes expresso por um organismo é relevante para questões biológicas em particular se tornou uma prioridade. Este imperativo tem conduzido ao desenvolvimento denominado tecnologia pós-genoma como análise de *microarray* para caracterização de expressão global de mRNA e análise proteômica de expressão global de proteínas (29).

O estudo da sequência genômica do *T. gondii* está limitada aos bancos de dados de EST e os estudos proteômicos estão sendo inicializados e muitos estão voltados para a chave da patogênese da Toxoplasmose, a transição de bradizoíto para taquizoíto, e mecanismos da resposta imune que envolve este parasita. A caracterização dos genes e expressão de proteínas

dentro das diferentes fases do protozoário são essenciais para entender os mecanismos pelo qual o mesmo tem sucesso como parasita intracelular. Além disso, é importante salientar que as pesquisas neste campo são importantes para detectar os genes e as proteínas para a obtenção de antígenos diagnósticos, vacinas e drogas terapêuticas para este importante parasita de humanos e animais<sup>(29, 30, 31, 32, 33)</sup>.

**REFERÊNCIAS**

- 1 PESSOA, S. B. in: **Parasitologia Médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,, 1967. p: 307 – 322.
- 2 TENTER, A. M., Heckerroth, A. R., Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- 3 GIRALDO, M. et al. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: Differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic Toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol**, v. 38, n 4, p: 1453-1460, 2000.
- 4 HINRICHSEN, S. L. et al. Toxoplasmose. In: BATISTA, R. S., et al **Medicina Tropical – Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. Cap. 19, p.193 – 203.
- 5 FERREIRA, M. S. e BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 97, n 4, p: 443-457, 2002.
- 6 CAMARGO, M. E. TOXOPLASMOSE IN: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. in: **Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e auto-ímmunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara –Koogan, 2001. Cap. 27, p: 278 -288.
- 7 REMINGTON, J. S., THULLIEZ, P., MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of Toxoplasmosis. **J. Clin Microbiol**. v. 42, n 3, p: 941-945, 2004.
- 8 AMENDOEIRA, M. R. R. Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congênita. **Rev. Cubana Invest. Biomed**. v 20, n 2, p: 118-121, 2001.
- 9 DUTRA LEÃO, P. R. Toxoplasmose e Gravidez. *Femina*. v 30, n 2, p: 99-102, 2002.
- 10 SÁFADI, M. A. P., Toxoplasmose. **Pediatr. Mod**. v 36, n 1/2, p: 7 – 16, 2000.
- 11 BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Highly endemic, waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis**. v 9, n 1, p: 55-62, 2003.
- 12 LYNCH, M. I. et al. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v 99, n 8, p: 861-864, 2004.
- 13 ORÉFICE, F., BONFIOLI, A. Toxoplasmose. In: ORÉFICE, F. Uveíte Clínica e Cirúrgica, Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, 2000, p: 620-678.
- 14 LESER, P. Teste de avidéz de IgG para Toxoplasmose. Disponível em: <http://www.fleury.com.br>. Acesso em 02 abr. 2005.
- 15 GÓMEZ-MARÍN, 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.
- 16 MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis. **J. Infect. Dis**. v 185 Suppl. 1, p: S73- 82, 2002.
- 17 NÓBREGA, M. C. et al. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE. **RBM – Ginecologia e Obsterícia**. v 56, 1999.
- 18 VARELLA, I. S. et al. Prevalência de soropositividade para Toxoplasmose em gestante.

- J. Pediatr.** v 79, n 1, p: 69-74, 2003.
- 19 SPALDING, S. M. et al. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de Toxoplasmose Congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.* v 36, n 4, p: 483-491, 2003.
  - 20 FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: Ricardo Veronesi. **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Atheneu, 1996, p: 1290 -1304.
  - 21 NOGUEIRA, S. A. et al. Toxoplasmic Encephalitis in HIV Infected pregnant woman: successful outcome for both mother and child. *Braz. J. Infect. Dis.* v 6, n 4, p: 201-205, 2002.
  - 22 MANUAL DE CONDUTAS MÉDICAS – Atenção à Mulher, Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.ids-saude.org.br/medicina>. Acesso em 02 abr. 2005.
  - 23 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.
  - 24 COUTO, J. C. F. Toxoplasmose e Gestação. **Femina.** v 26, n 9, p: 753-759, 1998.
  - 25 BEHRMAN, R. E., KLEIGMAN, R. M, JENSON, H. B. in: **Tratado de Pediatria.** 16<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, publicado, 2002.
  - 26 REY, L. in: **Bases da Parasitologia Médica.** 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, publicado, 2002.
  - 27 KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Trans. Soc. Trop. Méd. Hyg.** v 98, p: 92-95, 2004.
  - 28 OSBORN, A. G. in: **Diagnóstico Neuroradiológico.** Rio de Janeiro: Revinter, publicado, 1999.
  - 29 COHEN, A. M. et al. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*. **Int. J for Parasitol.** v 32, p: 39-51, 2002.
  - 30 JOHNSON, A. M. et al. Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **Gene.** v 85, p: 215-220, 1989.
  - 31 KISSINGER, J. C. et al. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. **Nucleic Acids Res.** v 31, n 1, p: 234-236, 2003.
  - 32 BANNENBERG, G.L. et al. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A<sub>4</sub> biosynthesis. **JEM.** v.199, n 4: 515-523, 2004.
  - 33 ZHOU, X. W. et al. Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. *Mol. Cell. Prot.* v 3, n 6, p: 565-575, 2004.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS CIENTÍFICAS

O presente trabalho levou ao surgimento de duas aplicações metodológicas na área da biotecnologia: a utilização de ELISA de captura para NTPase de *Toxoplasma gondii* e a purificação de anticorpo através de Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA).

A utilização de anticorpos monoclonais em diagnóstico, imunoterapia e outras metodologias biomédicas, têm como ponto chave o teor de purificação e a atividade biológica preservada. No entanto os protocolos atuais, muitas vezes, envolvem tempo demasiado, pessoal qualificado e alto custo. A utilização do sistema de duas fases aquosas (SDFA) na purificação de anticorpo monoclonal – classe IgA, oriundo de cultura de células mostrou-se eficiente na purificação do anticorpo. Além disso, o monoclonal IgA purificado por SDFA, estava presente na fase Sal do Sistema, necessitando apenas de uma diálise e concentração, o que facilita sua recuperação; isto representa uma vantagem em relação a purificação da IgG através de SDFA, onde o anticorpo está presente na fase onde se encontra o polímero (PEG) necessitando de uma nova extração. Deste modo, o SDFA surge como uma alternativa promissora na purificação da IgA, devido a facilidade na execução e preservação da atividade biológica da imunoglobulina.

Considerando que a busca de novas metodologias diagnóstica para toxoplasmose, que diferencie fase ativa e latente do parasita, representa uma das principais estratégias para diminuir os danos provocados pelo parasita, nos grupos de risco. O desenvolvimento de um ELISA de captura para NTPase de *T.gondii* em soro de indivíduos infetados, apresentando a forma ocular da infecção, sugere a possibilidade da utilização da enzima como marcador de fase ativa. Para tal, os estudos deverão ser ampliados a outros grupos de risco. Acreditamos, também que a investigação da NTPase, possa levar a outras descobertas, além do papel de marcador de fase ativa.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. **Wiley-Interscience**, New York, 346 p., 1986.
- AMENDOEIRA, M. R. R. Diagnóstico de la Toxoplasmosis Congênita. **Rev. Cubana Invest. Biomed.** 20 (2): 118-121, 2001.
- AMENDOEIRA, M. R. R., SOBRAL, C. A. Q., TEVA, A., NAZARENO DE LIMA, J., KLEIN, C. H. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.** 36 (6): 671-676, 2003.
- ANDREWS, B. A., NIELSEN, S., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. **Biosseparation.** 6: 303-313, 1996.
- ASAI, T., O'SULLIVAN, W. J., TATIBANA, M. A potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase from the Parasitic Protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.** 258 (11): 6816-6822, 1983.
- ASAI, T., KANAZAWA, T., KOBAYASHI, S., TAKEUCHI, T., KIM, T. Do protozoa Conceal a high potency of Nucleoside Triphosphate Hydrolysis present in *Toxoplasma gondii*. **Comp. Biochem. Physiol.** 85B (2): 365-367, 1986.
- ASAI, T., KIM, T., KOBAYASHI, M., KOJIMA, S. Detection of Nucleoside Triphosphate Hydrolase as a Circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** 55 (5): 1332-1335, 1987.
- ASAI, T., MIZUNO, F., KOJIMA, S., TAKEUCHI, T., KOBAYASHI, A., SUZUKI, Y. 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.** 30 (5): 1291-1293, 1992.
- ASAI, T., MIURA, S., SIBLEY, L. D., OKABAYASHI, H., TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of Nucleoside Triphosphate Hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.** 270 (19): 11391-11397, 1995.
- ASAI, T., TAKEUCHI, T., DIFFENDERFER, J., SIBLEY, L. D. Identification of small-molecule inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46 (8): 2393-2399, 2002.
- ASENJO, J. A. in Separation Processes in Biotechnology. Marcel Dekker, INC, New York – New York, 1990
- ASSMAR, M., AMIRKHANI, A., PIAZAK, N., HOVANESIAN, A., KOOLOOBANDI, A., ETASSAMI, R. Toxoplasmosis in Iran. Results of a seroepidemiological study. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 90 (1): 19-21, 1997.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., JONES, J. L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C. C. F., ORÉFICE, F., ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne Toxoplasmosis in North Rio de

Janeiro state, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 9 (1): 55-62, 2003.

BANNENBERG, G.L., ALIBERTI, J., HONG, S., SHER, A., SERHAN, C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A<sub>4</sub> biosynthesis. **JEM.** 199 (4): 515-523, 2004.

BEHRMAN, R. E., KLEIGMAN, R. M, JENSON, H. B. In: **Tratado de Pediatria.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 16<sup>a</sup> ed., pp:1040-1047, 2002

BEIJERICK , M. W. *Zbl. Bakt.*, 2: 627-689, 1896.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in **Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e auto-ímmunes.** Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro - RJ, pp:165-174, 1996.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose in **Diagnóstico laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e auto-ímmunes.** Org: Antonio Walter Ferreira e Sandra L. M. Ávila, Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 2<sup>a</sup> ed., pp: 278 -288, 2001.

CARVALHO, C. M. C. N., FARHAT, C. K. Toxoplasmose adquirida. **J. de Pediatria.** 75, Supl. 1: S63-S67, 1999.

CASTAÑO OSÓRIO, J. C., SÁNCHEZ, R. M., IRAOLA, R. C., PÉREZ, J. S. Inhibición de la invasión y multiplicación de *Toxoplasma gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. **Ver. Cubana Méd Trop.** 53 (3): 161-169, 2001.

CDC. Toxoplasmosis. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Adquirido em 24/02/2005.

CHAVES-BORGES, F.A., SOUZA, M. A., SILVA, D. A. O., KASPER, L. H., MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1(p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 41 (6): 329-338, 1999.

CHIARI, C. A., NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 79 (3): 337-340, 1984.

COELHO, R. 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.** 45 (4): 229-231, 2003.

COHEN, A. M., RUMPEL, K., COOMBS, G. H., WASTLING, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*. **Int. J for Parasitol.** 32: 39-51, 2002.

COSTA, S. A., PESSOA JR., A., ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by na aqueous two-phase system. **J. Chrom. B.** 743: 339-348, 2000.

COUTO, J. C. F. Toxoplasmose e Gestação. **Femina.** 26 (9): 753-759, 1998.

COUTO, J. C. F., LEITE, J. M., RODRIGUES, M. V. Diagnóstico laboratorial da

Toxoplasmose na gestação. **Femina**. 30 (10): 731-737, 2002.

DUTRA LEÃO, P. R. Toxoplasmose e Gravidez. **Femina**. 30 (2): 99-102, 2002.

DUTRA LEÃO, P. R., MEIRELLES FILHO, J., MEDEIROS, S. F. Toxoplasmose: Soroprevalência em puérperas atendidas pelo sistema único de saúde. **RBOG**. 26 (8): 627-631, 2004.

FAN, C. K., SU, K.E., WU, G. H., CHIOU, H. Y. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* among two mountain aboriginal populations and Southeast Asian labores in Taiwan. **J. Parasitol**. 88 (2): 411-414, 2002.

FERREIRA, M. S., BORGES, A. S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**. 97 (4): 443-457, 2002.

FRANCO, T. T., KILIKIAN, B. V., COIMBRA, J. S. R., MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas in **Purificação de produtos biotecnológicos**, Org: Adalberto Pessoa JR., Beatriz Vahan Kilikian, Manole, Barueri – SP, pp: 117-169, 2005.

FRENKEL, JK; DUBEY, JP; MILLER, NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167: 893-6, 1970.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose in **Tratado de Infectologia**, Org: Ricardo Veronesi, Atheneu, São Paulo –SP, pp: 1290 -1304, 1996.

GALVÁN-RAMÍREZ, M. L., GUILLÉN-VARGAS, C., SAAVEDRA-DURÁN, R., ISLÁS-RODRÍGUEZ, A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients, **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, 31(3): 271-277, 1998.

GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R. C., KOBILKA, E. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da Toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Ver. Panam. Salud Publica**. 6 (3): 157-163, 1999.

GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., OGAWA, L., MARANA, E. R. M. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciênc. Rural**. 30 (1): 123-127, 2000.

GAVASANE, M. R., GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillin acylase* from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme Microb Tech**. 32: 665-675, 2003.

GIRALDO, M., CANNIZZARO, H., FERGUSON, M. A. J., ALMEIDA, I. C., GAZZINELLI, R. T. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: Differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic Toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol**. 38 (4): 1453-1460, 2000.

GÓMEZ-MARÍN, J. E., MONTOYA-DE-LONDOÑO, M. T., CASTAÑO-OSORIO, J. C., HEINE, F. A., Duque, A. M., Chemla, C., Aubert, D., Bonhomme, A., Pinon, J. M. Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in colombian patients with

acute and chronic ocular Toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 95(1): 89-94, 2000.

GRIMWOOD, J e SMITH, J. S. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **Int J Parasitol.** 26(2): 169-173, 1996.

HEDMAN, K., LAPPALAIN, M., SEPPALA, I., MAKELA, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect. Dis.** 159: 736-40, 1989.

HINRICHSEN, S. L., TAVARES NETO, J. I., PONTES NETO, N. T., MENDONÇA, P. M., SILVA, P. F. S., SILVA, P. L. S. Toxoplasmose. in **Medicina Tropical – Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias.**, Org: Rodrigo Siqueira Batista, Andréia Patrícia Gomes, Ricardo Pereira Igreja, Donald William Huggins, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 193 - 203, 2001.

HIRAMOTO, R.M., MAYRBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR, A. J., MEIRELES, L. R., MACRE, M. S., ANDRADE JR, H. F. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Rev. Saúde Pública.** 35 (2): 113-118, 2001.

HOFF, E. F., CARRUTHERS, V. B. In *Toxoplasma* egress the first step in invasion? **Trends Parasitol.** 18 (6): 251-255, 2002.

JOHNSON, A. M., ILLANA, S., MCDONALD, P. J., ASAI, T. Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii*. **Gene.** 85: 215-220, 1989.

JONES, J. L., KRUSZON-MORAN, D., WILSON, M. *Toxoplasma gondii* infection on the United States, 1999 – 2000. **Emerg Infect Dis.** 9 (11): 1371-1374, 2003.

JONHSON, M., BROADY, K., ANGELICI, M. C., JOHNSON, A. The relationship between Nucleoside Triphosphate Hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human Toxoplasmosis. **Microbes Infect.** 5: 797-806, 2003.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii* in: **Parasitologia Humana.**, Org: David Pereira Neves, Alan Lane de Melo, Pedro marcos Linardi, Ricardo W. Almeida Vitor, Atheneu, São Paulo – SP, 11<sup>a</sup> ed, pp: 163 - 203, 2005.

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

KIKUCHI, T., FURUTA, T., KOJIMA, S. Kinetics of the Nucleoside Triphosphate Hydrolase of *Toxoplasma gondii* in mice with acute and chronic Toxoplasmosis. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 96 (1): 35-41, 2002.

KISSINGER, J. C., GAJRIA, B., LI, L., PAULSEN, I. T., ROSS, D. S. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. **Nucleic Acids Res.** 31(1): 234-236, 2003.

KOBAYASHI, M., MALAGUEÑO, E., SANTANA, V., PEREZ E. P., YANO, A. Prevalence of Toxoplasmosis in Northeastern Brazil. **Jpn J. Trop. Med. Hyg.** 30: 305-310, 2002.

KOMPALIC-CRISTO, A., NOGUEIRA, S. A., GUEDES, A. L., FROTA, C., GONZÁLEZ, L. F., BRANDÃO, A., AMENDOEIRA, M. R., BRITTO, C., FERNANDES, O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.** 98: 92-95, 2004.

LESER, P. Teste de avidéz de IgG para Toxoplasmose. <http://www.fleury.com.br>. Adquirido em 02/04/2005.

LYNCH, M. I., CORDEIRO, F., FERREIRA, S., XIMENES, R., ORÉFICE, F., MALAGUEÑO, E. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 99 (8): 861-864, 2004.

MANUAL DE CONDUTAS MÉDICAS – Atenção à Mulher, Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.ids-saude.org.br/medicina>>, 2002.

MEIRELES, L. R., GALISTEO JR, A. J., ANDRADE JR, H. F. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 40 (4): 267-271, 2003.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and Toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** 185 (Suppl. 1): S73- 82, 2002.

NAKAAR, V., SAMUEL, B. U., NGO, E. O., JOINER, K. A. Targeted reduction of Nucleoside Triphosphate Hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. **J. Biol. Chem.** 274 (8): 5083-5087, 1999.

NAKAJIMA-NAKANO, K., MAKIOKA, A., YAMASHITA, N., MATSUO, N., ASAI, T. Evaluation of serodiagnosis of Toxoplasmosis by using the recombinant Nucleoside Triphosphate Hydrolase isoforms expressed in *Escherichia coli*. **Parasitol. Inter.** 48: 215-222, 2000.

NÓBREGA, M. C., MAGALHÃES, V., ALBUQUERQUE, Y., MAGALHÃES, C., ARCOVERDE, C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE. **RBM – Ginecologia e Obstetria.** 56, 1999.

NOGUEIRA, S. A., GUEDES, A. L., MACHADO, E. S., MATOS, J. A., COSTA, T. P., CORTES, E. M., LAMBERT, J. S. Toxoplasmic Encephalitis in na HIV Infected pregnant woman: successful outcome for both mother and child. **Braz. J. Infect. Dis.** 6 (4): 201-205, 2002.

ORÉFICE, F., BONFIOLI, A. Toxoplasmose. in **Uveíte Clínica e Cirúrgica**, Org: Fernando Oréfice, Cultura Médica, Rio de Janeiro – RJ, pp: 620-678, 2000.

OSBORN, A. G. in **Diagnóstico Neuroradiológico**, Revinter, Rio de Janeiro – RJ, pp: 673-715, 1999.

OLIVEIRA, L. A., SARUBBO, L. A., PORTO, A. L. F., LIMA-FILHO, J. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TAMBOURGI, E. B. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. **Process biochem.** 38 (5): 693-699, 2002.

REITER-OWONA , I., SEITZ, H., GROSS, U., SAHM, M., ROCKSTROH, J. K., SEITZ, H. M. Is stage conversion the initiating event for reactivation of *Toxoplasma gondii* in brain

tissue of AIDS patients? **J. Parasitol.** 86 (3): 531-536, 2000.

REMINGTON, J. S., THULLIEZ, P., MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of Toxoplasmosis. **J. Clin Microbiol.** 42 (3): 941-945, 2004.

REY, L. Toxoplasmose in: **Bases da Parasitologia Médica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2ª ed, pp: 102 -111, 2002.

SÁFADI, M. A. P., Toxoplasmose. **Pediatr. Mod.** 36 (1/2): 7 – 16, 2000.

SARUBBO, L.A., OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., DUARTE, H.S., CARNEIRO-LEÃO, A.M.A., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TAMBOURGI, E.B., New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** 743 (1-2): 79 – 84, 2000.

SHARON, J. Sobre microorganismos e defesa do hospedeiro, in: **Imunologia básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, pp: 03 - 12, 2000.

SIBLEY, D., NIESMAN, I. R., ASAI, T., TAKEUCH, T. *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase into the Parasitophorus Vacuole. **Exp. Parasitol.** 79: 301-311, 1994.

SPALDING, S. M., AMENDOEIRA, M. R. R., RIBEIRO, L. C., SILVEIRA, C., GARCIA, A. P., CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de Toxoplasmose Congênita em município do Rio Grande do Sul. **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.** 36 (4): 483-491, 2003.

SPALDING, S. M., AMENDOEIRA, M. R. R; KLEIN, C. H; RIBEIRO, L. C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38(2): 173-7, 2005.

TABBARA, K. F. Disruption of the chorioretinal interface by toxoplasma. **Eye.**4: 366-373, 1990.

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

Tomavo S. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structure and function. **Curr Top Microbiol Immunol** 219: 45-54, 1996.

TUBIO, G., NERLI, B., PICO, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **J. Chrom. B.** 799: 293-301, 2004.

VARELLA, I. S., WAGNER, M. B., DARELA, A. C., NUNES, L. M., MULLER, R. W. Prevalência de soropositividade para Toxoplasmose em gestante. **J. Pediatr.** 79 (1): 69-74, 2003.

YAMAMOTO, J. H., VALLOCHI, A. L., SILVEIRA, C., KALIL FILHO, J., NUSSENBLATT, R. B., CUNHA-NETO, E., GAZZINELLI, R. T., BELFORT JR, R., RIZZO, L. V. Discrimination between patients with acquired Toxoplasmosis and Congenital Toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. **J. Infect. Dis.** 181:

2018-2022, 2000.

ZAMORANO, C. G., CONTRERAS, M. C., VILLALOBOS, S., SANDOVAL, L., SALINAS, P. Estudio soroepidemiológico de la Toxoplasmosis humana em Osorno, X Región, Chile. **Bol. Chil. Parasitol.** 54 (1-2): 33-36, 1999.

ZASLAVSKY , B.Y., in **Aqueous Two-Phase Partitioning – Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Oxford, ISBN 0-8247-9461-3, 1995.

ZHOU, X. W., BLACKMAN, M. J., HOWELL, S. A., CARRUTHERS, V. B. Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. **Mol. Cell. Prot.** 3.6: 565-575, 2004.

## APÊNDICE A - INDICADORES DE PRODUÇÃO

No desenvolvimento deste trabalho foram gerados os seguintes produtos:

### ARTIGO:

*Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(8): 861-864, December 2004* **861**

### Lacrimal Secretary IgA in Active Posterior Uveitis Induced by *Toxoplasma gondii*

Maria Isabel Lynch\*, Francisco Cordeiro, Silvana Ferreira\*/\*\*, Ricardo Ximenes,  
Fernando Orefice\*\*\*, Elizabeth Malagueno\*\*/+

### MONOGRAFIAS DE CONCLUSÃO DE CURSO:

“Avaliação de Imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em soros de indivíduos infectados pelo *Toxoplasma gondii* com a forma ocular.” - **Maria da Conceição Gomes Leitão /2003**

“Importância da Imunoglobulina E (IgE) no diagnóstico sorológico da Toxoplasmose – Revisão bibliográfica.” - **Lillyane Karla Bezerra de Oliveira / 2005**

### PRÊMIO: MENÇÃO HONROSA PELO MÉRITO CIENTÍFICO:

VIANA, D. A. OU VIANA-MARQUES, D.A.; FERREIRA, S. ; LIMA FILHO, José Luiz de ; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo ; BARROS NETO, Benício . Purificação de Anticorpos Monoclonais de *Toxoplasma gondii* em Sistema Bifásico Utilizando PEG/Citrato. In: 8º- Jornada de Iniciação Científica-FACEPE, 2004, Recife. Resumos 8º- Jornada de Iniciação Científica-PIBIC/FACEPE, 2004. p. 88-88.

### PARTICIPAÇÃO EM JORNADAS E CONGRESSOS:

“Partitioning and purification of monoclonal antibody of *Toxoplasma gondii* in PEG / Potassium Phosphate aqueous two-phase system” - **XXX reunião Anual da SBBq / 2001- Caxambu – MG**

“Partição e purificação de anticorpo monoclonal de *Toxoplasma gondii* em Sistema bifásico aquoso” - **5ª Jornada de Iniciação Científica – PIBIC/ FACEP/ CNPq – 2001**

### PALESTRA:

“Diagnóstico da Toxoplasmose” – SILVANA FERREIRA

**Oficina Multidisciplinar de Toxoplasmose realizada em Recife, no dia 07/02/2004.  
Promovida pelo Departamento de Cirurgia - Disciplina de Oftalmologia da UFPE**

**PROJETOS APROVADOS:**

*Purificação de anticorpo monoclonal de Toxoplasma gondii por sistemas de duas fases aquosas*

**Descrição:** O projeto visa a purificação de anticorpo monoclonal contra *Toxoplasma gondii* visando a preparação de Kit Diagnóstico..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (1) /

Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (1) .

**Integrantes:** Ana Lucia Figueiredo Porto - Coordenador / J.L. Lima-Filho - Integrante / **Silvana Ferreira - Integrante** / Daniela de Araújo Viana - Integrante / Adalberto Pessoa Junior - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - Auxílio financeiro.

Número de produções C, T & A: 2

**ANEXO A - Carta de aceite e Instruções aos autores do Journal of Chromatography B**

-----Mensagem original-----

De: Charles Haynes [mailto:israels@mail.chem.ubc.ca]  
Enviada em: terça-feira, 21 de janeiro de 2003 13:22  
Para: jose\_luiz60@uol.com.br  
Assunto: BPP2003 Conference

This is to confirm that your abstract

Ref. No.: BPP20003 ? 008

Jose Luiz zeluiz@lika.ufpe.br or jose\_luiz60@uol.com.br

MONOCLONAL ANTIBODY EXTRACTION OF TOXOPLASMA GONDII IN  
PEG/POTASSIUM PHOSPHATE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

Ferreira, S.,2; Albuquerque, B. F.; Kobayashi, M.;Vila Nova,  
S. P7, Malagueno, E., Porto, A.L.F.,5 and Lima Filho, J.  
L.,6

1. Lab. de Immunopatologia Keizo  
Asami-Lika/UFPE;2.Universidade de Pernambuco-ICB;  
3.Doutorado de Ciências Biológicas/UFPE; 4.Dep. de  
Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE; 6.Dep. de  
Bioquímica/UFPE; 7 ? DQF/UFPE

has been received and is currently being considered for an  
oral presentation at the up-coming Biopartitioning and  
Purification 2003 Conference to be held June 22-27, 2003 in  
Vancouver, British Columbia, Canada.

Final decisions on the technical program of the conference  
will be made in late February, after which time you will be  
notified concerning acceptance of your submission.

I look forward to seeing you in June.

Sincerely,

Charles A. Haynes  
Conference Co-chair

Visit also our website:

<http://www.elsevier.com/locate/chrom>

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

**JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A**  
INCLUDING ELECTROPHORESIS, MASS SPECTROMETRY  
AND OTHER SEPARABLE AND DETECTION METHODS  
(incl. SYMPOSIUM VOLUMES)

**JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B**  
ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE  
BIOLOGICAL AND LIFE SCIENCES

Editorial Office *Journal of Chromatography A and B*  
P.O. Box 601, 1000 AB Amsterdam, The Netherlands  
Molenveld 1, 1014 AD Amsterdam, The Netherlands  
Tel.: +31-20-4852394  
Fax: +31-20-4852394  
e-mail: [chrom-@elsevier.nl](mailto:chrom-@elsevier.nl)



Amsterdam - London - New York - Oxford - Paris - Shannon - Tokyo

306

## JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### • Scope

*Journal of Chromatography A* including electrophoresis, mass spectrometry and other separation and detection methods

The *Journal of Chromatography A* publishes papers on all aspects of separation science including chromatography, electrophoresis, hybridized and other multi-dimensional techniques, sample preparation as well as detection methods such as mass spectrometry. Contributions consist mainly of research papers dealing with chromatographic and electrophoretic theory, instrumental developments and their analytical and preparative applications.

*Journal of Chromatography B*

analytical technologies in the biomedical and life sciences

The *Journal of Chromatography B* addresses developments in and applications of separation science related to drugs and other pharmacologically active compounds, and to research in biomedical sciences. The areas considered include: clinical diagnosis or monitoring during medical treatment; screening and profiling of body fluids or tissues related to the analysis of active substances and to metabolic disorders; drug level monitoring; pharmacokinetics; pharmacokinetics and pharmacogenetics studies; analysis of toxicants in biological and food matrices; pharmaceutical analysis; forensic medicine; veterinary medicine; computerized medicine. Techniques covered include the various facets of chromatography, electrochromatography, electrophoresis and related methods, as well as hybridized techniques, applied mass spectrometry and immuno-affinity separation techniques.

### • Type of contributions

The following types of papers are published in the *Journal of Chromatography A* and *Journal of Chromatography B*: Regular research papers (full-length papers), Review articles, Short Communications, Discussions, Technical Notes and Letters to the Editor. Review articles are invited or proposed in writing to the Editors, who welcome suggestions for subjects. An outline of the proposed Review should first be forwarded to the Editors for preliminary discussion prior to preparation. Short Communications are usually descriptions of short investigations, or they can report minor technical improvements of previously published procedures that reflect the same quality of research as full-length papers, but should preferably not exceed five printed pages. Discussions (one or two papers) should explain, amplify, correct or otherwise comment substantively upon an article recently published in the journal. Submission of an article is understood to imply that the article is original and unpublished and is not being submitted for publication elsewhere. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

### • Submission of papers

Manuscripts in English (four copies, together with a set of reproducible figures) should be submitted to:

Editorial Office  
*Journal of Chromatography A or B*  
P.O. Box 601  
1000 AB Amsterdam, The Netherlands

Manuscripts for the SYMPOSIUM issues (three copies are required) should be submitted during the symposium concerned. After the symposium, correspondence should be sent by regular air mail (NOT by registered, special delivery or private mail services) to the Editor handling the corresponding proceedings, i.e., either:

PII: S0021-9673(01)01530-0

307

Dr. E. Heftmann, Editor of *Journal of Chromatography A*, Symposium Volume, P.O. Box 928, Ottawa, CA K4S0-8B1, USA

Dr. Z. Dost, Editor of *Journal of Chromatography A and B*, Symposium Volume, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 14220 Prague 4-Kr, Czech Republic

or

Prof. G. Vigh, Editor of *Journal of Chromatography A*, Symposium Volume, Department of Chemistry, Texas A&M University, MS 3255, College Station, TX 77843-3255, USA

Every paper must be accompanied by a letter from the senior author, stating that he/she is submitting the paper for publication in the *Journal of Chromatography A or B*. In the letter, possible reviewers may be suggested.

Authors may electronically submit articles to the *Journal of Chromatography* from the Journal's web site (<http://www.elsevier.com/locate/chrom>). Full instructions for on-line submission and for the preparation of manuscripts and illustrations are also available from the web site.

### • Manuscripts

Manuscripts should be typed in double spacing on one side of consecutively numbered sheets of paper of uniform size. A 2-cm margin should be left on each side, an easily readable font (12 pt) should be chosen, and (in case of computer-processed manuscripts) a laser-quality printer or equivalent should be used. The manuscript should be preceded by a sheet of manuscript paper carrying the title of the paper and the name, full postal address, FAX number and e-mail address of the author to whom correspondence is to be addressed. As a rule, papers should be divided into sections, headed by captions (e.g. Abstract, Introduction, Experimental, Results, Discussion). All illustrations, photographs, tables, etc. should be on separate sheets. If publications "in press" are cited, on which the new paper is based, copies of these publications should be enclosed. Four copies of the complete manuscript (with illustrations and tables attached to each copy) should be submitted.

### Electronic manuscripts

Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in visible and fast delivery of proofs. For the initial submission of manuscripts for consideration, hard copies are sufficient. Upon revision, your disk and (recently purchased) printed version (printer, hardcopy) should be submitted together to the accepting editor or Editorial Office according to their request. Double density (DD) or high density (HD) diskettes (preferably 3.5 inch) are acceptable. Label the disk with the name of the computer and the wordprocessing package used, your name, and the names of the files on the disk. Further information may be obtained from the Publisher.

### Title

The title of the paper should be concise and informative. Since titles are widely used in information retrieval systems, care should be taken to include the key words. The title should be followed by the authors' full names, academic or professional affiliations, and the address of the laboratory where the work was carried out. If the present address of an author is different from that mentioned, it should be given in the Acknowledgements at the end of the paper.

### Abstract and keywords

All articles should have an Abstract of 50-100 words which clearly and briefly indicates what is new, different and significant. No references should be given. A list of keywords should be added.

### Introduction

Every paper must have a concise introduction that mentions what has been done before on the topic, with appropriate references, and that states clearly what is new in the paper now submitted.

### Experiment

The Experimental section should contain sufficient information for others to repeat the experiments. Whereas general conditions can usually best be specified in the Experimental section, it is often better to give specific details in the figure captions. Appendix 1 lists what should typically be specified.

### Tables and illustrations

Although appropriate tables and illustrations contribute to a clear and concise presentation of results, they should not merely repeat data already given in the text. References to the illustrations and tables should be included in appropriate places in the text by Arabic numerals.

308

Tables should be typed (in double spacing) on separate pages, and numbered in Roman numerals according to their sequence in the text. A brief descriptive heading should be given above each table. Below the heading the experimental conditions should be described. The layout of the tables should be given serious thought, so that the reader can grasp quickly the significance of the results.

Figures should be submitted in a form suitable for reproduction, either drawn in Indian ink on drawing or tracing paper, or as sharp prints [either photographic ( glossy) prints or prints from a high-resolution laser printer]. All uses of graphs and chromatograms should be clearly labeled, with full quantitative data, or equivalent information should be provided in the legend. Please note that any lettering should also be in a form suitable for reproduction. Lettering (which should be kept to a minimum) and spacing on uses of graphs should be such that numbers, etc., remain legible after reduction in size. One reproducible copy and three photocopies are required. The figures should preferably be of such a size that the same degree of reduction can be applied to all of them. The size of the figures should preferably not exceed the size of the text pages. Simple straight-line graphs (such as calibration lines) are not acceptable, because they can readily be described in the text by means of an equation or a sentence. Claims of linearity should be supported by regression data that include slope, intercept, standard deviations of the slope and intercept, standard error and the number of data points; correlation coefficients are optional. Standard symbols should be used in line drawings; the following are available to the typesetters and can also be used in the legends: filled or open squares, triangles, circles or diamonds, + or x.

Photographs should have good contrast and intensity. Sharp, glossy photographs are required to obtain good halftones. References to the illustrations should be included in appropriate places in the text by Arabic numerals and the approximate position of the illustration should be indicated in the margin of the manuscript. Each illustration should have a caption, all captions being typed (with double spacing) together on a separate sheet.

If structures are given in the text, the original drawings should also be provided.

Coloured illustrations are reproduced at the author's expense, the cost being determined by the number of pages and by the number of colors needed.

The written permission of the author and publisher must be obtained for the use of any figure already published. Its source must be indicated in the legend.

For further information regarding artwork, please visit the website: [www.elsevier.com/locate/authorwork](http://www.elsevier.com/locate/authorwork)

### Nomenclature, symbols, abbreviations and units

Widely accepted symbols, abbreviations and units (SI) should be used. If there is any doubt about a particular symbol or abbreviation, the full expansion followed by the abbreviation should be given the first time it appears in the text. Abbreviations used in tables and figures should be explained in the captions. In general, the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) should be followed and attention should be given to the recommendations of the Analytical Chemistry Division in the *Journal of Pure and Applied Chemistry Nomenclature for Chromatography*, *Pure Appl. Chem.*, 65 (1993) 819-872. Decimal points should be indicated by full stops. All decimal numbers smaller than unity should include a leading zero (e.g. 0.1). Company-specific research codes for compounds should not be used, after a full definition of the compound (preferably including each code) in the introduction, it may be further indicated by a bold-face Roman or Arabic numeral.

### References

References should be numbered in the order in which they are cited in the text, and listed in numerical sequence on a separate sheet at the end of the article. The numbers should appear in the text at the appropriate places in square brackets. In the reference list, periodicals [1], monographs [2], multi-author books [3], and proceedings [4] should be cited in accordance with the following examples:

- [1] S. Chellam, M.R. Wiesner, *J. Chromatogr. Sci.* 13 (1995) 83.
- [2] T.R. Holt, *Feeding of Heat Exchangers*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995.
- [3] C.E. Foye, in R.C. Atkin, J.L. Hunt (Eds.), *Analytical Chemistry*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, p. 31.
- [4] A. Vaida, C. Hamilton, D. Haffner, M. Elmore, B. Lauen, E. Hildebrand, B.D. Rogers, M.A. Eisman (Eds.), *Proceedings of the American Chemical Society Symposium on Aqueous Biphasic Separation*, Plenum Publishers, New York, NY, 1995, p. 133.

Abbreviations for the titles of journals should follow the system used by Chemical Abstracts. Articles not yet published should be given as "in press" (journal should be specified), "submitted for publication" (journal should be specified), "in preparation" or "personal communication".

This 1-651 of the *Journal of Chromatography*, *Journal of Chromatography*, *Biomedical Applications* and *Journal of Chromatography*, Symposium Volume should be cited as *J. Chromatogr.*

From Vol. 652 on, *Journal of Chromatography A* (incl. Symposium Volume) should be cited as *J. Chromatogr. A* and *Journal of Chromatography B* as *J. Chromatogr. B*.

• Dispatch

Before dispatch of the manuscript please check that the envelope contains four copies of the paper complete with references, legends and figures, and a file with the electronic version of the manuscript. One of the sets of figures must be the original suitable for direct reproduction. Please also ensure that permission to publish has been obtained from your institution.

• Proofs

One set of proofs will be sent to the author to be carefully checked for printers' errors. Only typewriter's errors may be corrected. No changes in, or addition to, the edited manuscript will be accepted.  
To ensure the fastest possible publication, proofs are sent to authors by air mail and must be returned by fax, courier, or airmail to the Log-In Department (Fax: +353-61-709110; e-mail: editlog@elsevier.ie); office address for courier service: (Journal Name), Elsevier Science Ireland Ltd., Log-In Department, Elsevier House, Brooklands Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. If this is not done, the article will be passed for publication with minor corrections only.

• Reprints

Twenty-five copies of full-length papers, Reviews, Short Communications, Discussions and Technical Notes will be supplied free of charge. Additional reprints can be ordered. The order form containing price quotations will be sent to the authors together with a copyright transfer form upon acceptance of the manuscript.

• Important information

- For information on editorial matters (including submission, reviews and revision of manuscript) please contact: Editorial Office, Journal of Chromatography, P.O. Box 681, 1000 AR Amsterdam, The Netherlands. Tel: (+31-20) 4853794; Fax: (+31-20) 4853268; e-mail: elscie@elsevier.nl

- For specific enquiries on the preparation of electronic artwork, consult http://www.elsevier.com/locate/authorwork/

- For enquiries relating to the status of accepted articles through our Online Article Status Information System (OASIS), author Frequently Asked Questions and any other enquiries relating to Elsevier Science, please consult: http://www.elsevier.com/locate/author

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

- For orders, claims and product enquiries, please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you.

New York: Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10108-0945, USA; phone: (+1) (212) 633 3730 (full time number for North American customers: 1-800-485-3970 (407-6036)); fax: (+1) (212) 633 3693; e-mail: usinfo-elsevier@elsevier.com  
Amsterdam: Elsevier Science, P.O. Box 211, 3000 AE Amsterdam, The Netherlands; phone: (+31) 20 4853795; fax: (+31) 20 4853432; e-mail: elscie@elsevier.nl

Tokyo: Elsevier Science, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; phone: (+81) (3) 5561 5033; fax: (+81) (3) 5561 5067; e-mail: info@elsevier.co.jp

Singapore: Elsevier Science, No. 1 Tanjong Pagar, #17-01 Millenia Tower, Singapore 059192; phone: (+65) 434 3727; fax: (+65) 337 2330; e-mail: asiainfo@elsevier.com.sg

Rio de Janeiro: Elsevier Science, Rua São do Solimões 111/16, Andar, 20050-902 Centro, Rio de Janeiro - RJ, Brazil; phone: (+55) (21) 509 0940; fax: (+55) (21) 507 1991; e-mail: elsciebr@elsevier.com.br [Latin America]: for orders, claims and help desk information, please contact the Regional Sales Office in New York (see listed above).

Appendix 1: Experimental conditions to be specified

Experimental conditions should preferably be given on a separate sheet, headed "Conditions". These conditions will, if appropriate, be printed in a block, directly following the heading "Experimental".

General

Chemicals: Supplier (+ city/town, state, country) and degree of purity of all less common chemicals; EC number of enzymes; optical purity of enantiomers.

Equipment: Model and manufacturer (+ city/town, state, country) of commercial instruments (e.g. chromatographs and detectors). For instruments that are not commercially available, sufficient detail (or a reference) should be given to allow others to construct their own instrument. Detection parameters (e.g. type, wavelength, attenuation, linearity range, limit of detection at a specified signal-to-noise ratio). Sample preparation: Application papers should contain full details (or a reference) of the method of sample preparation. For centrifugation steps, give details of  $g$  value and time. Injection device and volume and concentration of the injected sample should be specified.

Columns: liquid chromatography

Columns: Column dimensions (length  $\times$  internal diameter), manufacturer and location, packing material (for non-commercial columns or columns that are not widely used the chemical composition should be specified), particle diameter, pore diameter, column temperature. Mobile phase: Complete and unambiguous description of the mobile phase composition or procedure for its preparation; pH; flow-rate; gradient programme.  
 $k'$  values: When reporting values, the method for determining the hold-up time ( $t_0$ ) must be described.

Gas chromatography and supercritical fluid chromatography

Columns: In addition to the parameters mentioned for columns liquid chromatography, specify type of column (packed, capillary, etc.) support material, film thickness of the stationary phase, and surface modification, if applicable.  
Carrier gas: Type, purity, flow-rate or inlet pressure (bar or MPa).  
Temperature: All relevant temperatures (or temperature programmes) should be detailed.

Planar chromatography

Chamber: Internal dimensions, manufacturer and location, saturation, temperature, humidity.  
Thin layer or paper: Manufacturer and location, material, dimensions, type (laboratory-prepared or commercially processed) and thickness of layer, additives (fluorescent indicators, binders), position of starting line, development mode, method of activation.  
Solvent: Composition of solvent, upper or lower phase of two-phase solvents, total volume.  
Sample: Application method, size of spot or smear, solvent and amount of solute and volume of solution applied.  
Detection: Spray reagent, wavelength, details of colour,  $R_f$  values.

Electrophoresis

Matrix: For example, cellulose acetate, agarose, polyacrylamide; gel concentration; percentage cross-linker; dimensions and material of tube, sheet, etc.; surface modification, length between column inlet and detector, temperature.  
Buffer: Complete and unambiguous description of buffer used; pH and how the pH was set or adjusted.  
Other: Injection method, voltage, current. In electropherograms, anode and cathode should be indicated.

Mass spectrometry

Ion system: Direct ion-line, off-line, postcolumn splitting, postcolumn buffer or matrix addition.  
Source: Ionization energy, temperature, trap current, reagent gas. For LC interfaces, complete and unambiguous description of the same and their operating parameters (vaporizer and capillary temperatures, buffer, nebulizing, auxiliary or heating gases, gas pressure, source and interface voltages, up-flow CID voltage).  
Mass analyzer: Accelerating voltage, scan mode, collision gas for tandem MS work, collision gas pressure, collision energy, resolution and mass range.  
Detection: Electron multiplier voltage and/or electron gain, ions monitored in SIM and dwell time.

Appendix 2: Conversion table for the non-SI units most frequently used

The use of some non-SI units has been accepted for practical reasons, to this category belong units for time (min, h), volume (l), pressure (1 bar = 10<sup>5</sup> Pa), temperature (°C), energy (1 cal = 100 219-10<sup>-7</sup> J), mass (1 u = 1.66053-10<sup>-27</sup> kg) and activity (1 Ci = 3.7-10<sup>10</sup> Bq). This journal also accepts Å (-0.1 nm). Concentrations should formally be expressed in mol dm<sup>-3</sup> or mol l<sup>-1</sup>, but the symbol *M* is accepted, normally (it should not be used, however). The frequently used "dalton" is not compatible with the SI system — the relative molecular mass (*M<sub>r</sub>*) should be given as a value only (dimensionless). Conventional force must be expressed in g; rpm is not allowed for centrifugation (but *k*, e.g., for vortex mixing). The table below summarizes some conversion factors; to obtain the value in SI units, the value in non-SI units should be multiplied by the factor.

Physical quantity	Type of conversion	Factor
Length	in—cm	2.54
	ft—cm	30.481
Area	in <sup>2</sup> —cm <sup>2</sup>	6.451626
Mass	lb—kg	0.45359237
Volume	gal(US)—l	3.785312
	gal(UK)—l	4.54609
Pressure	atm—Pa	101 325
	mmHg or Torr—Pa	133.322
	mmH <sub>2</sub> O—Pa	9.80665
	kg cm <sup>-2</sup> —Pa	98066.5
	lb in. <sup>-2</sup> or p.s.i.—Pa	6894.76

Other frequently used non-SI "units" are ppm, ppb and ppt. When used in this journal, the American billion (10<sup>9</sup>) and trillion (10<sup>12</sup>) are meant. The use of ppm, ppb and ppt is only permitted if they refer to mass/mass or volume/volume ratios. They should not be used for mass/volume ratios. The first time such a "unit" appears in an article, it should be indicated whether it refers to mass/mass or to volume/volume.

Appendix 3: Abbreviations and symbols that may be used without definition

Abbreviations and symbols should not be used in article titles. Please note that most abbreviations should only be used in combination with a value, or in structural formulae.

Abbreviations	
A, C, G, T	adenine, cytosine, guanine, thymine
Ac, OAc	acetyl, acetate
A/D	analog-to-digital
ADR, AMT, ATB, and similar nucleoside phosphates	adenosine 5'-di-, -trio-, triphosphate, etc.
a.c.	alternating current
amino acids	standard 3- and 5-hetero oxides
AU	absorbance units
BET	Brunauer—Emmett—Teller
b.p.	boiling point
bu	butyl
cpm	counts per minute
CE	capillary electrophoresis
d, m, p, c, t (in nucleosides/nucleotides/nucleic acids)	deoxy, messenger, phosphate, nucleobase/thionucleoside, transfer
d.c.	direct current
DED, DDT, DDE	d, d-dichloro-bis(4-chlorophenyl)ethane, -dibutyl
DEAE	diethylaminoethyl
DNA, DPase	deoxyribonucleic acid, deoxyribonuclease
Dis. (aseyl)	5-dimethylaminopentylamine-1-sulfonyl
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine
dpm	disintegrations per minute
EC	enzyme commission numbering system
EDTA	ethylenediaminetetraacetate, acetic acid
equiv.	equivalent
Et	ethyl
FE	field mode
FLOT	flow-silica open tubular
FT	Fourier transform
GC, GLC, CEC	gas chromatography, gas-liquid chromatography, gas-solid chromatography

HP-	high-performance...
ILD	internal diameter
IGD	immuno-glycobiology G
Im	intramolecular
ip	interperiodal
IR	infrared
IL	internal standard
ILU	international unit
l.v.	intravenous
LC	liquid chromatography
LD	lateral dose
Ma	matrix
m-b	melting point
MS	mass spectrometry
NAD, NADH (NAD <sup>+</sup> , NADPH)	nicotinamide—adenine dinucleotide (phosphate)
NMR	nuclear magnetic resonance
O.D.	outer diameter
PA	phenyl
Pv	propyl
PTEE	poly(tetrafluoroethylene)
RNA, RNase	ribonucleic acid, ribonuclease
RF...	retained-phase...
rpm	revolutions per minute
RSD	relative standard deviation (preferred over coefficient of variation)
SD	standard deviation
TLC	thin-layer chromatography
Tria	trihydroxyethylaminomethane
u	atomic mass units (reference to mass of <sup>12</sup> C; preferred over a.m.u./amu)
u	reference to mass of <sup>16</sup> O
UV	ultraviolet
v.l., v/v	volumes, volumes/volumes
Via	viability
WCOT	wall-coated open tubular
wt, w/w, m/m	mass, mass/mass

Symbols

$A$	peak area or absorbance
$\alpha$	separation factor
$D$	diffusion coefficient
$d_p$	plate thickness
$d_p$	particle diameter
$\rho$	interparticle porosity or molar adsorptivity
$\sigma$	mobile phase flow-rate
$\Delta G^\ddagger$	standard Gibbs free energy change
$\Delta H^\ddagger$	standard enthalpy change
$H$	plate height
$h$	induced plate height
$k'$	capacity constant
$K$	equilibrium constant
$k$	retention factor
$k'$	distribution constant (preferred over partition coefficient)
$l$	length
$A$	wavelength
$M_r$	relative molecular mass
$\mu$	electrophoretic mobility
$N$	number of plates
$n$	number of determinations
$\eta$	viscosity

$P$	pressure or probability
$p$	relative pressure
$p_{-}$	negative logarithm of... (as in $pH$ , $pI$ , $pK_a$ )
$r$	relative retention or correlation coefficient
$R$	molar gas constant
$R_s$	retention factor
$R_{s'}$	$\log(1/R_s - 1)$
$R_m$	mobility
$\rho$	density
$\Delta S^\ddagger$	standard entropy change
$S/N$	signal-to-noise ratio
$T$	temperature
$t$	time
$t_r$	retention time of unretained compound
$t_r^*$ , $t_r^0$	(adjusted) retention time
$u$	mobile phase velocity
$V_r$	retention volume of unretained compound
$V_r^*$ , $V_r^0$	(adjusted) retention volume
$w_b$	peak width at base
$w_h$	peak width at half height

The complete and regularly updated version of the Instructions to Authors can be found on the homepage of the Journal of Chromatography: <http://www.elsevier.com/locate/chrom>

**ANEXO B - Instruções aos autores das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**

[Home](#) | [Current Issues](#) | [Past Issues](#) | [Special Issues](#) | [Future Issues](#) | [Subscription](#) | [Message to Authors](#)  
[Editorial Board](#) | [Editorial Office](#)

## ***Instruções aos Autores***



As *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, devem ser checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às *Memórias* requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos.**

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as *Memórias*. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*:

- Carta de submissão do trabalho, assinada por todos os autores, especificando o autor de contato, bem como endereço, telefone, fax e e-mail.
- Quatro cópias completas do artigo, incluindo as ilustrações e um disquete contendo o texto, tabelas, gráficos e fotografias digitalizadas.
- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.
- A seqüência do artigo deve ser: **título resumido** (com até 40 caracteres - letras e espaços), **título** (com até 250 caracteres), **autores** (sem títulos ou graduação), **afiliação institucional** (endereço completo somente do autor correspondente), **resumo**, **palavras-chave**, **notas de rodapé** indicando a fonte de financiamento ou mudanças de endereço, **introdução**, **material e métodos**, **resultados**, **discussão**, **agradecimentos** (os mínimos necessários), **referências**, **tabelas** (fora do texto e com título), e **figuras** (com legendas em folha separada).
- Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já aceito, deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail ([memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br) / [memorias@ioc.fiocruz.br](mailto:memorias@ioc.fiocruz.br))

