



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ALINE CORREA DE CARVALHO

**ELETORRETINOGRRAFIA MULTIFOCAL: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO  
AVALIATIVO E APLICAÇÃO EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR  
E INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA FUNÇÃO RETINIANA EM PACIENTES COM  
MALÁRIA, INFECTADOS PELO *P. vivax***

**BELÉM – PARÁ  
2014**

ALINE CORREA DE CARVALHO

**ELETORRETINOGRRAFIA MULTIFOCAL: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO  
AVALIATIVO E APLICAÇÃO EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR  
E INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA FUNÇÃO RETINIANA EM PACIENTES COM  
MALÁRIA, INFECTADOS PELO *P. vivax***

Tese de Doutorado apresentado à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Givago da Silva Souza

BELÉM - PARÁ

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ALINE CORREA DE CARVALHO

**ELETORRETINOGRAFIA MULTIFOCAL: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO  
AVALIATIVO E APLICAÇÃO EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR  
E INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DA FUNÇÃO RETINIANA EM PACIENTES COM  
MALÁRIA, INFECTADOS PELO *P. vivax***

Tese de Doutorado apresentada para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Aprovada em: 03 de novembro 2014  
Conceito: Excelente

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura  
*Membro titular* – Instituto Evandro Chagas

---

Prof. Dr. José Luiz Vieira  
*Membro titular* – Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen Renata Matos Oliveira  
*Membro titular* – Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

---

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha  
*Membro titular* – Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliza Maria da Costa Brito Lacerda  
*Membro suplente* – Faculdade de Castanhal

À minha querida mãe Ivonete, pelo apoio,  
companheirismo e amor incondicional que  
me tem dedicado durante esses trinta  
anos;  
À minha doce Marcela, que chegou para  
completar e dar sentido à minha vida;  
Aos meus familiares e amigos que  
sempre estiveram ao meu lado enviando-  
me energias positivas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à DEUS, por me conceder a possibilidade de estar concluindo este trabalho de extrema importância na minha vida profissional e acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira, pela oportunidade que me deu ao me aceitar como aluna, dessa forma dando-me estrutura, orientação e diretrizes imprescindíveis para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Givago da Silva Souza, pelas infinitas orientações, sugestões, conversas e dúvidas tiradas nos momentos tranquilos e mais desesperadores no decorrer deste curso. A você, Givago, meu muito obrigada por tudo, principalmente pela paciência e compreensão que teve comigo.

À equipe do programa de Ensaio Clínicos em Malária, do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob coordenação do Prof. Dr. José Maria de Souza, tendo seus membros participantes do programa médicos representados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura, da Universidade Estadual do Pará (UEPA), que disponibilizou o acesso aos pacientes.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dora Fix Ventura, da Universidade de São Paulo (USP) pela parceria no desenvolvimento e conclusão de vários projetos relacionados.

À Friedrich Alexander University of Erlangen, na Alemanha, representada pelo Prof. Dr. Jan Kremers pelo apoio e suporte técnico.

À todos os componentes da equipe multidisciplinar do Laboratório de Neurologia Tropical, do Núcleo de Medicina Tropical (UFPA), em especial ao Dr. Alexandre Antonio Marques Rosa, doutor em oftalmologia pela Universidade de São Paulo (USP), pelas avaliações oftalmológicas realizadas nos pacientes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), por disponibilizar fomentos necessários ao desenvolvimento do projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical (UFPA).

À Universidade Federal do Pará (UFPA).

“A verdadeira viagem de descobrimento  
não consiste em procurar novas  
paisagens, mas em ter novos olhos”.  
(Marcel Proust)

## RESUMO

A presente tese foi composta por dois estudos desenvolvidos paralelamente. O primeiro objetivo foi o desenvolvimento de um método para classificar as respostas eletrorretinográficas e validar este método em toxoplasmose ocular. O segundo objetivo foi investigar o efeito do uso agudo de cloroquina na retina de paciente com malária (*P. vivax*) que receberam o tratamento estabelecido pelo Ministério da Saúde do Brasil. A ferramenta experimental de ambos os estudos foi o eletrorretinograma multifocal (mfERG). No primeiro estudo, o sistema Veris foi usado para testar 10 sujeitos saudáveis e calcular a razão sinal-ruído com o objetivo de achar os melhores valores para separar respostas normais de respostas retinianas diminuídas. O resultado final desta análise foi aplicado em três pacientes com perda visual devido toxoplasmose ocular. Os resultados mostraram uma razão sinal-ruído ótima de 0,47 para separar formas de onda com e sem sinal. As razões sinal ruído de 0,47, 0,44, 0,48, 0,57, 0,78 e 1,21 foram ótimas para separar respostas normais de respostas progressivamente atenuadas. A aplicação da análise sinal-ruído em pacientes com toxoplasmose ocular foi capaz de mapear a área retiniana sem atividade quando provocada pela luz. O segundo estudo foi desenvolvido usando o mfERG para avaliar 48 pacientes com malária, *P. vivax*, que receberam terapia medicamentosa de cloroquina. Estes dados foram comparados com os dados de 37 sujeitos saudáveis. Os resultados mostraram que o número de infecções variava de 1 a 18 vezes. Durante o tratamento, a dose média de cloroquina ingerida foi  $5429 \pm 782,3$  mg. A estimativa da dose cumulativa normalizada pela massa corporal variou de 14,58 a 545,45 mg/kg. Nenhuma diferença foi observada na amplitude e tempo implícito do mfERG entre os pacientes e os controles em nenhum dos anéis concêntricos do campo visual. Não houve correlação significativa entre a atividade retiniana com a dose cumulativa de cloroquina. Concluiu-se que a análise da razão sinal-ruído desenvolvida nesta tese pode ser usada como um método confiável para estudar a função retiniana diminuída, incluindo o mapeamento das consequências da toxoplasmose ocular; e que o uso agudo da cloroquina para tratamento de malária não causou nenhuma piora da atividade retiniana registrada pelo mfERG.

**Palavras-chave:** Eletrorretinograma multifocal. Análise de razão sinal ruído. Toxoplasmose ocular. Cloroquina. Malária.

## ABSTRACT

The current thesis was composed by two studies performed in parallel. The first purpose was the development of a reliable method to classify the electroretinographic responses and to validate this method in ocular toxoplasmosis. The second purpose was to investigate the effect of the acute use of chloroquine in the retina of vivax malaria patients, which received the standard treatment of the Ministry of Health of Brazil. The experimental tool of both studies was the multifocal electroretinogram (mfERG). In the first study the Veris system was used to test 10 healthy subjects to calculate a signal to noise ratio analysis in order to find the best values to separate normal responses from impaired retinal responses. The final results of this analysis were applied in three patients with visual loss due ocular toxoplasmosis. The results showed an optimal signal to noise ratio of 0.47 to separate waveforms with and without signal. The signal to noise ratio of 0.47, 0.44, 0.48, 0.57, 0.78, 1.21 were optimal to separate normal responses from progressively attenuated responses. The application of the signal to noise ratio analysis into ocular toxoplasmosis patients was able to map the retinal area with no activity evoked by the light. The second study was performed using mfERG to evaluate 48 vivax malaria patients which received chloroquine-based treatment. Their data were compared to 37 healthy subjects. The results showed that number of infections ranged between from 01 to 18 times. During the treatment, the mean dosage of intaken chloroquine was  $5429 \pm 782.3$  mg. The cumulative dosage normalized to the body mass ranged from 14.58 to 545.45 mg/kg. No difference was observed in the mfERG amplitude and implicit time obtained from malaria patients and control group at any concentric rings of the visual field. There was no significant correlation between the retinal activity with the chloroquine cumulative dosage. It was concluded that the signal to noise analysis developed in this thesis can be used as a reliable method to study impaired retinal function, including the mapping of ocular toxoplasmosis consequences; and the acute use of chloroquine for malaria treatment caused no impairments to retinal activity recorded by mfERG.

**Keywords:** Multifocal electrorretinogram. Signal to noise ratio analysis. Ocular toxoplasmosis. Chloroquine. Malaria.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa mundial de distribuição das doenças infecciosas, especificamente das consideradas tropicais.....	16
<b>Figura 2</b>	Ciclo de vida do protozoário <i>T. gondii</i> .....	19
<b>Figura 3</b>	Vista dorsal do globo ocular, destacando suas principais estruturas.....	23
<b>Figura 4</b>	Estrutura da retina de mamíferos, destacando suas camadas e principais tipos celulares.....	24
<b>Figura 5</b>	Lesão corioretiniana inativa causada pelo <i>T. gondii</i> .....	25
<b>Figura 6</b>	Mapa do Brasil destacando áreas de risco para malária baseado no IPA.....	27
<b>Figura 7</b>	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	28
<b>Figura 8</b>	Ciclo de vida do <i>P. vivax</i> e os locais de ação dos diferentes medicamentos antimaláricos.....	30
<b>Figura 9</b>	Branqueamento ocular causado por <i>P. falciparum</i> .....	32
<b>Figura 10</b>	Alteração da cor dos vasos retinianos de uma criança infectada pelo <i>P. falciparum</i> .....	33
<b>Figura 11</b>	Lesões hemorrágicas retinianas em uma criança infectada pelo <i>P. falciparum</i> .....	33
<b>Figura 12</b>	Estrutura química do antimalárico cloroquina.....	35
<b>Figura 13</b>	Maculopatia em olho de boi ( <i>bull's eye</i> ) em usuário crônico de cloroquina.....	41
<b>Figura 14</b>	Físico Erich Sutter e seu <i>paper</i> publicado em 1992.....	42
<b>Figura 15</b>	Conjunto de 103 hexágonos usados na estimulação do mfERG (A) e projeções do estímulo sobre a retina direita e esquerda (B-C).....	43
<b>Figura 16</b>	Distribuição dos cones e bastonetes na retina.....	43
<b>Figura 17</b>	Sequência-m binária determinando a luminância dos hexágonos, o registro contínuo obtido pela estimulação e a sequência derivada da sequência-m.....	44
<b>Figura 18</b>	Registros bioelétricos obtidos da retina (A) e gráfico de densidade de resposta (B).....	45

<b>Figura 19</b>	Onda bifásica (N1-P1-N2) do componente de 1ª ordem.....	46
<b>Figura 20</b>	Registro do mfERG (0 – 200 ms).....	53
<b>Figura 21</b>	Análise implementada para se obter valores ótimos e analisar registros.....	55
<b>Figura 22</b>	Diagrama representando a atenuação artificial sobre o sinal de registros originais.....	56
<b>Figura 23</b>	Estimulação visual do mfERG e análise dos componentes N1, P1 e N2.....	61
<b>Figura 24</b>	Avaliação do registro eletrorretinográfico (mfERG) de um paciente com perda visual causada pela toxoplasmose ocular...	65
<b>Figura 25</b>	Gráfico de densidade de resposta do paciente com perda visual causada pela toxoplasmose ocular.....	66
<b>Figura 26</b>	Registros obtidos através do mfERG do grupo controle e grupo de pacientes com malária infectados pelo <i>P. vivax</i> .....	68
<b>Figura 27</b>	Amplitude e tempo implícito dos componentes N1, P1 e N2 pertencentes aos seis anéis concêntricos do grupo controle e do grupo dos pacientes com malária.....	69
<b>Figura 28</b>	Variação da amplitude do eletrorretinograma multifocal em função da dose cumulativa de cloroquina nos pacientes. R1-R6 representam áreas retinianas mais central para áreas mais periféricas, respectivamente.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>FOK</b>	First order kernels ( <i>Kernels</i> de primeira ordem)
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HR</b>	Hit rate (taxa de acerto)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>ISCEV</b>	International Society of Clinical Electrophysiology of Vision (Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão)
<b>mfERG</b>	Eletrorretinografia multifocal
<b>N.A.</b>	Nível de atenuação
<b>N1</b>	Primeira deflexão negativa
<b>N2</b>	Segunda deflexão negativa
<b>OCT</b>	Optical Coherence Tomography (Tomografia de Coerência Óptica)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P1</b>	Primeiro pico positivo
<b>RMS</b>	Root Mean Square (Raiz Quadrada Média)
<b>ROC</b>	Receiver operating characteristic
<b>SNR</b>	Signal to Noise Ratio (Razão sinal-ruído)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1	PERDAS VISUAIS EM TOXOPLASMOSE.....	17
2.1.1	<b>Toxoplasmose.....</b>	<b>17</b>
2.1.2	<b>Toxoplasmose ocular.....</b>	<b>20</b>
2.2	PERDAS VISUAIS EM MALÁRIA.....	26
2.2.1	<b>Malária.....</b>	<b>26</b>
2.2.2	<b>Malária ocular.....</b>	<b>31</b>
2.3	PERDAS VISUAIS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À CLOROQUINA.....	34
2.3.1	<b>Cloroquina.....</b>	<b>34</b>
2.3.2	<b>Modelos de intoxicação aguda com cloroquina na retina.....</b>	<b>36</b>
2.3.3	<b>Perdas visuais no uso crônico da cloroquina.....</b>	<b>38</b>
2.4	ELETORRETINOGRAMA MULTIFOCAL (mfERG).....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	OBJETIVO GERAL 1.....	48
3.2	OBJETIVO GERAL 2.....	48
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3.3.1	<b>Objetivos específicos 1.....</b>	<b>48</b>
3.3.2	<b>Objetivos específicos 2.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1	MATERIAL E MÉTODOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 1.	50
4.1.1	<b>Obtenção dos registros eletrorretinográficos utilizados para o procedimento de desenvolvimento do método que será utilizado para classificação das respostas eletrofisiológicas.....</b>	<b>50</b>
4.1.2	<b>Cálculo da razão da amplitude RMS (root mean square).....</b>	<b>52</b>
4.1.3	<b>Cálculo da razão da amplitude RMS ótima para discriminar registros normais de registros sem sinal.....</b>	<b>54</b>
4.1.4	<b>Cálculo da razão da amplitude RMS ótima para discriminar registros normais de registros com sinal atenuado.....</b>	<b>54</b>
4.1.5	<b>Testando a confiabilidade da razão da amplitude RMS em</b>	<b>56</b>

	diferenciar registros com diferentes níveis de atenuação.....	
4.1.6	Validação do método em pacientes com toxoplasmose ocular que apresentam diferentes graus de perda visual.....	57
4.2	MATERIAL E MÉTODOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 2.....	57
4.2.1	Sujeitos.....	57
4.2.2	Estimulação visual.....	58
4.2.3	Registros.....	59
4.2.4	Análise dos resultados.....	60
4.2.5	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS.....	62
6.1	RESULTADOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 1.....	62
5.1.1	Valor da razão da amplitude RMS ótima encontrada para discriminar registros normais daqueles registros sem sinal.....	62
5.1.2	Valor da razão da amplitude RMS ótima encontrada para discriminar registros normais daqueles registros com sinal atenuado.....	62
5.1.3	Demonstração da confiabilidade da razão da amplitude RMS em diferenciar registros com diferentes níveis de atenuação.....	63
5.2	RESULTADOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 2.....	67
5.2.1	Dose cumulativa total.....	67
5.2.2	Amplitude e tempo implícito dos componentes N1, P1 e N2 dos seis anéis concêntricos originários do mfERG.....	67
5.2.3	Respostas (mfERG) X Dose cumulativa total.....	67
6	DISCUSSÃO.....	71
6.1	DISCUSSÃO DO OBJETIVO GERAL 1.....	71
6.2	DISCUSSÃO DO OBJETIVO GERAL 2.....	72
7	CONCLUSÕES.....	78
7.1	CONCLUSÕES DO OBJETIVO 1.....	78
7.2	CONCLUSÕES DO OBJETIVO 2.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	APÊNDICES	92
	ANEXOS	101

## 1. INTRODUÇÃO

---

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são um problema de saúde pública em todo o mundo. Na região Amazônica, tem grande relevância devido a quantidade de pessoas acometidas e pelas seqüelas que podem trazer. Um dos sistemas biológicos que quando acometidos leva a diminuição da qualidade de vida do sujeito infectado é o sistema nervoso e dentro das subdivisões deste sistema, encontra-se o sistema visual que é uma importante fonte de informações para o ser humano (ALVES *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2004; ZAJDENWEBER *et al.*, 2005).

A visão é um importante meio de extrair informações do ambiente e tem sido usada como indicador biológico do estado de preservação do sistema nervoso. Em humanos, as áreas visuais ocupam cerca de 40% do córtex, com mais de uma dúzia de áreas visuais já identificadas (GRILL-SPECTOR & MALACH, 2004; TOOTELL *et al.*, 1996), o que denota sua importância. Nas doenças infecciosas o acometimento visual pode ocorrer de várias formas: pela ação direta do parasito, ao entrar na corrente sanguínea, disseminar-se pelo organismo do hospedeiro e localizar-se em órgão alvos, como também através da reação de hipersensibilidade decorrentes da liberação de antígenos pela morte do parasito ou, ainda pela ação de quimioterápicos (TORIBIO *et al.*, 2001).

A toxoplasmose, por exemplo, quando afeta o sistema visual, leva a retinocoroidite que pode culminar na morte de neurônios retinianos e, conseqüente, cegueira (ALVES *et al.*, 2010; GILBERT *et al.*, 2008; GORMLEY *et al.*, 1999; GUEX-CROSIER, 2009). Através da avaliação clínica, a área afetada pode ser delimitada e posteriormente ser calculado o tamanho do dano neural subjacente à infecção. Já no caso da malária (não grave), dificilmente ocorre uma infecção direta em qualquer ponto do sistema visual, entretanto as drogas usadas em seu tratamento são reconhecidamente neurotóxicas, especialmente a cloroquina (ALKADI, 2007; ANTUNES *et al.*, 2005; BERTAGNOLIO *et al.*, 2001). Esta droga quando usada por longo período, apesar da pequena concentração, pode levar a importantes perdas da função visual, como no regime de tratamento de pacientes com doenças reumáticas (LACAVA, 2010; RASTER *et al.*, 2011; VENTURA *et al.*, 2003; XIAOYUN *et al.*, 2010). O regime de tratamento da malária também usa a cloroquina, entretanto, com doses diárias menores que convencionalmente usadas em

pacientes reumáticos e em um período de tempo bem menor. Assim, a investigação da função visual de pacientes com malária pode ser utilizada como um modelo para estudar os efeitos neurotóxicos causados pelo uso agudo da cloroquina. Além do que, em regiões endêmicas como a Amazônia, não é difícil encontrar pacientes que foram infectados diversas vezes e que assim foram submetidos a inúmeras terapias anti-malárica, consecutivamente (BERTAGNOLIO *et al.*, 2001).

É importante ressaltar um estudo de Caetano *et al.* (2011) que demonstraram o reflexo da saúde visual no cotidiano de uma pessoa. Em sua pesquisa realizada numa unidade de emergência oftalmológica do serviço público, a dificuldade de aceitação da perda da visão é a primeira reação dos pacientes que apresentam algum tipo de problema visual. Frequentemente, sentimentos como: vergonha, tristeza, medo, impotência, perda da esperança e restrições, acompanhavam os entrevistados.

A perda de autonomia contribui para diminuição da autoestima, levando-nos a inferir que o comprometimento visual desencadeia um processo de alteração emocional e psicológica. Dessa forma, torna-se necessário identificar e tratar pessoas, em tempo hábil de manter a própria independência (TEMPORINI & KARA-JOSÉ, 2004; CAETANO *et al.*, 2011).

É importante salientar que como algumas doenças infecciosas têm importante efeito direto ou indireto sobre o sistema nervoso visual, faz-se necessário escolher um nível do sistema que possa ser estudado com intuito de compreender os mecanismos básicos destas condições patológicas sobre o sistema nervoso. Neste trabalho foi escolhida a retina por ser uma região de fácil acesso através de diferentes métodos de avaliação visual, sendo que a ferramenta de escolha para ambas as investigações foi o eletrorretinograma multifocal - mfERG (SUTTER & TRAN, 1992). Este método representa a aplicação de tecnologia de ponta para avaliação funcional da retina caracterizada pela apresentação da atividade elétrica de pequenas regiões separadas da retina, a qual permite a avaliação funcional topográfica do tecido retiniano (HOOD, 2000; MARMOR *et al.*, 2009; SUTTER & TRAN, 1992). O mfERG ainda é pouco utilizado no Brasil devido os custos de aquisição e falta de pessoal técnico especializado para a execução e análise dos resultados.

Através deste método foi buscado investigar casos de toxoplasmose ocular com o intuito de mapear funcionalmente a retina desses sujeitos infectados. O

mapeamento funcional da toxoplasmose ocular foi realizado através de um método desenvolvido no Laboratório de Neurologia Tropical (NMT) para determinação de respostas elétricas confiáveis e que foi validada por este projeto.

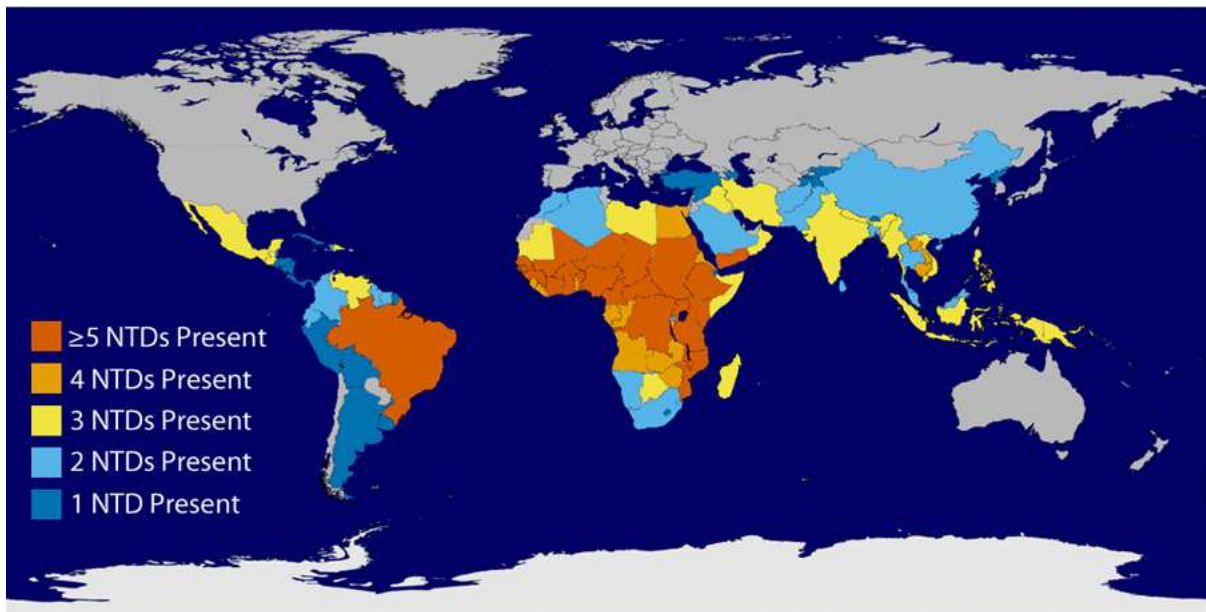
Da mesma forma, o eletrorretinograma multifocal foi utilizado para investigar os impactos funcionais na retina após a exposição aguda à cloroquina em pacientes tratados por terapia antimalárica com esta medicação. Buscou-se confirmar se o padrão de perda visual por intoxicação crônica por cloroquina, no caso de pacientes com doenças reumáticas, seria também observado em pacientes com exposição de curta duração ou de exposição repetitiva.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

---

As doenças infecciosas de veiculação vetorial têm ganhado grande importância no cenário mundial, principalmente em áreas cujo desenvolvimento é favorecido por condições climáticas, sociais e econômicas. Doenças infecciosas são enfermidades causadas por agentes biológicos: protozoários, bactérias, fungos, helmintos (vermes) e vírus, que matam cerca de 543.000 pessoas no mundo a cada ano. Na maioria das vezes, tais doenças têm predileção a proliferarem em áreas de condições climáticas quentes e úmidas (Figura 1), especificamente nas regiões dos trópicos (Câncer e Capricórnio), cujo centro é a Linha do Equador, e subtropicais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO).



**FIGURA 1.** Distribuição mundial das doenças infecciosas, especificamente as consideradas tropicais, segundo a Organização Mundial da Saúde. Áreas delimitadas nas cores: vermelho, laranja, amarelo, azul claro e azul escuro, observa-se a presença de cinco ou mais, quatro, três, duas e uma doença tropical, respectivamente. Disponível em: <[www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/ntd-worldmap-static.html](http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/ntd-worldmap-static.html)>. Acesso em: 18 nov. 2013.

É notável a presença de um espectro muito grande e variado de manifestações clínicas, ficando difícil definir e determinar uma característica comum a todas as doenças infecciosas. No entanto, após intenso e minucioso levantamento bibliográfico foi possível observar que o acometimento ocular/visual está presente na maioria dessas enfermidades, o que torna esse tema de extrema importância para

os pesquisadores (COHEN, 2009; COSTA *et al.*, 1999; GARCIA & CONDE, 1998; KALIAPERUMAL *et al.*, 2005; PRATA *et al.*, 2000; TANDON *et al.*, 1998; TORIBI *et al.*, 2001; VIETH & SALOTTI, 1997).

## 2.1. PERDAS VISUAIS EM TOXOPLASMOSE

### 2.1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma enfermidade que faz parte da lista das cinco doenças infecciosas parasitárias negligenciadas (CDC) que são alvo das principais ações de saúde pública. Apresenta ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial, características observadas através de vários trabalhos publicados que demonstram que mais de 95% de algumas populações já foram infectados com o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Nos Estados Unidos 22,5% da população já foi infectada, enquanto que no Brasil, países da América Central e da Europa continental a prevalência da infecção varia de 50 – 80% dependendo da região geográfica estudada, tendo maior frequência em áreas com clima quente-úmido e baixas altitudes (BONFIOLI & ORÉFICE, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2010; HILL & DUBEY, 2002).

É uma protozoonose causada pelo parasito *T. gondii*, que foi primeiramente descrito por Nicole & Manceaux, em 1909. Protozoário coccídeo, patógeno intracelular obrigatório de várias espécies de mamíferos homeotermos, ou seja, de sangue quente (humanos, gatos, cabras e porco, principalmente), além de aves, que podem atuar como hospedeiros definitivos ou intermediários. Sua característica específica de ser encontrada em várias células, tecidos e líquidos orgânicos, dá a este parasito a habilidade de ser transmitido ao homem por diversas formas (DUBEY, 1991; ESTEBAN-REDONDO *et al.*, 1999).

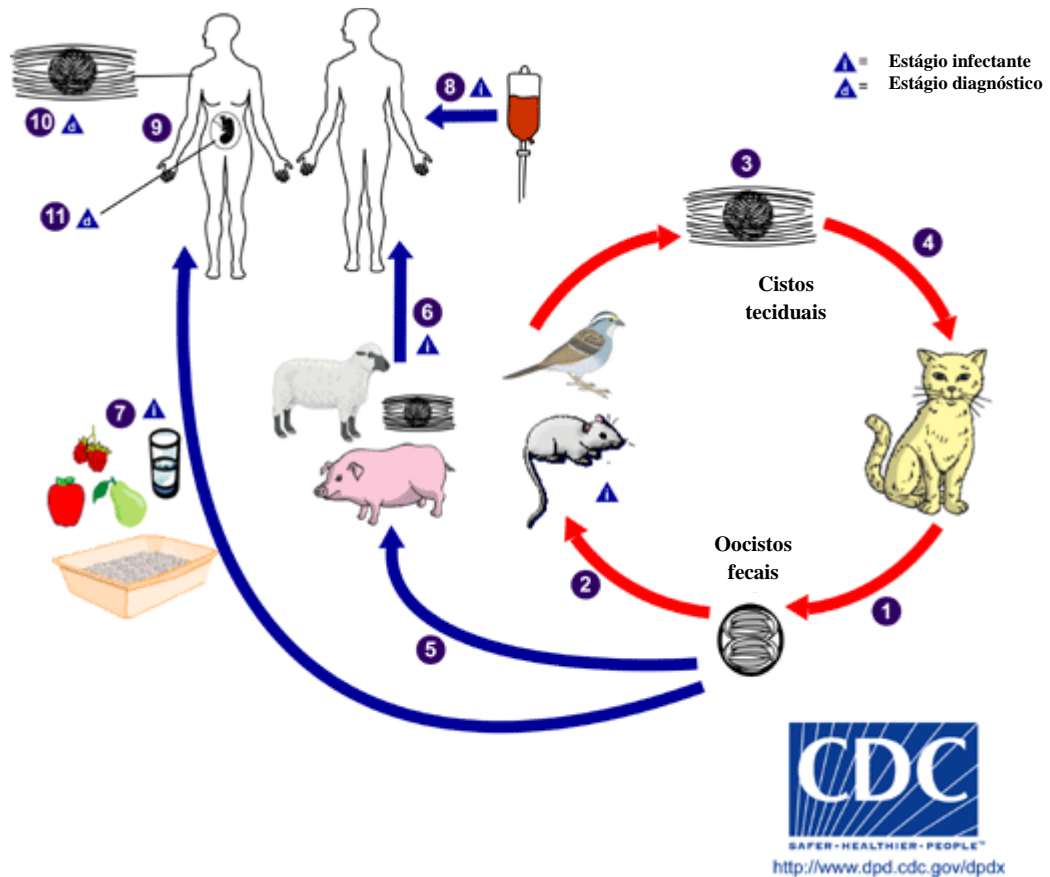
Segundo uma revisão bibliográfica realizada por Hill e Dubey (2002), a infecção pode ocorrer de forma congênita: na qual a mãe infectada desenvolve lesões focais na placenta, resultante da presença de taquizoítos, pode vir a causar uma infecção generalizada ao feto. Como o mesmo ainda não apresenta sistema imunológico completamente desenvolvido, e a resposta imunológica da mãe não consegue atravessar de forma eficiente a barreira placentária, a infecção progride sem controle e de forma devastadora. A taxa global de transmissão da infecção congênita é de aproximadamente 23% (JENUM *et al.*, 1998). O grau de severidade

da toxoplasmose congênita depende do período no qual a mulher foi infectada. As infecções adquiridas durante o primeiro trimestre gestacional são mais graves quando comparado ao segundo e terceiro trimestres, podendo causar ao bebê seqüelas como hidrocefalia, retardo mental, convulsões, calcificação cerebral e retinocoroidite, sendo esta última a mais comum seqüela da toxoplasmose congênita (HILL & DUBEY, 2002; TEDESCO *et al.*, 2007).

Na forma adquirida, o indivíduo pode ser assintomático, ou apresentar lesões localizadas e/ou generalizadas que dependem de fatores como: virulência da cepa do parasito, estado imunológico da pessoa e o modo pelo qual ela se infecta (FERGUSON, 2004). A contaminação se dá pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo a forma cística do parasito; ingestão de oocistos provenientes de alimentos, água e mão contaminados com fezes de gatos. Alguns estudos demonstraram a infecção através da inalação de oocistos esporulados, transfusão sanguínea e transplante de órgãos de um doador infectado, sendo este último uma via rara (HILL & DUBEY, 2002).

O ciclo de vida do *T. gondii* (Figura 2) é do tipo heteroxeno, ou seja, possui um hospedeiro definitivo onde ocorre a fase sexuada, e um hospedeiro intermediário no qual ocorre a fase assexuada do parasito. A fase sexuada, também conhecida como fase enteroepitelial ou ciclo coccidiano, ocorre nas células epiteliais do intestino de gatos jovens não imunes e outros felídeos. Enquanto a fase assexuada ocorre nos linfonodos e tecido de hospedeiros como o homem, outros mamíferos e aves (DUBEY, 1991; DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2003; HILL & DUBEY, 2002).

A toxoplasmose adquirida pode apresentar desde casos benignos ou assintomáticos até casos de morte. A toxoplasmose ocular é a causa mais comum de retinocoroidite em pacientes não imunocomprometidos, sendo responsável por 30% - 50% de todas as uveítes posteriores. Estas lesões estão presentes em cerca de 20% dos pacientes infectados. Já em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do vírus HIV, pacientes com câncer ou que passaram por transplante de órgãos a doença é mais destrutiva, sendo a maior causadora de doenças oculares. (ALVES *et al.*, 2010; CARMO *et al.*, 2005; ZAJDENWEBER *et al.*, 2005).



**FIGURA 2.** Ciclo de vida do agente causador da toxoplasmose, *T. gondii*. O ciclo biológico inicia-se quando gatos jovens e outros membros da família dos Felídeos liberam oocistos esporulados no ambiente junto com as fezes, uma forma altamente resistente e infectante que pode durar viável por até 18 meses em condições favoráveis de umidade e temperatura (1). Hospedeiros intermediários na natureza (incluindo aves e roedores) infectam-se após a ingestão de solo, água ou plantas contaminados com oocistos (2). Os oocistos são rapidamente ativados em taquizoítos logo após a ingestão. Essas formas infectantes multiplicam-se nas células do hospedeiro intermediário, onde algumas formas formam cistos no tecido muscular ou neural. As formas ativas são destruídas pelo sistema imunológico, mas os cistos permanecem (3). Se o animal for caçado e devorado por um felídeo, os cistos liberam os parasitas dentro do intestino, infectando-o. Os esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos, ao penetrarem no epitélio intestinal do gato sofrerão um processo de multiplicação por endodigenia e merogonia (esquizogonia), dando origem a vários merozoítos. Após a esquizogonia do ciclo enteroepitelial vai haver o rompimento desses vacúolos e posterior liberação de merozoítos, que invadirão novas células. Cinco dias depois dessa infecção, inicia-se o processo de reprodução sexuada, em que os merozoítos formados na reprodução assexuada se transformarão em gametócitos ou gamontes. Por um processo de maturação, esses gametócitos irão dar origem aos gametas. Os gametas masculino (microgameta - móveis) e feminino (macrogameta - imóveis), descendentes do mesmo parasita ou de dois diferentes, fundem-se dando origem ao ovo ou zigoto, que após segregar a parede cística dá origem ao oocisto imaturo. O gato sofrerá uma infecção aguda e, então, o oocisto imaturo é expulso com as fezes do animal após nove dias (cada felino doméstico elimina mais de 500 milhões de oocistos em cada defecação) (4). Animais criados para o consumo humano e animais selvagens também podem ser infectados com cistos teciduais após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente (5). Humanos também podem ser infectados por diversas rotas: ingestão de carne mal cozida contendo cistos teciduais (6); consumo de água ou alimentos contaminados com fezes de gato (7); transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (8); transplacentária (9). No hospedeiro humano, os parasitos formam cistos teciduais, frequentemente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos, que podem permanecer durante a vida inteira no hospedeiro (10). O diagnóstico, normalmente é sorológico, no entanto, o cisto pode ser demonstrado no tecido através de biópsia. O diagnóstico da infecção congênita ocorre pela demonstração do DNA parasitário no fluido amniótico através de métodos moleculares, como o PCR (11). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>>. Acesso em: 23 fev. 2014.

### 2.1.2. Toxoplasmose ocular

A síndrome toxoplásmica apresenta sete formas distintas, cada qual com manifestações clínicas específicas. Tais manifestações são frequentemente assintomáticas, ou com sintomas não específicos, que quando não tratadas podem evoluir ao óbito. Dentre essas formas, o envolvimento ocular é uma das manifestações mais comuns da doença, e está associada tanto às infecções congênitas, quanto àquelas adquirida no período extra-uterino. Está relacionada como a principal causa de uveítes posteriores (inflamação primária da coróide), podendo causar desde diminuição da acuidade visual, até a perda completa da visão (DIMANTAS *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2014; GORMLEY *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos, da população infectada pelo *T. gondii* (cerca de 1,25 milhões de pessoas) apresentam manifestações oculares, já em outras partes do mundo, a porcentagem pode chegar a até 15% da população. A retinocoroidite toxoplásmica é mais comum e grave no Brasil quando comparado com a Europa ou América do Norte. Estudos mostram que a prevalência da toxoplasmose ocular no nosso país é muito variada, podendo atingir até 17,7%, na cidade de Erechim (Santa Catarina) tal fato é justificado pela virulência da cepa do parasito nesta região (JONES *et al.*, 2006). Os fatores de risco para desenvolver a toxoplasmose ocular variam de 1,1% - 27,3% dependendo da região e população estudada (GILBERT *et al.*, 2008).

A toxoplasmose ocular ocorre principalmente em indivíduos que foram infectados no período extra-uterino, ou seja, após o nascimento, entretanto, esta forma clínica é mais grave quando adquirida congênita (TEDESCO *et al.*, 2007). No Brasil, registros sugerem que a alta incidência de manifestações oculares é maior na forma congênita, sendo de 2,3% a taxa de transmissão e 3,4% a taxa de infecção aguda em mulheres grávidas (ALEIXO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2014; JONES *et al.*, 2006).

Os fatores de risco para retinocoroidite toxoplásmica, na infecção pós-natal, variam de 2% na região Norte do Brasil a 25% na região Sul do país. Estão relacionados, principalmente, à transmissão através da ingestão de alimentos contaminados e contato com o solo. Jones *et al.* (2006), enfatizaram a importância do cozimento dos alimentos com temperaturas acima de 67° Celsius, e quando do contato com o solo, fazer uso de luvas e a lavagem das mãos com água e sabão abundantemente. Nesse caso, a importância dos fatores de risco são justificadas pelo

acesso heterogêneo às informações e políticas de saúde (ALEIXO *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 1999; GILBERT *et al.*, 2008).

Segundo alguns estudos, as crianças brasileiras com toxoplasmose ocular desenvolvem retinocoroidite toxoplásmica mais precocemente quando comparada à Europa (GILBERT *et al.*, 2008). Apresentam lesões múltiplas, maiores e mais frequentes que tendem a apresentar propensão a afetar o pólo posterior, sendo mais fácil afetar a visão de maneira irreversível. A diferença entre os dados do Brasil e de outros lugares do mundo também pode ser justificado pela virulência da cepa do *T. gondii* (tipo-I) (GILBERT *et al.*, 2008).

Fatores relacionados ao hospedeiro podem causar reativação da toxoplasmose ocular, principalmente quando se encontra em fase de latência, por exemplo, influências hormonais, estresse psicológico, imunidade do hospedeiro e uso de esteróides tópicos. Entretanto, mecanismo de trauma também pode desempenhar este papel. Bosch-Driessen *et al.* (2002), demonstraram em seu estudo que alguns pacientes que passaram por cirurgia de catarata, tiveram reativação da forma ocular. O mecanismo patogênico pelo qual isso acontece ainda não está esclarecido, no entanto, alguns estudos mostraram que a intervenção promove a ruptura de cistos. Há relatos de reativação da toxoplasmose ocular após terapia fotodinâmica para tratamento de neovascularização da coróide, em indivíduos acometidos com degeneração macular relacionada à idade (NÓBREGA & ROSA, 2007).

Em indivíduos imunocomprometidos, a toxoplasmose ocular pode estar associada à outras manifestações da toxoplasmose, ou até mesmo à outras doenças. Manifestações oculares e alterações do sistema nervoso central em pacientes infectados pelo *T. gondii* (neurotoxoplasmose) pode ocorrer mesmo quando os pacientes fazem uso da terapia anti-retroviral (ALVES *et al.*, 2010; ZAJDENWEBER *et al.*, 2005). Já em estudos com sujeitos imunocompetentes, por exemplo, existem associações entre lesões cicatrizadas da retinocoroidite toxoplásmica com: esclerite (KAMATH *et al.*, 2013); retinite pigmentosa (CHHABRA *et al.*, 2007); poliomelite induzido após tratamento com corticóides (HASSENE *et al.*, 2008); e oclusão do ramo da artéria retiniana em um adolescente com títulos altos de IgG positivo (CHIANG *et al.*, 2012).

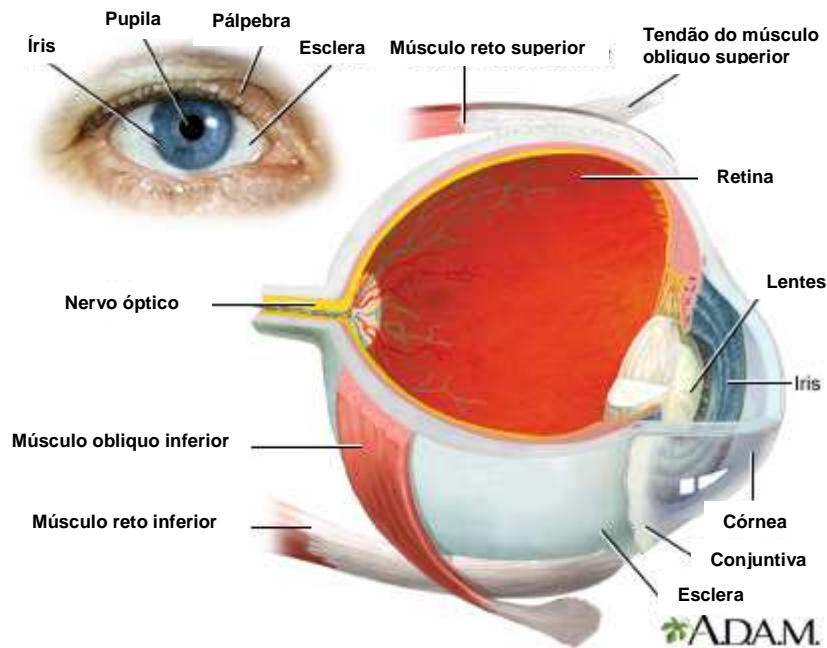
A resposta imunológica na toxoplasmose é bastante estudada. Pesquisas mostram que o organismo infectado por este protozoário tende buscar o controle da

proliferação dos taquizoítos através da ativação da resposta imune inata e participação das células *natural killer* (NK), macrófagos e células polimorfonucleares. Entretanto, no caso da toxoplasmose ocular a resposta imune ainda não está bem esclarecida, pois é um assunto bastante complexo. O que se sabe é que a resposta imune local no globo ocular é suprimida para que não haja destruição tecidual (CORDEIRO *et al.*, 2010; VALLOCHI *et al.*, 2002).

É possível observar cistos e trofozoítos na retina de pessoas infectadas pelo *T. gondii*, que frequentemente, podem causar lesões necróticas, com destruição da arquitetura retiniana que muitas vezes podem envolver a coróide (retinocoroidite). Cepas do *T. gondii* tipo II estão associadas à infecções adquiridas, enquanto que no Brasil, a toxoplasmose ocular está frequentemente associada à cepas tipo I. A resistência em desenvolver lesões oculares está associada à habilidade do hospedeiro em produzir interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) contra o parasito, enquanto que as citocinas interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são fatores que contribuem para a formação de uma resposta adquirida que pode causar dano à coróide e a retina (VALLOCHI *et al.*, 2002).

Através de pesquisas de IgA e IgE contra antígenos *T. gondii* é possível diferenciar infecção congênita da adquirida, sendo estes, marcadores indiretos da toxoplasmose ocular adquirida. As células T também apresentam papel importante na imunidade contra o *T. gondii*, especialmente na toxoplasmose ocular. No caso de retinocoroidite toxoplásmica recorrente, a presença de células T policlonais é considerada específica para tal forma, principalmente na análise do humor vítreo (CARMO *et al.*, 2005; COMMODARO *et al.*, 2010; FERON *et al.*, 2001).

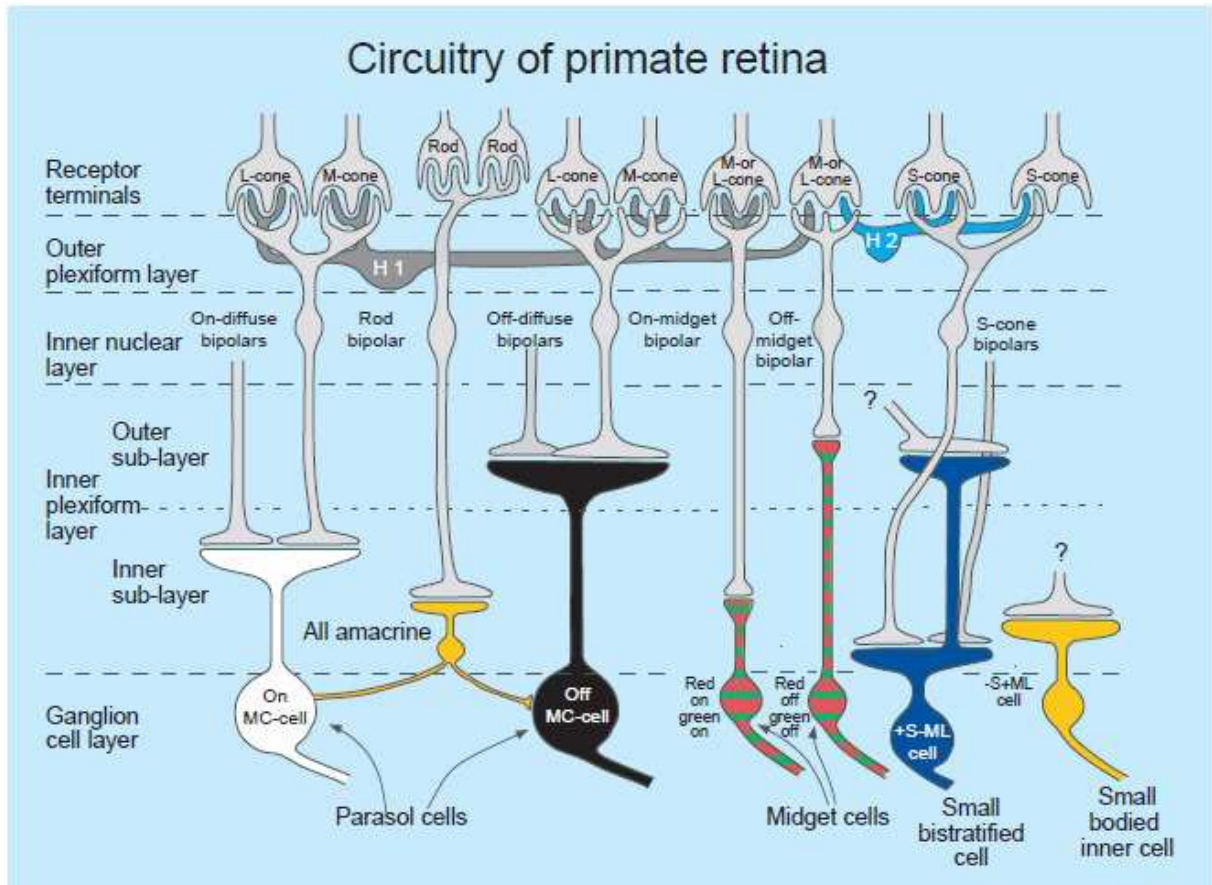
Na toxoplasmose humana, o olho (Figura 3) é o órgão mais afetado quando da ocorrência de toxoplasmose congênita, e a retina é o componente do globo ocular mais frequentemente acometido. O mecanismo pelo qual o protozoário acessa a retina é alvo de muitos estudos. Segundo Furtado *et al.* (2013), o protozoário acessa a retina a partir da circulação sanguínea, na forma de taquizoítos ou parasitando células como os leucócitos. O *T. gondii* movimenta-se através da retina (Figura 4), a partir da camada nuclear externa até camadas mais internas. Essa forma infectante (taquizoíto) também pode invadir e degenerar os segmentos externos dos fotorreceptores. O local mais atingido da retina é a camada celular interna, podendo localizar-se na cabeça do nervo óptico e causar graves danos.



**FIGURA 3.** Vista dorsal do globo ocular humano, destacando suas principais estruturas: íris, pupila, pálpebra, esclera, músculo reto superior, tendão do músculo obliquo superior, lentes, conjuntiva, músculo reto inferior, músculo obliquo inferior e nervo óptico. Adaptado de A.D.A.M. Disponível em: < <http://www.adam.com/> >. Acesso em: 23/03/2014.

A toxoplasmose ocular ativa consiste num foco coagulativo e necrótico localizado na retina. Além disso, pode estar presente uma inflamação difusa da retina e da coróide (HAFIDI & DAOUDI, 2014). Dois tipos de lesões podem ser observados. O primeiro é a retinite aguda, com intensa inflamação de início súbito que desaparece após curto período. Essa patologia é decorrente da liberação de antígenos durante o processo de invasão celular, que leva à destruição da retina, além da presença de hipersensibilidade e inflamação aguda local. O segundo é a retinite crônica, que é progressiva e pode acarretar a perda total da visão, devido à cicatrização e posterior reativação das lesões (Figura 5).





**FIGURA 4.** Estrutura da retina de mamífero. É mostrada sua composição em cinco (5) camadas, de baixo para cima (sentido de exposição à luz): camada de células ganglionares (**ganglion cell layer**); camada plexiforme interna (**inner plexiform layer**); camada nuclear interna (**inner nuclear layer**); camada plexiforme externa (**outer plexiform layer**); camada dos fotorreceptores (**receptor terminals**), e seus principais tipos celulares: células parasol (**parascell**); células anãs (**midget cells**); células biestratificadas pequenas (**small bistratified cell**); corpo celular de células pequenas (**small bodied inner cell**); células amácrinas (**amacrine cells**); células bipolares (**on/off-diffuse bipolars** e **on/off-midget bipolars**) e os fotorreceptores cones (**cone**) e bastonetes (**rod**). Fonte: LEE, 2004.

Os taquizoítos têm predileção por certos tipos celulares da retina, por exemplo, as células ganglionares. A forma como ocorre essa invasão é bem peculiar. O processo de invasão inicia-se com a transposição das monocamadas endoteliais e epiteliais, e da barreira hematorretiniana através do deslizamento suave da forma infectante. Essa motilidade da forma infectante é dependente de uma proteína estrutural, a actina, e tal motilidade é conhecida como “*gliding*”. Em seguida, ocorre a adesão à superfície da célula para posterior penetração e formação do vacúolo parasitóforo. Embora os neurônios da retina resistam à infecção, dessa forma protegendo contra a destruição retiniana, o rápido crescimento do taquizoíto nas células de Müller causam dano significativamente grande à retina humana (FURTADO *et al.*, 2013).

É importante salientar que muitas vezes não somente a presença do parasito propriamente dito pode causar lesões oculares. Muitas vezes, as lesões também são decorrentes de processos inflamatórios autorreativos provenientes da liberação de antígenos. Alterações na camada interna e externa da retina podem ser observadas. Os edemas, por exemplo, é uma dessas alterações, e são caracterizados pelo aumento dos espaços intersticiais formando lacunas entre as células de tais camadas. O parasito pode estar ausente, mas o DNA do parasito pode ser detectado no infiltrado mononuclear na rede dos vasos sanguíneos, e no humor vítreo (TEDESCO *et al.*, 2007).



**FIGURA 5.** Lesão corioretiniana inativa causada pelo *T. gondii*, localizada no olho direito do paciente, com borda hiperpigmentada (seta branca), envolvendo a região macular observada através de exame de fundoscopia. FONTE: HAFIDI & DAOUDI, 2014.

Observações histológicas em embriões de camundongos grávidas contaminadas com cistos teciduais sugerem que a presença de lesões oculares, como infiltrado inflamatório vítreo e perivascular, não são manifestações tardias da toxoplasmose ocular (TEDESCO *et al.*, 2007). Através da análise histológica, Norose *et al.* (2005), detectaram a presença de cistos na camada nuclear interna da retina de camundongos *knockout* IFN- $\gamma$  infectados com *T. gondii*, que causaram vasculite focal dos vasos da retina interna e infiltrado de células mononucleares, dessa maneira, modificando a arquitetura ao redor da retina.

Em humanos, as complicações visuais decorrentes da toxoplasmose ocular podem ser avaliadas de diversas maneiras. Entretanto, médicos oftalmologistas aconselham o uso de técnicas não invasivas, pois não causam tanto desconforto ao paciente. A tomografia de coerência óptica (OCT) pode ser utilizada, pois é

importante para detectar a presença anormal de fluídos sub-retinianos e áreas que caracterizam atrofia retiniana (MONNET *et al.*, 2009). Outra alternativa importante é o eletrorretinograma multifocal, um método não invasivo, válido, confiável e simples utilizado tanto em humanos (CARVALHO *et al.*, 2009) como em animais (NOROSE *et al.*, 2005) para avaliar retinocoroidite toxoplásmica.

## 2.2. PERDAS VISUAIS EM MALÁRIA

### 2.2.1. Malária

O termo “Doenças Tropicais” surgiu em período desconhecido, mas já era citado em meados do século XIX, em registros médicos daquela época. Esta nomenclatura tornou-se sólida à medida que os microorganismos foram identificados como causadores de doença, e seus mecanismos de multiplicação e transmissão esclarecidos (CAMARGO, 2008).

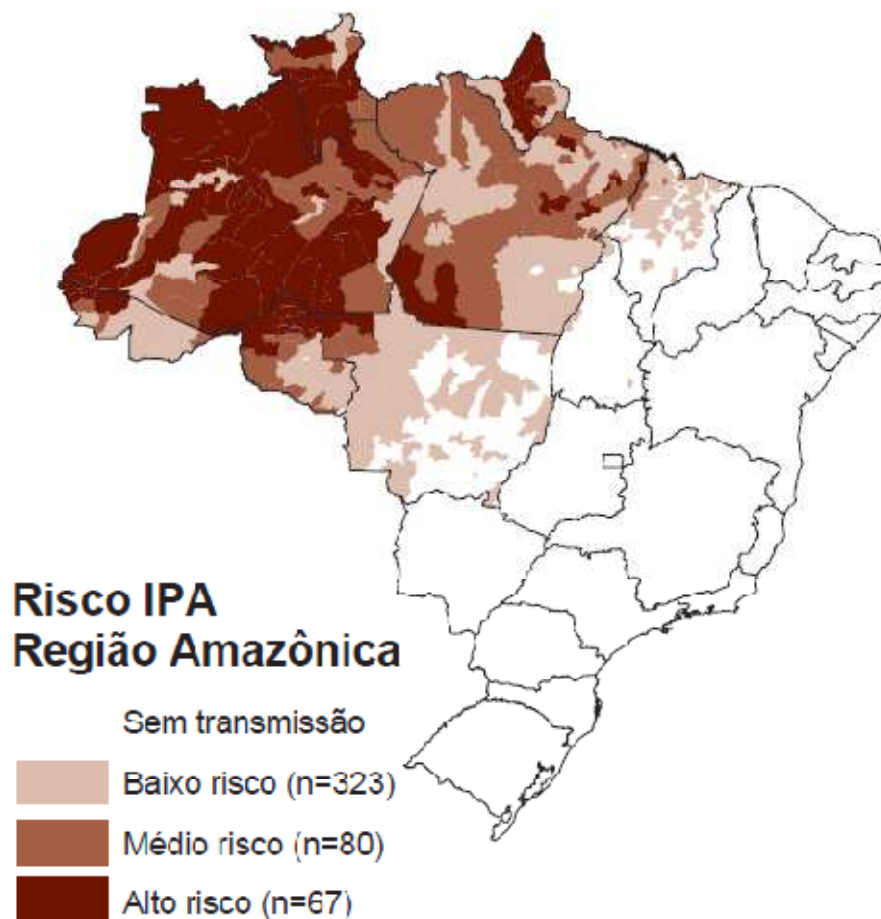
Segundo a OMS, tais doenças estão relacionadas principalmente a fatores socioeconômicos. E por isso, são também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas, uma vez que prevalecem em países pobres e comunidades marginalizadas, que na maioria das vezes não têm condições de implantar uma política efetiva de controle, prevenção e tratamento (CAMARGO, 2008).

A malária é uma doença tropical parasitária sistêmica causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que é transmitida ao homem por vetores invertebrados do gênero *Anopheles* e caracterizada por um quadro clínico onde predomina a tríade febre, calafrio e cefaléia. São cinco as espécies de plasmódios que infectam o homem: *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) (GRASSI E FELLETTI, 1890), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (WELCH, 1897), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) (LAVERAN, 1880), *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*) e *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) (STEPHENS, 1922); sendo o *P. vivax* a forma mais prevalente no Estado do Pará, seguido pelo *P. falciparum* (ALEXANDRE *et al.*, 2010; HALDAR & MOHANDAS, 2009; SABBATANI, FIORINO & MANFREDI, 2010).

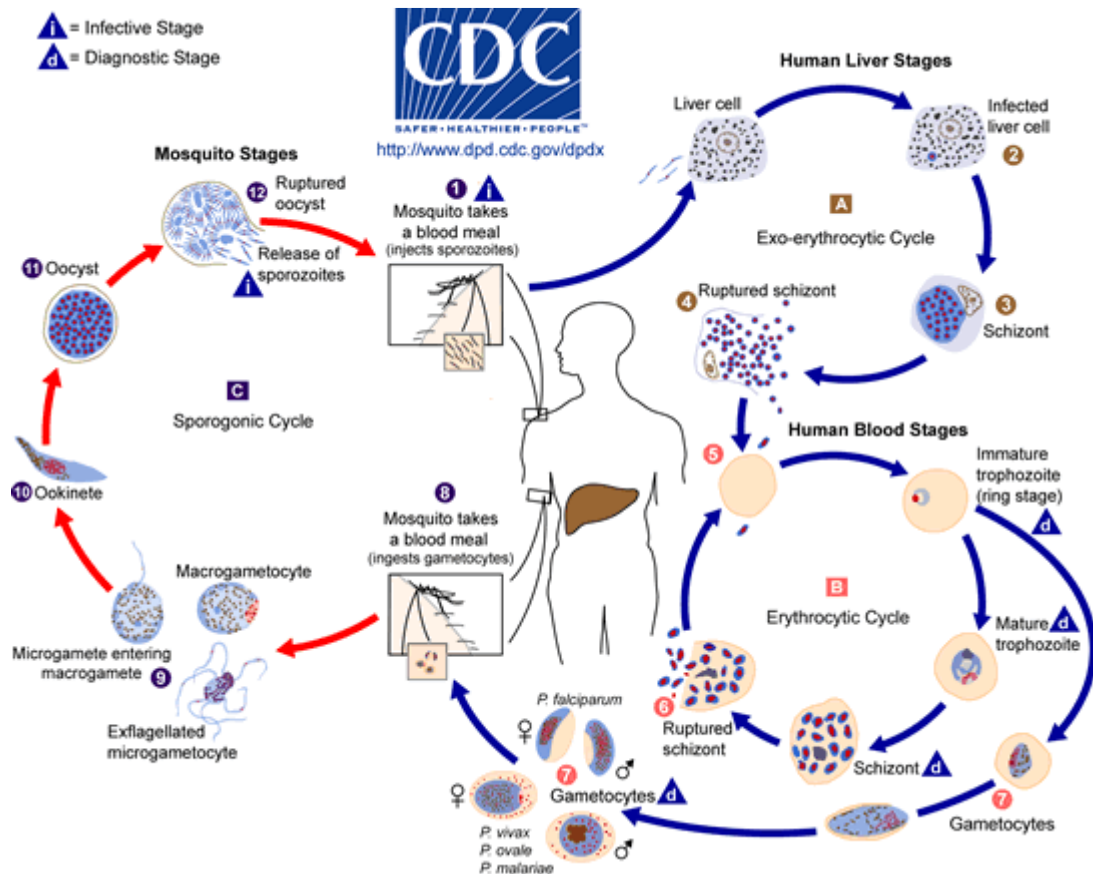
Existem formas graves da malária que podem, em função de uma baixa resistência do hospedeiro ou de uma maior virulência do parasito, evoluir à óbito. Uma delas é a malária cerebral (POSTELS & BIRBECK, 2011). Em áreas de alta endemicidade, gestantes e crianças com menos de cinco anos são mais susceptíveis à malária grave. Nas de baixa endemicidade, qualquer indivíduo

infectado é susceptível a apresentar formas complicadas da doença (BRASIL, 2005). Sendo que a endemicidade da malária, leva em consideração o índice esplênico *versus* áreas de risco (Nº. de lâminas positivas para o plasmódio por 1.000 habitantes). A figura 6 mostra o índice parasitário anual (IPA) no Brasil, em 2010 (BRASIL, 2005).

O ciclo de vida deste protozoário é do tipo heteroxeno (Figura 7), ou seja, ocorre em dois hospedeiros. No hospedeiro vertebrado, o homem, onde ocorre a fase assexuada, e em um hospedeiro invertebrado, a fêmea do mosquito *Anopheles*, onde ocorre a fase sexuada (CDC, 2014; ALEXANDRE *et al.*, 2010; HALDAR & MOHANDAS, 2009; LEÃO, 1997; <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/3616>).



**Figura 6.** Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária baseado nos diferentes níveis de incidência parasitária anual (IPA). FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2010.



**Figura 7.** Ciclo de vida do *Plasmodium*. Durante a picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, no momento do repasto sanguíneo, formas esporozoítas do plasmódio são inoculados no hospedeiro vertebrado (1). Após penetrar no organismo e ganhar o sistema porta, essas formas, cerca de 30 – 60 minutos depois, chegam ao fígado e invadem os hepatócitos, onde evoluem. Uma vez nos hepatócitos, os esporozoítas se diferenciam em trofozoítas pré-eritrocíticos (2), que irão se reproduzir assexuadamente (esquizogonia) e darão origem aos esquizontes teciduais, que evoluirão a milhares de merozoítas (3), caracterizando a primeira fase do ciclo, também conhecido como exo-eritrocítico, pré-eritrocítico ou tecidual (A). Quando da ruptura dos esquizontes e invasão das hemácias pelos merozoítas, dá-se início ao ciclo eritrocítico (4) (B). Após penetrar nos glóbulos vermelhos do sangue, cada merozoíto transforma-se em trofozoíto maduro (forma anelar) e este em esquizonte (5). Essa transformação que ocorre dentro das hemácias se dá por esquizogonia, dando origem aos merozoítas, que se multiplicam por divisão binária, acelerando a destruição e ruptura das hemácias, liberando os novos merozoítas na corrente sanguínea, para em seguida invadirem novos glóbulos vermelhos, reiniciando o ciclo (6). Depois de certo tempo, após algumas gerações de merozoítas sanguíneos, um número considerável de formas se diferencia em gametócitos (7), estágios sexuais, que não mais se dividem e seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor. Os gametócitos, masculino (microgametas) e feminino (macrogametas), são ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo (8). Essa fase de multiplicação do parasito é conhecida como ciclo esporogônico (C). Após a ingestão dos gametócitos masculino e feminino, no estômago do mosquito, vai haver a penetração do microgameta no macrogameta, e posterior formação do zigoto (9). Os zigotos, por sua vez, ganharão uma forma alongada e motilidade (ocinetos) (10) que irão invadir a parede onde se desenvolverão em oocisto (11). Os oocistos crescerão de tal forma a causa sua ruptura e liberação dos esporozoítas (12), que ganharão o caminho das glândulas salivares do mosquito. A inoculação de esporozoítas (1) em um novo hospedeiro dará início a um novo ciclo. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> >. Acesso em 13/11/2013.

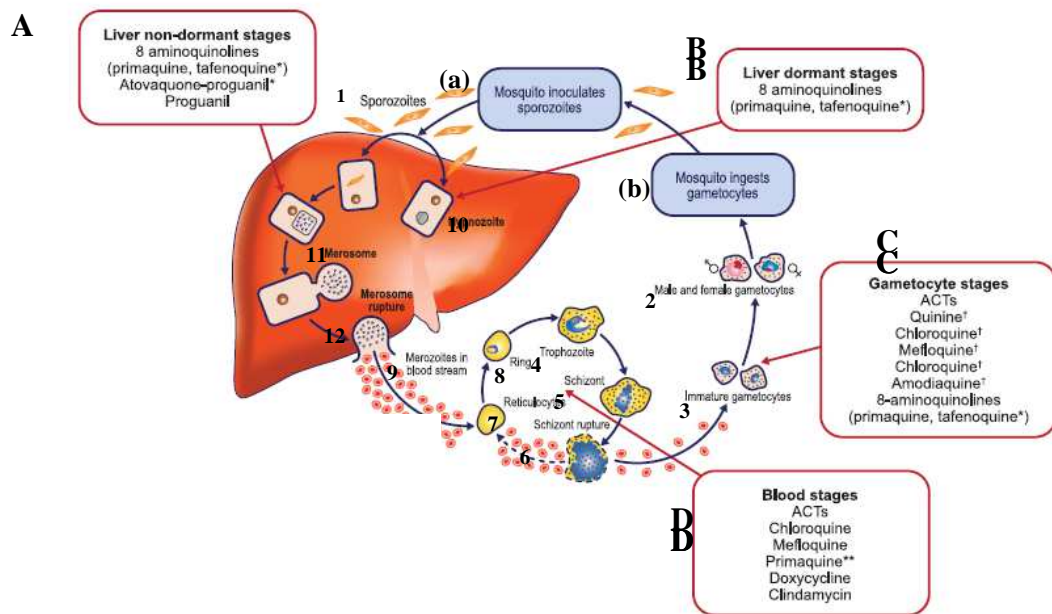


O diagnóstico da malária é realizado através da demonstração do parasito em amostras de sangue total, pelo método da gota espessa, onde através da coloração com o azul de metileno e Giemsa é possível visualizar a morfologia e o estágio de desenvolvimento do parasito, dessa forma possibilitando a diferenciação específica. E pelo método do esfregaço delgado, que apesar de possuir baixa sensibilidade, apresenta facilidade e segurança, pois permite diferenciar especificamente os parasitos, a partir da análise da sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado. Também é feito o diagnóstico pela pesquisa de antígenos no sangue periférico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 1998; 2005).

O tratamento da malária é realizado levando-se em consideração a faixa etária do paciente ou ajustada ao peso do paciente (primaquina), cujo objetivo é garantir a eficácia e a baixa toxicidade. O tratamento é orientado e disponibilizado gratuitamente em todas as unidades do Sistema Único de Saúde (SUS), em todo território nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2010).

Várias medicações são utilizadas para o tratamento da malária, no entanto, ressalta-se a importância da especificidade de cada uma, haja vista, que podem agir em vários pontos chave, dependendo do ciclo evolutivo (Figura 8). Os três pontos principais são: primeiro, interromper a processo de esquizogonia sanguínea, etapa responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença; segundo, destruição dos hipnozoítos, que são as formas latentes do parasito, formados durante o ciclo tecidual; e finalmente o terceiro ponto, interromper a transmissão do parasito, através do uso de drogas que impeçam o desenvolvimento dos gametócitos, formas sexuadas do parasito (BASSAT, 2011; WELLS *et al.*, 2010).

O tratamento precoce e adequado é hoje a base para o controle da doença. Antes do surgimento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, esta droga era utilizada para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. Hoje, além da cloroquina, o *P. falciparum* apresenta resistência a diversos outros antimaláricos, tornando o seu tratamento um dilema para o médico e um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária. Este medicamento tem ação esquizonticida para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2010; MANUAL DE TERAPÊUTICA DA MALÁRIA, 2001).



**Figura 8.** Ciclo de vida do *P. vivax* e os locais de ação dos diferentes medicamentos antimaláricos. **A** – Estágios não dormentes no fígado: 8-aminoquinolonas (primaquina, tafenoquina\*), Atovaquona-proguanil\* e proguanil\*. **B** – Estágios dormentes no fígado: 8-aminoquinolonas (primaquina, tafenoquina\*). **C** – Estágios de gametócitos: ACT's, quinina, cloroquina, mefloquina, amodiaquina, 8-aminoquinolonas (primaquina, tafenoquina). **D** – Estágios sanguíneos: ACT'S, cloroquina, mefloquina, primaquina, doxiciclina, clindamicina. \* Não disponível comercialmente. \*\* Atividade limitada como monoterapia (terapia combinada com outras medicações). Fonte: Adaptado de BASSAT *et al.*, 2011.

O esquema curto de tratamento recomendado para malária não complicada, para adultos e crianças, é mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Esquema de tratamento das infecções pelo *P. vivax* ou *P. ovale* com cloroquina (150 mg) em 3 dias e primaquina (5 mg e 15 mg, infantil e adulto, respectivamente).

Idade/Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º - 7º dias
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6 – 11 meses							
5 – 9 Kg	½	1	¼	1	¼	1	½
1 – 3 anos							
10 – 14 Kg	1	2	½	1	½	1	1
4 – 8 anos							
15 – 24 Kg	1	2	1	2	1	2	2
Idade/Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9 – 11 anos							
25 – 34 Kg	2	1	2	1	2	1	1
12 – 14 anos							
35 – 49 Kg	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15 anos							
≥ 50 Kg	4	2	3	2	3	2	2

FONTE: Manual de terapêutica da malária. Ministério da Saúde, 2001.

### 2.2.2. Malária ocular

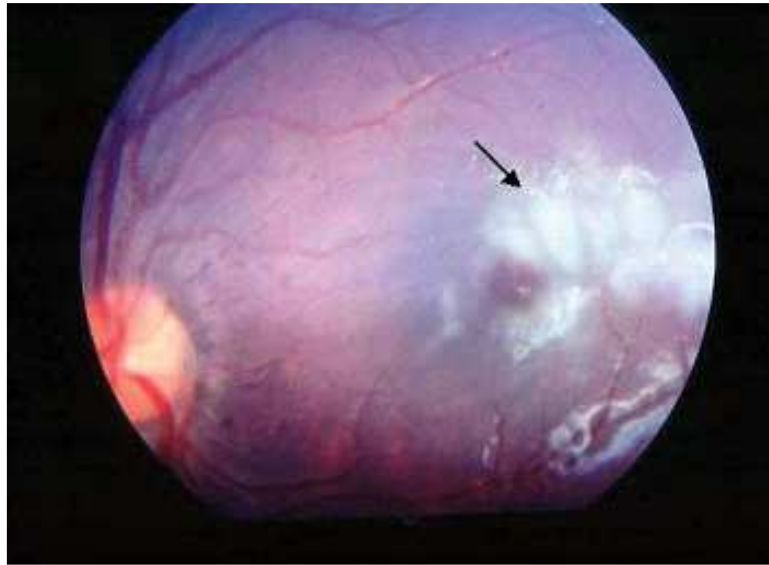
As alterações visuais no transcorrer de infecções maláricas não estão ausentes, e são, em raros casos, amaurose malárica, paralisia do nervo motor, nevralgia do trigêmeo com repercussões oftálmicas e cegueira cortical, até alterações mais freqüentes como: branqueamento retiniano, exsudatos algodinosos, edema de papila e hemorragias retinianas, sendo estas últimas consideradas um sinal freqüente de infecção por *P. falciparum*, principalmente em áreas de alta endemicidade (MACCORMICK *et al.*, 2014; BEARE *et al.*, 2011).

Também chamada de retinopatia malárica ou malária ocular, essas alterações visuais, variam de acordo com a espécie do plasmódio envolvido na infecção, e dessa forma, o tipo de infecção malárica que acomete os pacientes. Estudos mostram que as manifestações retinianas estão presentes, principalmente, em infecções pelo *P. falciparum*, na malária grave (BOIVIN *et al.*, 2011; SAYEED *et al.*, 2011; POSTELS & BIRBECK, 2011), entretanto, não pode-se excluir a presença dessas alterações em infecções por *P. vivax* (LEE *et al.*, 2010).

As primeiras descrições das características da retinopatia malárica foram realizadas por Lewallen *et al.* (1993), em pacientes acometidos pela malária grave em Malawi e consiste de sinais como: opacificação ou branqueamento retiniano, alterações nos vasos retinianos, específicos da malária grave; hemorragias retinianas e papiledemas (BEARE *et al.*, 2004; 2011; ESSUMAN *et al.*, 2010).

A opacificação ou branqueamento retiniano (Figura 9) pode afetar a mácula (branqueamento macular) ou regiões mais periféricas (branqueamento periférico). É uma opacificação desigual da retina, resultante da hipóxia celular, ou seja, baixo teor de oxigênio nas camadas retinianas. Esse quadro ocorre devido o seqüestro intravascular de eritrócitos parasitados pelo plasmódio. O parasito metaboliza o oxigênio e a hemoglobina, causando desoxigenação ou hipóxia, levando à edema intracelular. Pode ocorrer também por liberação de produtos tóxicos produzidos pelo parasito como as glicosilfosfatidilinositol (GPI), aumento da concentração de citocinas como o TNF- $\alpha$ , e outros fatores locais como o óxido nítrico (BEARE *et al.*, 2004; 2006; 2009; 2011; SILVA *et al.*, 2003).





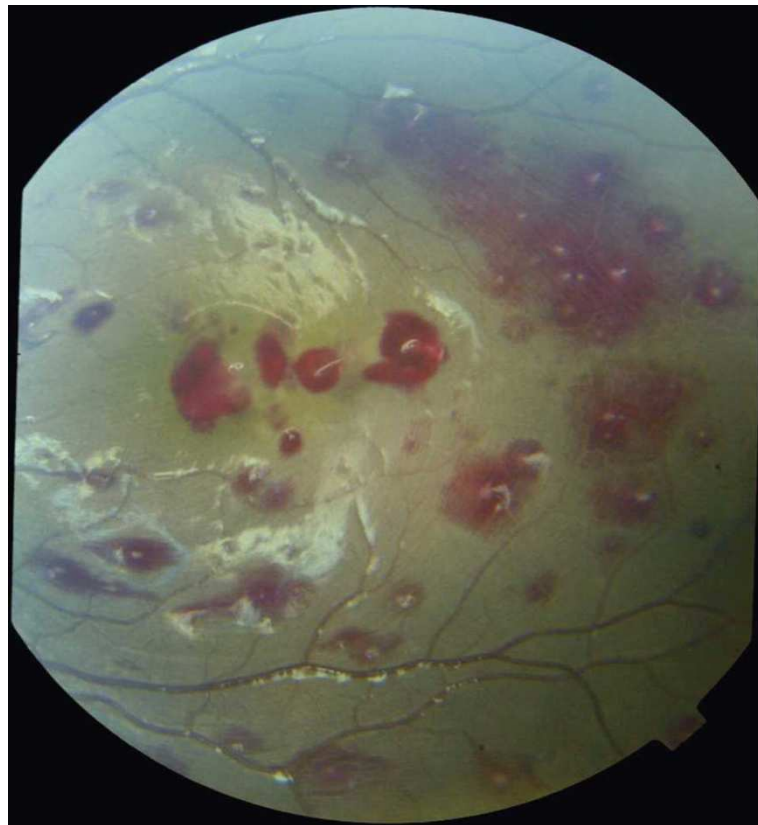
**Figura 9.** Branqueamento ocular (seta preta), causado por hipóxia, em uma criança com infecção malárica por *P. falciparum*, malária grave, observado através de fundoscopia. FONTE: Beare *et al.*, 2004.

A mudança nos vasos sanguíneos da retina (Figura 10) inclui alterações na coloração dos mesmos, para alaranjada ou branca. A patogênese consiste no seqüestro de eritrócitos parasitados com formas adultas do parasito para os microvasos por citoaderência. A hemoglobina que é responsável pela cor vermelha das hemácias é consumida pelo plasmódio, dessa forma, modificando a cor dos vasos devido à pouca quantidade de hemoglobina. Outros dois sinais, menos específicos, que também podem estar presente em outras patologias, são: as hemorragias retinianas (Figura 11), que consistem de lesões hemorrágicas ovaladas e pálidas localizadas na retina, assemelhando-se com as manchas de Roth; e o papiledema, que é o inchaço do disco óptico causado por uma pressão intracraniana aumentada (BEARE *et al.*, 2006; SCHÉMANN, 2002; SILVA *et al.*, 2003).

Segundo a OMS, o diagnóstico da malária cerebral no paciente é realizado baseando-se na presença do *P. falciparum* em amostra de sangue, comprometimento da consciência ou anemia grave. O que caracteriza a síndrome malárica grave são a presença de malária cerebral, anemia grave e dificuldade respiratória ou acidose metabólica. Estudos em pacientes com malária cerebral mostram associação entre edema retiniano extramacular e papiledema, acompanhado de aumento da mortalidade nesses pacientes (BEARE *et al.*, 2004; ESSUMAN *et al.*, 2010; JOSHI *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Alteração da cor dos vasos retinianos (alaranjado ou branco) em uma criança com infecção malárica por *P. falciparum*, malária grave, observado através de fundoscopia. Fonte: BEARE *et al.*, 2004.



**Figura 11.** Presença de lesões hemorrágicas retinianas com forma ovalada, em uma criança com infecção malárica por *P. falciparum*, malária grave, observado através de fundoscopia. Ressaltando que esta alteração não é específica da malária grave, podendo estar presente em outras enfermidades. Fonte: BEARE *et al.*, 2004.

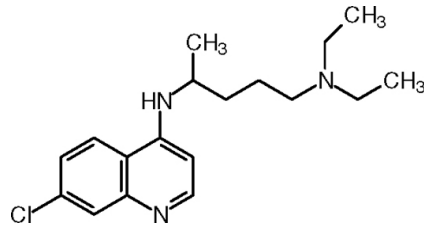
Hoje se sabe, através de vários estudos, que a retinopatia malárica é exclusiva da malária grave, e por isso a detecção de sinais retinianos é um forte candidato para uso como teste diagnóstico definitivo na malária cerebral, principalmente em áreas de alta transmissão, onde há prevalência de parasitemia assintomática. Entretanto, é possível observar na literatura trabalhos que relacionam hemorragias retinianas e infecção pelo *P. vivax* (BEARE *et al.*, 2004, 2006, 2009, 2011; LEWALLEN *et al.*, 2008).

Através do uso de técnicas como a angiografia fluorescente e tomografia de coerência óptica (OCT) de domínio espectral foi descrito o 6º caso de lesões retinianas, especificamente exsudatos algodinosos, associados à infecção pelo *P. vivax*. Esse tipo de alteração ocorre devido a uma desordem no transporte axonal decorrente de uma isquemia localizada na retina, causando problemas na microcirculação (LEE *et al.*, 2010).

## 2.3. PERDAS VISUAIS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO À CLOROQUINA

### 2.3.1. Cloroquina

Este fármaco (Figura 12) foi sintetizada durante a 2ª Guerra Mundial, por Hans Andersag, no laboratório Bayer Farbenindustrie, é derivada da 4-aminoquinolona (ROSENTHAL *et al.*, 2003). Inicialmente foi considerada muito tóxica para ser utilizado em humanos, no entanto, foi reconhecida como uma arma poderosa para tratamento e profilaxia da malária, além de doenças crônicas de autoregressão, como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso discóide ou disseminado, porfiria cutânea, urticária solar, e outras afecções dermatológicas (SILVA & SILVA, 2009). Apresenta-se sob forma de sal solúvel (difosfato de cloroquina), tem massa molecular relativa de 320, nomenclatura 7-Cloro-4-(4-dimetilamino-1-metilbutilamino) quinolina, e fórmula molecular de C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub> (GOUVEIA *et al.*, 2007).



**Figura 12.** Estrutura química do antimalárico cloroquina. Fonte: CUNICO *et al.*, 2008.

A cloroquina é um antimalárico empregado há mais de 300 anos, sendo o único tratamento utilizado até o século XX para terapêutica e profilaxia de todos os tipos de malária, uma vez que, apresenta alta eficácia contra as formas sanguíneas do *Plasmodium*, baixa toxicidade, acompanhada de baixo custo (WHO, 2010).

Os parâmetros farmacocinéticos da cloroquina, medicamento obtido a partir da quinina, apresentam ampla variabilidade individual, no entanto, em geral após a administração oral deste medicamento, sabe-se que ele é rapidamente absorvido pelo intestino delgado, aproximadamente 2-4 horas. Apresenta 74% de biodisponibilidade média e, logo após 30 minutos de sua ingestão, sua concentração plasmática é superior àquela considerada efetiva mínima terapêutica, quando considerada a ingestão em dose única de cerca de 10mg/kg. Além do mais, o equilíbrio dos níveis plasmáticos é encontrado com quatro semanas de uso (MOORE *et al.*, 2011).

Distribui-se amplamente pelo organismo, depositando-se nos eritrócitos, cujos níveis tendem a se elevar quando estão parasitados, e em outros tecidos como o fígado, baço, pele, pulmões, rins, olhos, glândulas adrenais e pituitárias. Quando utilizada por mulheres grávidas atravessam a placenta e estão presentes no leite materno em menos de 1% da dose oral diária administrada (LACAVA, 2010; KARUNAJEEWA *et al.*, 2008).

Segundo Moore *et al.* (2011), as concentrações de cloroquina nos glóbulos vermelhos são aproximadamente três vezes superiores no plasma, havendo também considerável concentração nos leucócitos e plaquetas. As concentrações no sangue total são seis a dez vezes mais altas do que as concentrações plasmáticas. As concentrações no líquido céfalo-raquidiano são baixas, e correspondem a 2,7% das concentrações no sangue total (MOORE *et al.*, 2011).

A cloroquina possui baixa ligação às proteínas plasmáticas, correspondendo à cerca de 60%. No fígado, é parcialmente convertido em metabólitos etilados, através da rápida biotransformação que tem a participação das enzimas do citocromo P450. Este fármaco sofre perdas sucessivas dos grupamentos etílicos terminais de sua estrutura molecular, seguida do outro remanescente, dando origem primeiramente à desetilcloroquina e, em seguida à bisdesetilcloroquina, que são depuradas de forma lenta, com meia-vida de 20 – 60 dias (KARUNAJEEWA *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2001).

A excreção da cloroquina pode ocorrer pelas fezes, de forma inalterada, enquanto que a eliminação renal pode durar em torno de 3 – 6 meses, ou seja, lentamente. Também pode ocorrer excreção por via biliar. Na urina, cerca de 10 – 25% da dose diária administrada pode ser detectada (MOORE *et al.*, 2011). O tempo médio de vida até eliminação terminal (semi-vida da eliminação terminal) da cloroquina é de aproximadamente 1 – 2 meses, especificamente cerca de 50 dias para o sangue total e 32 dias para o plasma (MOORE *et al.*, 2011).

Nos olhos, deposita-se em todos os tecidos com melanina, podendo causar alterações na íris, coróide e principalmente no epitélio pigmentado da retina (EPR). Há relato de achados de traços de cloroquina no plasma, eritrócitos e urina em indivíduos com retinopatia, após cinco anos de interrupção da droga (LACAVA, 2010). Sua meia-vida aumenta proporcionalmente à dose (GOUVEIA *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Modelos de intoxicação aguda com cloroquina na retina**

O uso contínuo da cloroquina pode levar ao desenvolvimento de efeitos adversos, dentre eles a degeneração macular. Entretanto, alguns fatores são determinantes, tais como: dose diária ingerida e dose total ingerida, e o tempo de duração do tratamento. Dependendo do tempo de uso, o tratamento pode ser caracterizado como agudo ou crônico (MARMOR *et al.*, 2011).

A quantidade (dose) de cloroquina prescrita é variável, e depende de qual patologia a mesma foi prescrita. Nas doenças reumáticas, na artrite reumatóide a dose recomendada é de 250 mg/dia (até 6mg/kg/dia), com duração de tratamento variando de 3 meses até 2 anos (MOTA *et al.*, 2012); nas manifestações cutâneas e articulares do lúpus eritematoso sistêmico, recomenda-se o mesmo esquema utilizado para a artrite reumatóide (SATO *et al.*, 2002). Em casos de ocorrência da porfiria cutânea, baixas doses de cloroquina são utilizadas, variando de 125 – 250

mg duas vezes por semana, dependendo da recomendação médica (VIEIRA & MARTINS, 2006). Já nas infecções pelo plasmódio causador da malária, a posologia do tratamento varia conforme a idade e peso do paciente. Em crianças com até 24kg, a dose pode variar de 150 – 400 mg, e pacientes acima deste peso, recebem uma dose que pode variar de 900 – 1500 mg, durante o período de tratamento ao longo do prazo de três (3) dias (BRASIL, 2001, 2010).

Para tentar demonstrar os efeitos do uso da cloroquina no sistema visual, muitos trabalhos já foram publicados (HOBBS *et al.*, 1959; BERTAGNOLIO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2013; EASTERBROOK, 1988; FERRERAS *et al.*, 2007). Todavia, estudos detalhados das consequências do uso agudo deste fármaco são mais difíceis, pois se sabe que as primeiras alterações visuais que ocorrem com o uso agudo da cloroquina não são detectáveis através de técnicas não-invasivas como a fundoscopia, angiografia fluorescente e a eletrorretinografia. Entretanto, estudos demonstram que é possível detectar, através de análises químicas, a quantidade de cloroquina e seus bioprodutos em tecidos com melanina; e com o uso da microscopia eletrônica observar as principais modificações teciduais (ROSENTHAL *et al.*, 1978).

Em pesquisas realizadas em macacos, onde se administrou cloroquina agudamente, foi possível observar, através de análises químicas, o acúmulo deste fármaco em estruturas oculares ricas em melanina, como a coróide, íris, corpo ciliar e epitélio pigmentado da retina. Vale ressaltar a presença da droga nesses tecidos pigmentados por longos períodos, mesmo após a descontinuação do uso da mesma (ROSENTHAL *et al.*, 1978).

Usando a microscopia de luz, estes mesmos autores observaram que as primeiras alterações ocorreram em nível de células ganglionares, com a presença de grandes quantidades de grânulos com coloração escura localizados no citoplasma das mesmas, que também puderam ser observados em outros tipos neuronais. Com o passar do tempo, cerca de seis meses, essa alteração se estendeu para a retina, que passou a apresentar processos e células densamente granulares. E após quatro anos de uso, metade das células ganglionares apresentou aparência densa, compacta, com citoplasma vacuolizado e coloração escura (ROSENTHAL *et al.*, 1978).

A microscopia eletrônica revelou que esses grânulos de coloração escura eram, na verdade, corpos citoplasmáticos membranosos (MCBs – membranous

cytoplasmic bodies), que apresentavam forma de espirais irregulares de membrana que não estavam claramente ligados à membrana e que provavelmente surgiram a partir do retículo endoplasmático. Esses corpos membranosos desapareceram após a descontinuação da droga, e foram substituídos por numerosos pacotes lisossomais pequenos e corpos de inclusão (ROSENTHAL *et al.*, 1978).

Segundo ROSENTHAL *et al* (1978), os fotorreceptores só começam a degenerar após um ano da administração da cloroquina. As primeiras observações visíveis são fragmentos com núcleos picnóticos na camada dos fotorreceptores e escurecimento dos pedículos dos cones. Após quatro anos, observaram fragmentos com núcleos picnóticos mais extensos localizados nos cones e bastonetes. Degeneração dos pedículos dos cones da camada plexiforme externa e perda de fotorreceptores, também foram observados.

### **2.3.3. Perdas visuais no uso crônico da cloroquina**

Os antimaláricos também têm sido utilizados no tratamento de doenças reumáticas há mais de um século. Como o período de uso dessas drogas é longo, seu esquema de tratamento é caracterizado como crônico. As drogas mais importantes e amplamente empregadas são: a cloroquina e a hidroxicloroquina. Apesar de um grande número de efeitos adversos já descritos na literatura, os antimaláricos são considerados drogas relativamente seguras para aplicação em reumatologia (MARMOR *et al.*, 2011).

Segundo Rodrigues *et al.* (2009), as vantagens do uso da cloroquina em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, é a minimização da reativação da doença, melhora no perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos), e diminuição dos eventos trombóticos e cardiovasculares. Dessa forma, reduzindo a mortalidade da população que sofre dessa enfermidade.

Estudos realizados por Rynes (1997) relataram os mecanismos de ação dos antimaláricos, entre eles: a possibilidade de influenciar a produção de auto-anticorpos, diminuição da proliferação de linfócitos, alteração do processamento de antígenos pelos macrófagos e redução da produção de citocinas. Também foi proposto um novo mecanismo de ação dos antimaláricos através da inibição dos receptores “*toll-like*” (TLRs) (KALIA & DUTZ, 2007).

Os efeitos decorrentes do uso crônico da cloroquina é um tema explorado há muito tempo nos grupos de pesquisa. Os principais efeitos adversos incluem

doenças oculares, gastrointestinais, auditivos, dermatológicos, cardiovasculares, hematológicos e neuromusculares (MARMOR *et al.*, 2002 B; MARMOR *et al.*, 2011). Os primeiros relatos de toxicidade ocular surgiram em meados de 1957, com detecção da degeneração do epitélio pigmentar retiniano, que mostrou-se a mais importante doença tóxica do pólo posterior ocular (NETO & MESQUITA, 2009).

Sabe-se que seu uso crônico pode acarretar degeneração retiniana irreversível que tende a evoluir mesmo após suspensão da medicação, tornando-se um grave e sério problema oftalmológico (ARANA *et al.*, 2010; MARMOR *et al.*, 2002 B, 2011). Essas alterações oculares estão relacionadas, principalmente, a dose diária e/ou dose total utilizada no período de tratamento (dose cumulativa) (GOUVEIA *et al.*, 2007; NEBBIOSO *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual esta droga pode acarretar perdas visuais não está bem esclarecido, entretanto, como a cloroquina é uma substância melanotrópica, ela apresenta grande afinidade pelos ligantes dos grânulos da melanina, e por esse motivo pode quebrar a barreira hematorretiniana, inibir os fosfolípidios lisossomais e dessa forma interferir no metabolismo do epitélio pigmentar da retina (GOUVEIA *et al.*, 2007; MADALENA *et al.*, 2012). Secundariamente, pode haver destruição das células da retina pela inibição da síntese de proteínas dos fotorreceptores, cones e bastonetes. A cloroquina pode também acumular-se na íris, coróide e corpo ciliar (NEBBIOSO *et al.*, 2009; MARMOR *et al.*, 2011).

Os fatores de risco para desenvolvimento de maculopatia, segundo a última revisão da Academia Americana de Oftalmologia (MARMOR *et al.*, 2011) são a duração do tratamento e dose cumulativa, dose diária, idade, aumento da taxa de gordura corporal, e presença de doenças hepáticas ou renais, além de outros fatores como idade superior a 60 anos, presença de doença macular ou retiniana prévia, e fatores genéticos. Alguns autores sugerem que indivíduos que apresentam mutações no gene ABCR apresentam aumento da susceptibilidade em desenvolver retinopatia (GOUVEIA *et al.*, 2007; MARMOR *et al.*, 2002 A).

A dose cumulativa é a quantidade total da droga ingerida, baseando-se no período pelo qual a droga foi usada. Neste, o tempo de uso não pode ser superior a cinco (05) anos, com dose total ingerida não ultrapassando 460 g. A dose diária ingerida também foi revisada, sendo a toxicidade associada com doses superiores 250 mg/dia, ou maiores que 3 mg/Kg, levando-se em consideração o peso ideal em indivíduos de baixa estatura. Em pacientes obesos, a maior incidência de retinopatia



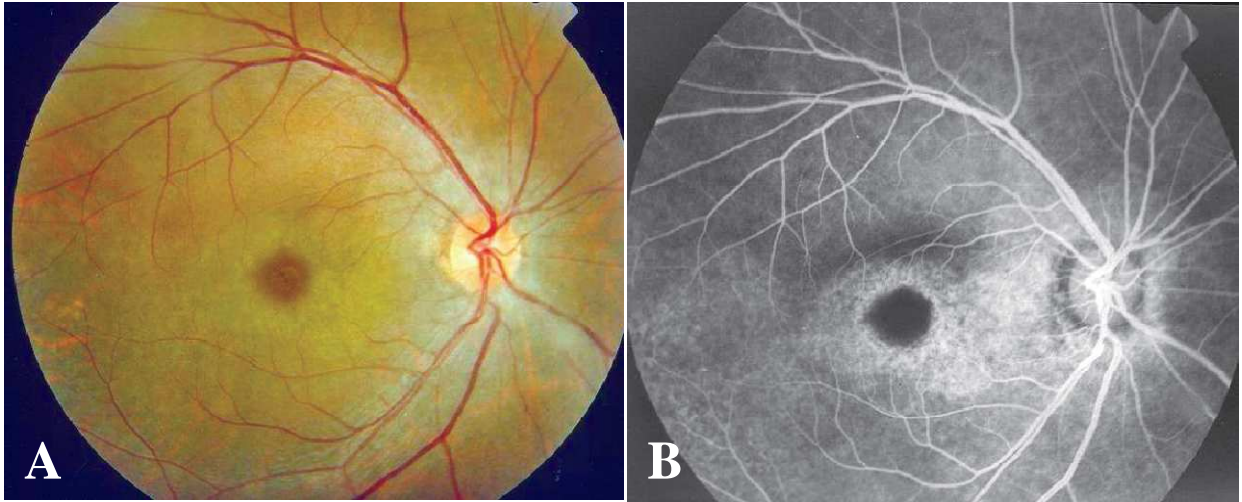
justifica-se pelo fato da cloroquina não ser absorvida pelo tecido adiposo, e por isso se depositar no espaço intracelular (RODRIGUES *et al.*, 2009; MARMOR *et al.*, 2002 A; 2011), causando superdosagem ao paciente.

Nebbioso *et al.* (2009), descrevem em sua revisão bibliográfica as manifestações clínicas associadas ao uso crônico da cloroquina, relatado por diversos autores. Estas alterações podem ser reversíveis, enquanto que outras podem ser irreversíveis, mesmo com o cessamento do fármaco. Dentre as manifestações, cita-se a atrofia e mudanças pigmentares da mácula, maculopatia em olho de boi (*bull's eye*), mudanças tardias na visão central, depressão no campo visual periférico, eventual mudanças na pigmentação periférica da retina, atrofia do nervo óptico, atenuação das vesículas da retina, depósito intracelular de nucleoproteínas e secundariamente mudanças no epitélio da córnea, podendo surgir lesões como a córnea verticilatta, e alterações funcional da visão (dificuldade para ler, fotofobia, visão para longe borrada, escotomas no campo visual central e flashes de luz).

A maculopatia em olho de boi é considerada uma das complicações mais graves, uma vez que é considerada irreversível. Muitos autores já descreveram esse tipo de retinopatia tóxica. Silva e Silva (2009), relata um caso de uma paciente que fez uso de cloroquina por 5 anos, e dose diária de 250 mg/dia. Ao exame oftalmológico apresentou alterações do brilho e reflexo maculares em ambos os olhos e epitélio pigmentar retiniano dentro dos padrões de normalidade.

A fundoscopia revelou bilateralmente, maculopatia com a foveola hiperpigmentada circundada por uma zona anular de hipopigmentação, mesclada com uma fina mobilização pigmentar, configurando o clássico aspecto em olho de boi (Figura 13). Enquanto que o campo visual computadorizado mostrava um denso extenso escotoma anular central (SILVA & SILVA, 2009).

Outro estudo mostrou também a maculopatia em olho de boi, no entanto, essa alteração só foi detectada pelo uso da técnica de angiofluoresceinografia. A paciente deste trabalho apresentou mobilização do epitélio pigmentar retiniano macular, pela aplicação da fundoscopia, enquanto que o campo visual automatizado revelou importante perda difusa da sensibilidade e escotoma central profundo unilateralmente. O tempo de uso e a dose total ingerida eram superiores aos valores preconizados por Marmor *et al.*, 2011 (MARMOR *et al.*, 2011; NETO & MESQUITA, 2009).



**Figura 13.** Maculopatia em olho de boi (*bull's eye*), manifestação retiniana freqüentemente observada em pacientes que fazem uso crônico da cloroquina. Essa maculopatia é caracterizada pela presença de uma área hiperpigmentada (fovéola), circundada por uma zona anular de hipopigmentação. **(A)** Retinografia a cores. **(B)** Angiofluoresceinografia. Fonte: SILVA & SILVA, 2009.

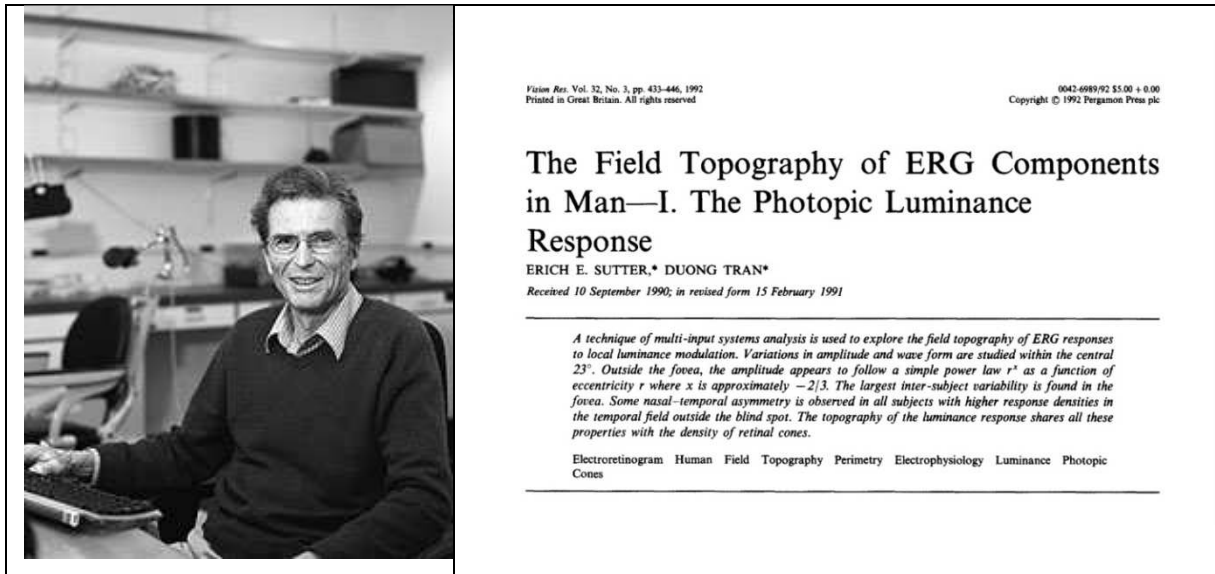
É importante o estabelecimento de um teste que detecte de maneira precoce a toxicidade ocular decorrente do uso crônico, ou até mesmo o uso agudo, da cloroquina, dessa forma minimizar a perda visual e proceder ao correto aconselhamento ao paciente.

#### 2.4. ELETRORETINOGRAFIA MULTIFOCAL (mfERG)

O eletroretinograma multifocal é uma técnica baseada em conceitos eletrofisiológicos, desenvolvida pelo físico Erich Sutter (Figura 14) e Duong Tran, em 1992. Desde então, tornou-se uma importante ferramenta para investigação visual, haja vista que é considerado um método seguro, não invasivo, no qual os registros podem ser realizados em um espaço de tempo relativamente curto (HOOD *et al.*, 2003; MARMOR *et al.*, 2009; SUTTER & TRAN, 1992). O mfERG é uma técnica de potencial em massa que tem por objetivo mapear funcionalmente várias áreas da retina, para posterior construção de mapas topográficos. A construção desses mapas é resultante da soma da atividade elétrica provocada das células da retina (HOOD *et al.*, 2003; SUTTER & TRAN, 1992).

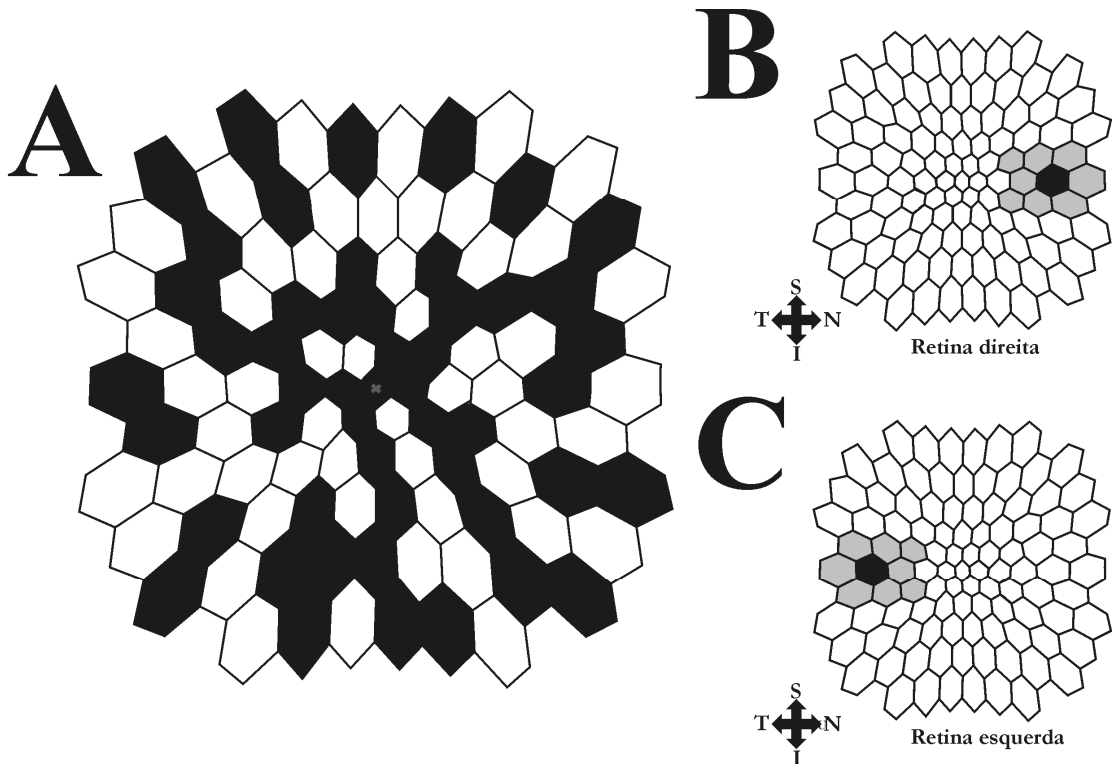
O estímulo usado nesta técnica consiste de vários elementos com formas hexagonais dispostos lado a lado, que cobre até cerca de 60° de diâmetro do campo visual central (Figura 15). Tais hexágonos são escalonados de acordo com a excentricidade, ou seja, aumentam de tamanho conforme e distanciam do centro,

afim de equalizar a resposta através do campo visual. Uma vez que há grande diferença na densidade de neurônios (cones e bastonete) através da retina (Figura 16). O tamanho dos hexágonos é configurado de forma que as respostas correspondentes a cada um sejam semelhantes em amplitude (HOOD, 2000; KEATING *et al.*, 2000; KRETSCHMANN *et al.*, 2000).

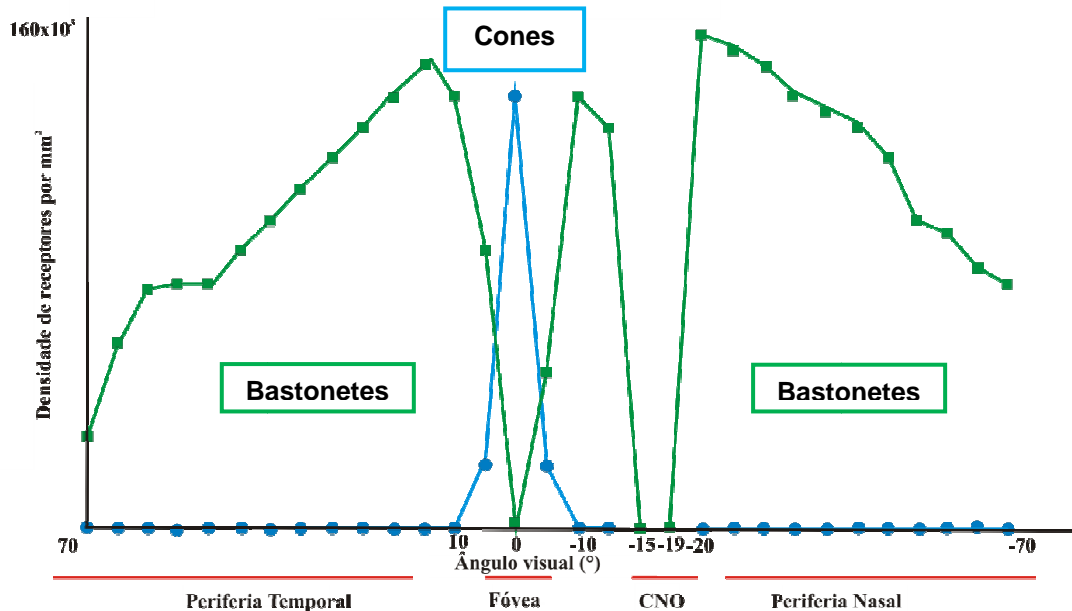


**Figura 14.** Físico Erich E. Sutter (PhD) criador da técnica do eletrorretinograma multifocal, juntamente com Duong Tran, em 1992. Disponível em: < <http://www.ski.org/Vision/Scientists/sutter.html> >. Acesso em 23/03/2014.

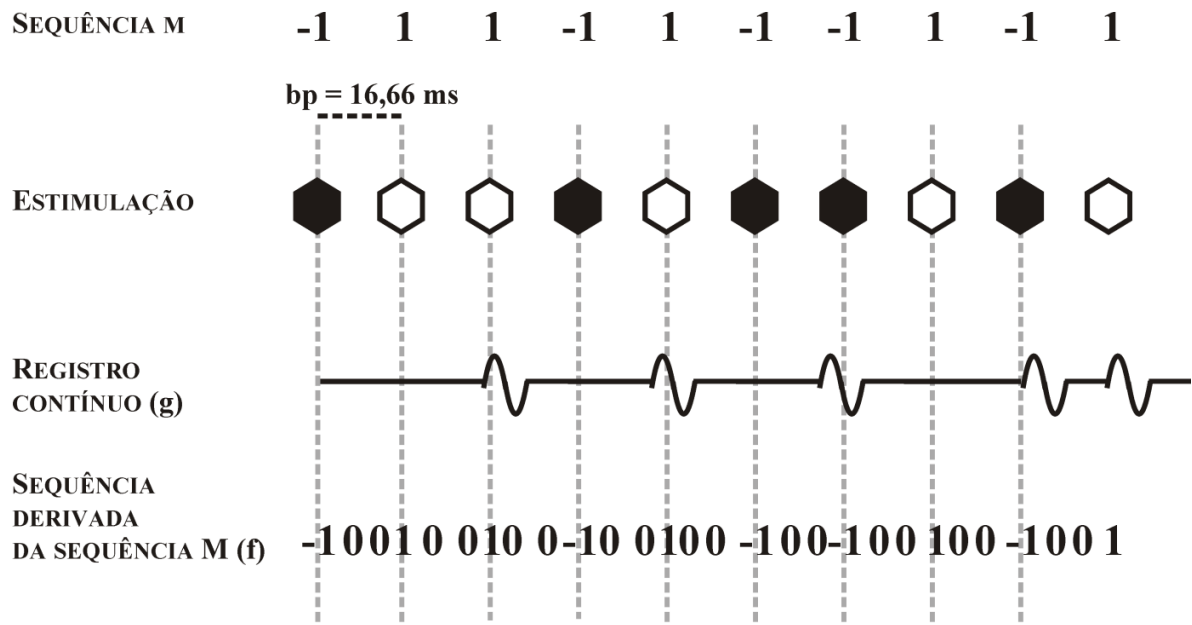
A intensidade luminosa de cada hexágono é modulada independentemente por uma seqüência binária pseudoaleatória, a seqüência-m. Essa seqüência é considerada binária por ser composta de dois valores, +1 e -1, e pseudoaleatória devido seu processo lógico de geração. O número de elementos da seqüência-m é sempre de  $2^n - 1$ , onde  $n$  é um número inteiro e maior que 0. O programa de computador responsável pela estimulação lê a seqüência-m em intervalos constantes de tempo, denominado período base (SUTTER, 2000). Quando a seqüência-m apresenta valor +1, o hexágono do estímulo exibe uma luminância máxima (alta intensidade luminosa) e caso o valor da seqüência-m seja -1, o hexágono exibirá luminância mínima (baixa intensidade luminosa) (Figura 17) (SCHIMITZEK & BACH *et al.*, 2006; HOOD, 2000; YOSHII *et al.*, 2000).



**Figura 15.** (A) Conjunto de 103 elementos hexagonais utilizados como estimulação para obter-se respostas eletrretinográficas. Observar que os hexágonos centrais são menores quando comparados aos mais periféricos. (B-C) Projeções do estímulo sobre a retina direita e esquerda, respectivamente. As áreas em destaque (em tons de cinza) indicam os hexágonos que se projetam sobre a provável localização do disco óptico. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2011.



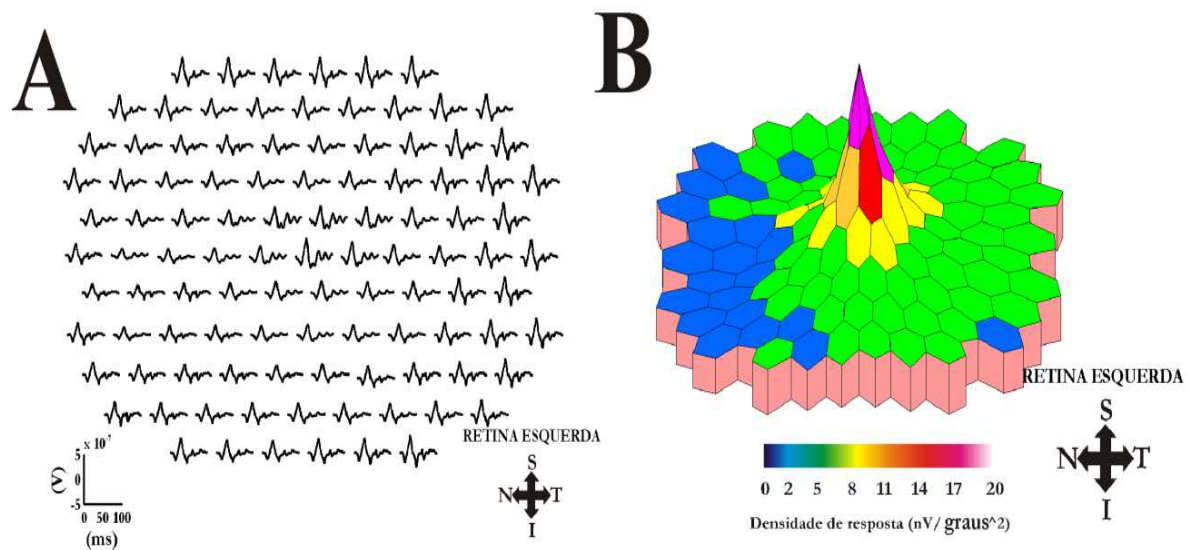
**Figura 16.** Distribuição dos fotorreceptores na retina, o que justifica o escalonamento dos hexágonos do estímulo visual. Os cones apresentam maior densidade na retina central (fóvea) enquanto os bastonetes apresentam maior densidade em excentricidades de aproximadamente 20° desde a fóvea. Na cabeça do nervo óptico (CNO) não há fotorreceptores.



**Figura 17.** Sequência-m binária, ou seja, composta de dois valores +1 e -1, que comanda a intensidade luminosa do estímulo. Quando a seqüência-m apresenta valor +1, o hexágono de estímulo exibe uma luminância máxima, e quando o valor da seqüência-m é -1, o hexágono exibe uma luminância mínima. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2011.

Após a apresentação do estímulo, que pode ser composto de 37, 61, 103 ou 241 hexágonos dependendo do objetivo do pesquisador, um registro eletrorretinográfico contínuo é obtido. Deste único registro contínuo é derivado um conjunto de respostas para cada um dos hexágonos que constituem o estímulo, que podem ser utilizados para confeccionar os mapas topográficos (Figura 18). A essas respostas dá-se o nome de componentes lineares (*kernels*), os quais podem ser de primeira ou segunda ordem (FOK – *First order kernels* ou SOK – *Second order kernels*) (OYAMADA, 2007). Obtém-se a extração dos componentes de primeira ordem através da correlação cruzada entre o registro contínuo e uma seqüência derivada da seqüência-m (SUTTER, 2000). A seqüência derivada da seqüência-m recebe valores + 1 ou -1 no momento da primeira amostragem de cada período base (BP) e zeros em todos os outros pontos (Figura 18) (SUTTER, 2000; SUTTER & TRAN, 1992).

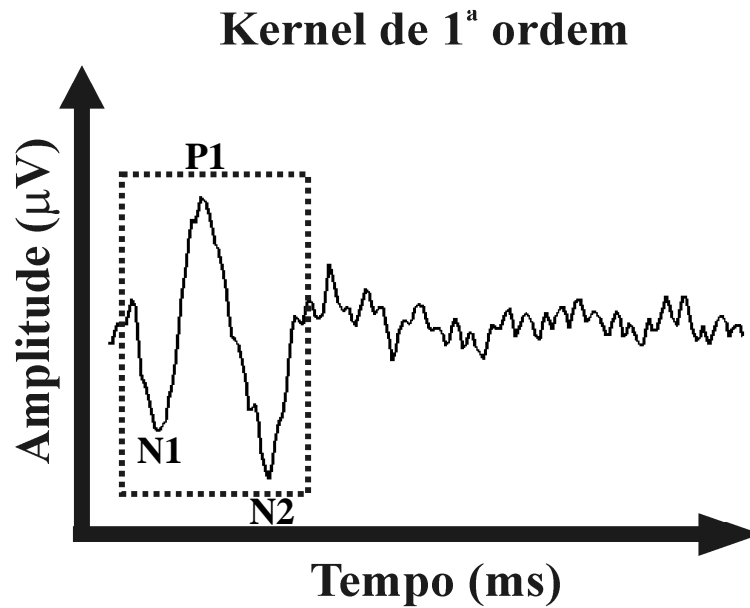
As respostas unitárias obtidas, seguido da estimulação visual são representadas em formas de ondas bifásicas constituídas por uma deflexão negativa inicial, chamada de N1, seguida de um pico positivo, chamado de P1, e uma segunda deflexão negativa, chamada de N2, após o pico positivo (Figura 19) (HOOD *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2007). Desse complexo N1-P1-N2 é possível medir a amplitude ( $\mu\text{V}$ ) e o tempo implícito (ms). (SUTTER & TRAN, 1992).



**Figura 18.** Conjunto de 103 respostas eletrorretinográficas (mfERG) obtidas de um sujeito controle saudável. **(A)** Sinais bioelétricos obtidos da retina esquerda. **(B)** Gráfico de densidade de resposta. Na região nasal a área em azul de menor amplitude corresponde à papila do nervo óptico. N, nasal, T, temporal, S, superior, I, inferior. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2011.

A diversidade de estudos relacionados à técnica multifocal é muito grande, e o foco das pesquisas têm sido heterogêneo, desde as principais contribuições celulares para as respostas do mfERG até a aplicabilidade da técnica. Segundo HOOD *et al.* (2002), em estudos realizados em primatas não humanos (*Macaca mulatta*), o início da deflexão negativa N1 recebe influência das células bipolares OFF, além dos fotorreceptores e retina interna, entretanto em menor intensidade. Antes de ser alcançado o valor máximo da deflexão negativa N1, este componente recebe forte influência das células bipolares ON.

Em relação ao componente P1, a porção inicial desse pico positivo é influenciado pela despolarização das células bipolares ON e hiperpolarização das células bipolares OFF. Contudo, após as células bipolares OFF atingirem seu pico máximo, o pico P1 é afetado pela despolarização de ambas células bipolares ON e OFF. Finalizando o processo de formação do componente P1, a parte final do pico positivo recebe ampla contribuição da repolarização das células bipolares ON, com alguma da repolarização das células OFF e retina interna. O pico P1 ocorre entre o tempo do pico da contribuição das células bipolares OFF e ON (HOOD *et al.*, 2002; KRETSCHMANN *et al.*, 2000).



**Figura 19.** Onda bifásica do registro do *kernel* de primeira ordem do eletrorretinograma multifocal obtido de um indivíduo saudável, com destaque para o intervalo de sinal, onde se observa a presença do complexo N1-P1-N2. Deflexão negativa inicial (N1), seguido de um pico positivo (P1) e uma segunda deflexão negativa (N2). Fonte: CARVALHO *et al.*, 2011.

O uso da técnica do eletrorretinograma multifocal é indicado no que se refere à avaliação da função retiniana de pacientes que sofrem de alguma moléstia visual, uma vez que essa função pode ser afetada por danos que ocorram em sua estrutura, que dependendo do local, refletem alterações na forma de onda do mfERG. Algumas doenças causam danos no segmento externo dos cones, o que reflete na redução da amplitude do pico positivo P1, podendo atrasar de forma moderada o tempo implícito. Danos na camada plexiforme externa podem fazer com que a amplitude de resposta seja aumentada e o tempo implícito sofra um atraso (BEREZOVSKY *et al.*, 2004; HOOD *et al.*, 1998, 1999).

De forma geral, qualquer que seja o dano no receptor que resulte na destruição da célula, ou que reduza de forma significativa as respostas das células bipolares ON e OFF, fazem com que a amplitude de resposta do mfERG diminua ou aumente, respectivamente, enquanto que o tempo implícito pode atrasar moderadamente. Danos à camada plexiforme interna podem fazer com que ocorram alterações na transmissão sináptica e, conseqüentemente, haja um pequeno atraso no tempo implícito (MARMOR *et al.*, 2004).

Com o passar do tempo, o eletrorretinograma têm ganhado grande importância em áreas de pesquisa e clínica oftalmológica. Entretanto, a interpretação correta de seus resultados é fator decisivo para aceitação ou não das



respostas, haja vista que pequenas alterações na latência ou na amplitude podem ser significativas. Para OYAMADA (2007), fatores intervenientes como: fixação excêntrica ou inconsistente, movimentação dos olhos, contração do músculo orbicular e/ou da musculatura cervical, posicionamento da pálpebra superior e cílios, correção inadequada, não transparência adequada do eletrodo corneano (quando for o caso), deslocamento ou mau posicionamento do eletrodo, e outros, podem causar erros na interpretação dos resultados obtidos, dessa forma, levando à erros de conduta. Questões relacionadas às condições de pré-adaptação, como iluminação do ambiente, podem ter efeito nas respostas do mfERG (CHAPPELOW & MARMOR, 2002).



### 3. OBJETIVOS

---

Dois trabalhos paralelos foram desenvolvidos durante a vigência do curso de doutorado, justificando a presença dos dois objetivos gerais listados abaixo.

#### 3.1. OBJETIVO GERAL 1

Validar um método confiável para identificar a razão sinal-ruído (SNR) ótima que nos permita classificar respostas eletrorretinográficas de registros obtidos através do mfERG como registros com amplitude normal, registros com amplitude diminuída ou registros com ausência de sinal e testar esta método em pacientes com toxoplasmose ocular.

#### 3.2. OBJETIVO GERAL 2

Investigar os efeitos do uso agudo da cloroquina através da comparação de respostas eletrorretinográficas de registros obtidos através do mfERG do grupo controle e pacientes com malária, infectados pelo *P. vivax*, que receberam o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil.

#### 3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.3.1. Objetivos específicos 1

- ❖ Calcular a razão da amplitude RMS de respostas eletrorretinográficas do grupo controle saudável;
- ❖ Determinar a razão da amplitude RMS ótima para fazer a discriminação entre registros com amplitude normal daqueles registros em que o sinal está ausente, atenuado e sob diferentes níveis de atenuação.
- ❖ Validação do método com a sua aplicação em casos de pacientes com toxoplasmose ocular que apresentam diferentes graus de perda visual.

### 3.2.2. Objetivos específicos 2

- ❖ Estimar a dose cumulativa total de cloroquina ingerida pelo paciente infectado pelo *P. vivax* durante o tratamento.
- ❖ Medir a amplitude dos componentes N1, P1 e N2 dos seis anéis concêntricos, obtidos através do eletrorretinograma multifocal nos pacientes infectados pelo *P. vivax*, que fazem uso da cloroquina.
- ❖ Medir o tempo implícito dos componentes N1, P1 e N2 dos seis anéis concêntricos, obtidos através do eletrorretinograma multifocal nos pacientes infectados pelo *P. vivax*, que fazem uso da cloroquina.
- ❖ Comparar os resultados obtidos dos componentes N1, P1 e N2 dos pacientes usuários de cloroquina com o grupo controle saudável.
- ❖ Observar se há correlação entre a amplitude das respostas do mfERG com a dose cumulativa total ingerida pelo paciente.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. MATERIAL E MÉTODOS RELACIONADOS AO OBJETIVO 1

#### 4.1.1. Obtenção dos registros eletrorretinográficos utilizados para o procedimento de desenvolvimento do método que será utilizado para classificação das respostas eletrofisiológicas

Foram registrados mfERG's de dez (10) sujeitos saudáveis, com idade média de  $25,4 \pm 3,5$  anos, cinco (05) homens e cinco (05) mulheres. A acuidade visual dos indivíduos foi aferida pelo autorrefratômetro (Humphrey Systems, ZEISS) e quando necessário, foi corrigida por lentes dióptricas para o valor de 20/20. Nenhum dos voluntários apresentou histórico de doenças infecciosas, vasculares, visuais ou neurodegenerativas. Todos os procedimentos estavam de acordo com a Declaração de Helsinki, e os participantes deste trabalho, antes do início dos testes, foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e da divulgação dos resultados, e concordaram com o termo de livre consentimento (APÊNDICE 1) que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, Brasil (protocolo Nº. 057/2008, ANEXO 1), de 26 de novembro, seguindo a resolução 196/66 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

Os registros foram gerados pelo sistema VERIS Science v6.0.5d (Electro-Diagnostic, EDI, San Mateo, California), e foram compostos por um arranjo de 103 elementos hexagonais pretos e brancos, cobrindo aproximadamente  $45^\circ \times 45^\circ$  de campo visual. Este estímulo foi mostrado em uma microcâmera colorida (FMS II, EDI), com uma taxa de amostragem de 60 Hz e resolução espacial de  $1280 \times 1024$  pixels, controlados por um computador. A microcâmera foi posicionada em frente ao olho do sujeito, e a distância óptica entre o olho e o estímulo foi ajustada até que fosse encontrado o melhor foco. O protocolo usado estava de acordo com o guia da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV – *International Society of Clinical Electrophysiology of Vision*).

Os hexágonos foram escalonados de modo excêntrico para equalizar a amplitude de resposta através do campo visual, de acordo com a ISCEV (HOOD *et al.*, 2008). A modulação da luminância temporal para cada hexágono foi controlada por um ciclo completo de uma mesma seqüência-m binária, composta com  $2^{15}-1$

elementos (SUTTER & TRAN, 1992). O estado +1 e o estado -1 da seqüência-m binária representam o período *flash* (branco) e não *flash* (preto), respectivamente. O ciclo completo de estimulação teve a duração de 4 minutos e 33 segundos, divididos em 8 segmentos cada qual com 34,13 segundos. A luminância dos estímulos hexagonais pretos foi de 0 cd/m<sup>2</sup> (luminância residual do monitor) e dos brancos 200 cd/m<sup>2</sup>. Uma cruz central vermelha em forma de x, correspondendo a 1° de ângulo visual, foi usado como ponto de referência e a fixação do olho foi monitorada durante a estimulação visual por uma câmera infravermelha localizado no interior do estímulo. Os registros foram realizados em sala com luz ambiente (CHAPPELOW & MARMOR, 2002).

Antes do início dos registros eletrofisiológicos, anteriormente à colocação do eletródio, as pupilas dos voluntários foram dilatadas utilizando-se os midriáticos: tropicamida 1% (Mydriacil, Alcon), duas gotas e cloridrato de fenilefrina 10% (Fenilefrina, Allergan), duas gotas; e em seguida anestesiadas com o anestésico cloridrato de proximetacaína 0.5% (Anestalcon, Alcon), uma gota. Após esse procedimento, aguardou-se cerca de 10 minutos para que ocorresse a dilatação de pelo menos 6 mm da pupila. Foi instilado metilcelulose a 2% na lente do eletródio corneano de registro. Posterior a limpeza com gel abrasivo (Nuprep, D.O.Weaver, Aurora, EUA) do lobo da orelha ipsilateral ao olho testado, foi colocado o eletródio de superfície (terra) com uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O.Weaver, EUA). Todos foram instruídos sobre a necessidade de ficarem imóveis e atentos durante a aquisição da mfERG. O teste foi realizado monocularmente, e o olho contralateral foi ocluído durante a realização do registro.

Após a medida monocular da acuidade visual com a melhor correção dióptrica através do autorrefratômetro (Humphrey System), os registros contínuos foram captado por eletródio corneano bipolar em forma de lente de contato (Burian-Allen - GoldLens, Doran Instruments, MD, USA) no olho com menor erro dióptrico. A impedância do eletródio sempre esteve abaixo de 2 kΩ. Os sinais bioelétricos foram amplificados com um ganho de 50.000 vezes, mostrados 16 vezes por *frame* (cerca de 960 Hz), e usados filtros eletrônicos de 10-300 Hz usando um amplificador (Physiodata Amplifier) diferencial de 15LT (Grass, Quincy, Massachusetts). Foi usada uma placa de aquisição de dados (PCI ESeries, National Instruments, TX) para digitalizar os sinais analógicos. A câmera foi usada para monitorar a posição do olho, o alinhamento do eletródio de lente de contato com a pupila e a estabilidade da

fixação durante o registro. Quando da perda de fixação ou da presença de artefatos, o segmento foi interrompido e descartado.

#### 4.1.2. Cálculo da razão da amplitude RMS (root mean square)

O sistema VERIS Science v6.0.5d (EDI) foi usado para extrair os *kernels* de primeira ordem. Os dados dos registros dos *kernels* de primeira ordem, localizados entre 0 – 200 ms, foram exportados para serem analisados *off-line* por uma rotina (APÊNDICE 4) em ambiente MATLAB (Mathworks, Natick, Massachusetts). Calculou-se a razão da amplitude RMS de cada resposta local do mfERG, de todos os sujeitos (ZHANG *et al.*, 2003).

Primeiramente, calculou-se a amplitude RMS do *kernel* de primeira ordem do intervalo de tempo que compreende o sinal, localizado entre 0 – 80 ms, e a amplitude RMS do *kernel* de primeira ordem do intervalo de tempo compreendendo somente ruído, e que não está correlacionado com a estimulação visual (Figura 20), localizado entre 120 – 200 ms (Equação 1 e 2, respectivamente).

Equação 1:

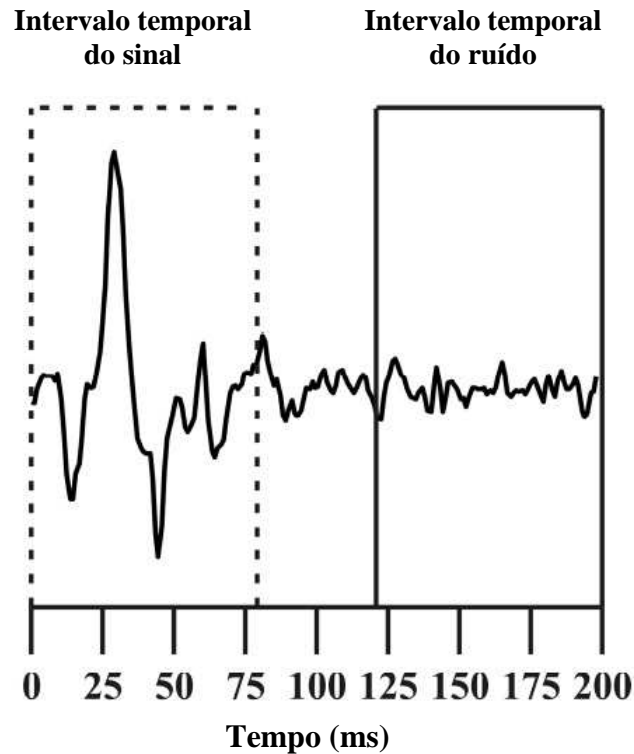
$$\textit{Amplitude do Sinal} = \sqrt{\frac{\sum_{t=0}^{80} (R_t - \bar{\mu}_{0 a 80})^2}{N}}$$

A amplitude do sinal da onda é a amplitude RMS calculada sobre o intervalo de tempo do sinal do *j*th hexágono do registro,  $R_t$  é a amplitude absoluta no tempo  $t$ ,  $\mu_{0 a 80}$  é a amplitude média do registro durante intervalo de tempo do sinal, e  $N$  é o número de pontos do registro no intervalo de tempo do sinal.

Equação 2:

$$\textit{Amplitude do Ruído} = \sqrt{\frac{\sum_{t=120}^{200} (R_t - \bar{\mu}_{120 a 200})^2}{N}}$$

A amplitude do ruído da onda é a amplitude RMS calculada sobre o intervalo de tempo do ruído do *j*th hexágono do registro,  $R_t$  é a amplitude absoluta no tempo  $t$ ,  $\mu_{120 a 200}$  é a amplitude média do registro durante intervalo de tempo do ruído, e  $N$  é o número de pontos do registro no intervalo de tempo do ruído.



**Figura 20.** Registro do mfERG. A amplitude RMS do intervalo do sinal (0 – 80 ms) e do ruído (100 – 200 ms) foram calculados para todos os 103 registros, a fim de quantificar a razão da amplitude RMS associada à informação do sinal e do ruído de cada registro.

A partir daí, calculou-se a razão entre a amplitude RMS do sinal do  $j$ th hexágono e a média da amplitude RMS do ruído dos 103 registros do mfERG obtidos do mesmo sujeito (Equação 3, razão do sinal). Para obter-se um valor equivalente ao intervalo do ruído, dividiu-se a amplitude RMS do ruído do  $j$ th hexágono pela média da amplitude RMS do ruído (Equação 4, razão do ruído).

$$\text{Equação 3: } \textit{Razão do Sinal} = \frac{\textit{Amplitude do Sinal}}{\textit{Média da Amplitude do Ruído}_{\text{hexagono (1 a 103)}}} - 1$$

A razão sinal da onda é a razão sinal ruído (SNR) do intervalo de tempo do sinal para o  $j$ th hexágono do registro. A média da amplitude do ruído é a média da amplitude RMS do ruído para os 103 hexágonos do registro do mesmo sujeito.

$$\text{Equação 4: } \textit{Razão do Ruído} = \frac{\textit{Amplitude do Ruído}}{\textit{Média da Amplitude do Ruído}_{\text{hexagono (1 a 103)}}} - 1$$

A razão do ruído é equivalente à SNR do intervalo de tempo do ruído para o  $j$ th hexágono do registro.

#### 4.1.3. Cálculo da razão da amplitude RMS ótima para discriminar registros normais de registros sem sinal

A primeira análise foi realizada após a composição dos dados em 1030 razões de sinal e 1030 razões de ruído. Estimou-se a distribuição da frequência da razão da amplitude RMS (razão de sinal e razão de ruído). Em seguida, foi calculada a função de distribuição cumulativa associada à distribuição de dados do sinal e ruído (Figura 21 A–B). Realização da análise ROC (Receiver Operating Characteristic) usando como uma taxa de falsos positivos os valores de -1 para a função de distribuição cumulativa do ruído, e uma taxa de verdadeiro positivo para a função de distribuição cumulativa do sinal (Figura 21 C–D). Finalizando-se com a determinação da razão da amplitude RMS ótima para diferenciar dados constituídos de sinal dos dados constituídos de ruído, como um correspondendo a um alto *trade-off* associado no espaço ROC. O *trade-off* é resultante da diferença entre cada par de taxa verdadeiro positivo e falso positivo no espaço ROC (Figura 21 C–D).

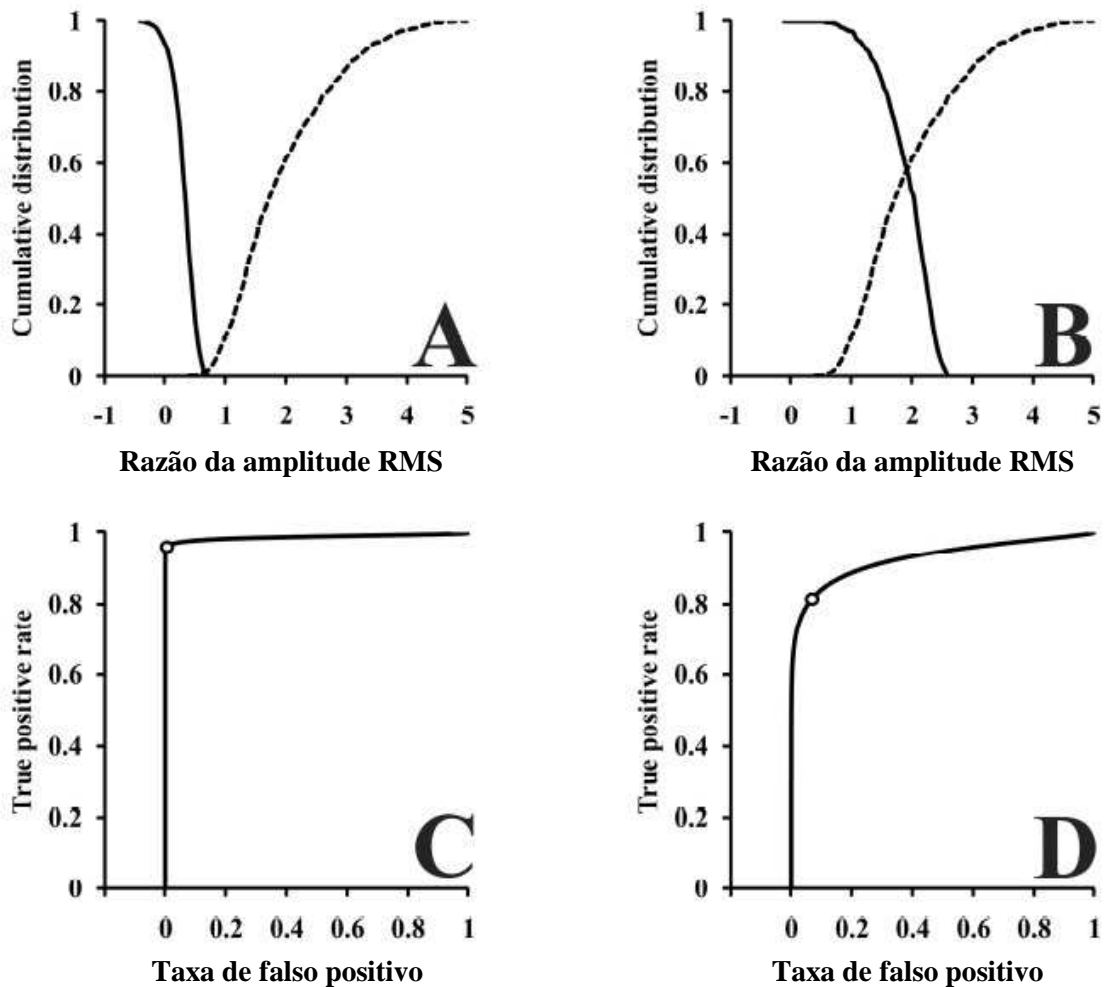
#### 4.1.4. Cálculo da razão da amplitude RMS ótima para discriminar registros normais daqueles registros com sinal atenuado

Para determinar a razão da amplitude RMS ótima utilizou-se um método descrito por WRIGHT *et al.* (2008), na qual é necessário atenuar artificialmente os registros originais de um modo que os sinais possam ser diminuídos enquanto mantém-se um nível de ruído constante. Para atenuar a amplitude do sinal de cada registro, os dados do ruído foram somados aos do sinal. O nível de atenuação corresponde ao número de vezes que os dados do ruído foram somados ao sinal (número de soma entre sinal e ruído). Posteriormente, o resultado foi dividido pelo nível de atenuação mais um, para manter constante a amplitude RMS do ruído (Equação 5).

$$\text{Equação 5: } j\text{th Onda atenuada} = \frac{j\text{th Onda}_{0 \text{ a } 80} + (\text{nível de atenuação} \times j\text{th onda}_{120 \text{ a } 200})}{\text{Nível de atenuação} + 1}$$

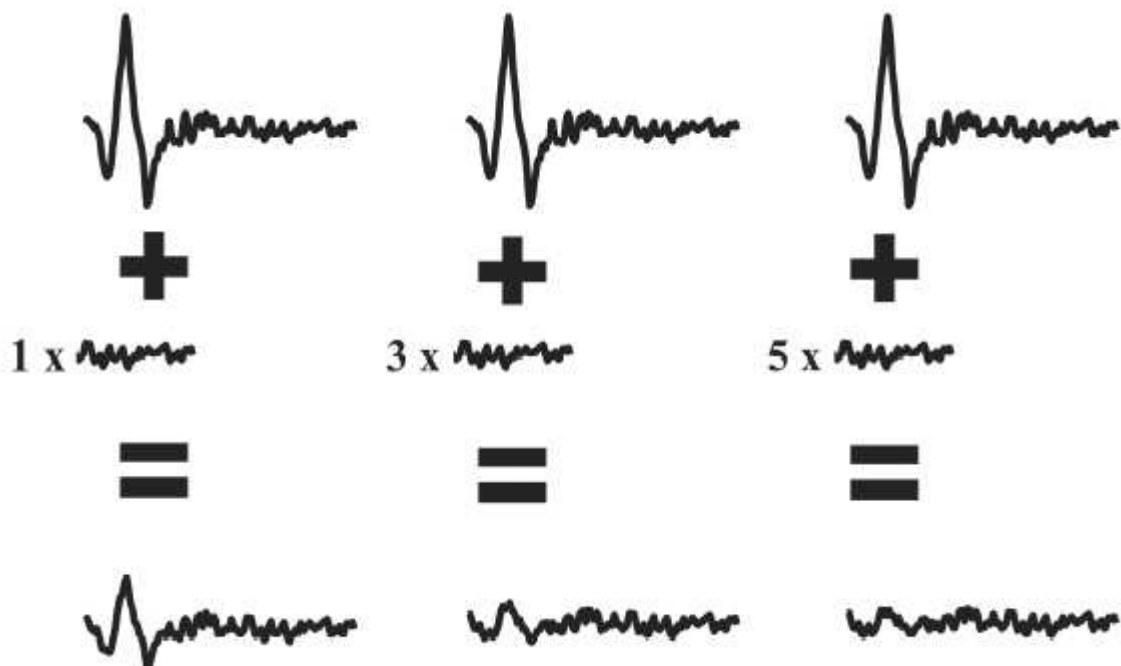
A *jth* Onda atenuada: são os dados do intervalo de tempo do sinal atenuados, *jth* Onda 0 a 80: são os dados do intervalo de tempo do sinal original; nível de atenuação: é o número de vezes que os dados do ruído irão ser somados

aos dados do sinal; e o  $j$ th Onda 120 a 200: são os dados do intervalo de tempo do ruído. Durante o estudo, utilizaram-se cinco (5) níveis de atenuação, de 1 a 5, para simular diferentes condições de perda visual. A figura 22 mostra uma representação esquemática dos diferentes níveis de atenuação artificial sobre o mesmo sinal na onda original.



**Figura 21.** Análise implementada para se obter valores ótimos e, dessa forma, diferenciar registros originais dos registros atenuados. (A) Função de distribuição cumulativa (FDC) da informação do ruído (linha contínua) e da informação do sinal original (linha pontilhada). (B) FDC da informação do sinal com nível 1 de atenuação (linha contínua) e da informação do sinal (linha pontilhada). (C) Análise ROC correlacionando FDC do sinal com FDC do ruído. (D) Análise ROC correlacionando sinal com nível 1 de atenuação com o sinal original. Os círculos da curva ROC, em C e D, tem um *trade-off* elevado entre a taxa de verdadeiro positivo e taxa de falso positivo. A razão da amplitude RMS associada ao *trade-off* elevado no espaço ROC, foi considerada um valor ótimo para diferenciar os dois grupos. Funções usando dados de outros níveis de atenuação são intermediárias entre as funções mostradas nessa figura.





**Figura 22.** Diagrama representando a atenuação artificial aplicada sobre o sinal de registros originais. Da esquerda para direita, o nível de atenuação está aumentando. Conseqüentemente, o sinal do registro está diminuindo. O nível de ruído foi mantido constante (semelhante à amplitude RMS) no decorrer dos níveis de atenuação devido o denominador da equação 5, usado para normalizar os registros, foi dependente de quanto ruído foi adicionado ao sinal.

Em seguida, o processo da seção anterior (5.2) foi repetido. Entretanto, substituiu-se a informação do ruído pela atenuação da informação do sinal.

#### **4.1.5. Testando a confiabilidade da razão da amplitude RMS em diferenciar registros com diferentes níveis de atenuação**

Estimou-se a quantidade de erros que o classificador pode apresentar quando do uso da razão da amplitude RMS ótima para diferenciar registros normais de registros com diferentes níveis de atenuação ou ruído. O papel do classificador foi comparar a razão do sinal dos registros de cada valor ótimo obtido previamente para os diferentes níveis de atenuação. Antes do processo de atenuação, o classificador considerou que todos os registros devem ter a razão sinal acima da SNR ótima pra diferenciar registros normais de qualquer registro atenuado. Considerou-se erro de classificação quando após o processo de atenuação a razão da amplitude RMS atenuada foi maior que o valor ótimo. A identificação foi considerada correta quando a razão sinal do registro foi menor que o valor ótimo. A taxa de acerto (Hit Rate) da classificação automática foi calculada pela equação 6.

Equação 6: 
$$HR = \frac{\text{Respostas corretas}}{(\text{Respostas corretas} + \text{erros})}$$

#### **4.1.6. Validação do método em pacientes com toxoplasmose ocular que apresentam diferentes graus de perda visual**

Para validação do método que será utilizado para classificação das respostas eletrofisiológicas, foram testados três pacientes com toxoplasmose ocular que apresentavam diferentes graus de perda visual. A correlação com os achados eletrofisiológicos e psicofísicos foi possível, uma vez que as lesões cicatriciais apresentam suas bordas bem definidas e delimitadas. Um destes pacientes foi contaminado ainda no período intrauterino, sendo classificado como infecção congênita, e os outros dois adquiriram a toxoplasmose no período extrauterino, e classificados como infecção adquirida. Todos pacientes foram avaliados pelo médico oftalmologista do projeto, e seguiram os mesmo procedimentos descritos anteriormente e aplicados ao grupo controle de indivíduos saudáveis.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 2**

### **4.2.1. Sujeitos**

Foram estudados trinta e sete sujeitos saudáveis, com idade média de  $33,9 \pm 11,2$  anos, vinte e dois (22) homens e quinze (15) mulheres que participaram voluntariamente dos experimentos. A acuidade visual dos indivíduos foi aferida pelo autorrefratômetro (Humphrey Systems, ZEISS) e quando necessário, foi corrigida por lentes dióptricas para o valor de 20/20. Foi realizado a anamnese (APÊNDICE 2), e nenhum dos sujeitos apresentou histórico de doenças infecciosas, vasculares, visuais ou neurodegenerativas, e nenhum deles fez uso de cloroquina como antimalárico ou antireumático.

Também foram testados no período de março/2010 a setembro/2011 quarenta e oito (48) pacientes com malária, trinta e nove (39) homens e nove (09) mulheres, com idade média de  $33.3 \pm 11.9$  anos. Todos infectados pelo *P. vivax*, e com parasitemia e morfologia da espécie confirmada pela técnica de gota espessa, como preconizada pelo Ministério da Saúde, no Manual de diagnóstico laboratorial

da malária. Todos os testes foram realizados no Instituto Evandro Chagas, no setor de ensaios clínicos da Malária, Belém, Pará, Brasil. Os procedimentos para a realização dos testes eletrofisiológicos dos pacientes com malária foi o mesmo empregado para os indivíduos do grupo de sujeitos saudáveis.

Todos os procedimentos estavam de acordo com a Declaração de Helsinki, e os participantes deste trabalho, antes do início dos testes, foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e da divulgação dos resultados, e concordaram com o termo de livre consentimento (APÊNDICE 3) que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, Brasil (protocolo Nº. 003/2009, ANEXO 2) de 28 de março de 2009, seguindo a resolução 196/66 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

No estado do Pará, o tratamento contra todos os tipos de malária é financiado pelo Ministério da Saúde. No que concerne à infecção causada pelo *P. vivax*, o tratamento padrão tem duração de sete (07) dias, iniciando com a ingestão de cloroquina (600 mg) e primaquina (30 mg) no primeiro dia. No segundo e terceiro dia, é administrado 450 mg de cloroquina e 30 mg de primaquina. Do quarto ao sétimo dia, somente primaquina (30 mg) é administrado. Totalizando a dose cumulativa de 1500 mg de cloroquina no final do tratamento.

#### **4.2.2 Estimulação visual**

Os registros foram gerados usando-se um sistema portátil de mfERG, e o programa RETIsScan Science 4.0.0.4 (Rolland Consult, Brandenburg, Germany) foi usado para gerar um arranjo de 103 elementos hexagonais pretos e brancos, cobrindo aproximadamente 25° de ângulo visual. Este estímulo foi mostrado em um monitor de cristal líquido (LCD – liquid crystal display) e controlado por um computador. O fator de distorção foi de 1:4. O protocolo usado estava de acordo com o guia da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV – International Society of Clinical Electrophysiology of Vision).

Os hexágonos foram escalados de modo excêntrico para equalizar a amplitude de resposta através do campo visual, de acordo com a ISCEV (HOOD *et al.*, 2008). A modulação da luminância temporal para cada hexágono foi controlada por um ciclo completo de uma mesma sequência-m binária, composta com  $2^{15}-1$  elementos (SUTTER & TRAN, 1992). O estado +1 e o estado -1 da sequência-m

binária representam o período flash (branco) e não flash (preto), respectivamente. O ciclo completo de estimulação tem a duração de 12 minutos, divididos em 12 segmentos cada qual com 60 segundos. A luminância dos estímulos hexagonais pretos foi de  $0 \text{ cd/m}^2$  (luminância residual do monitor) e dos brancos  $202 \text{ cd/m}^2$ . Uma cruz central vermelha em forma de x, correspondendo a  $52'$  de ângulo visual, foi usado como ponto de referência e a fixação do olho foi monitorada durante a estimulação visual. Os registros foram realizados em sala com luz ambiente (CHAPPELOW & MARMOR, 2002).

#### **4.2.3. Registros**

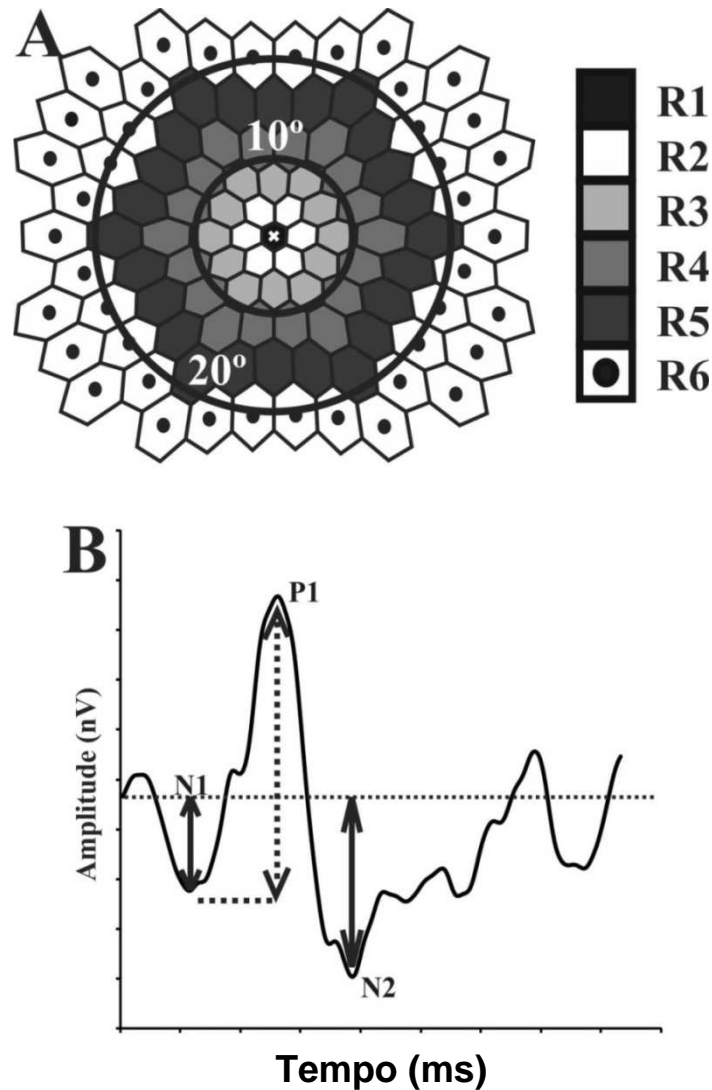
Antes do início dos registros eletrofisiológicos, anteriormente à colocação do eletródio, as pupilas dos voluntários foram dilatadas utilizando-se os midriáticos: tropicamida 1% (Mydriacil, Alcon), duas gotas e cloridrato de fenilefrina 2.5% (Fenilefrina, Allergan), duas gotas; e em seguida anestesiadas com o anestésico cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon, Alcon), uma gota. Após esse procedimento, aguardamos cerca de 10 minutos para que ocorresse a dilatação de pelo menos 6 mm da pupila. Posterior a limpeza com gel abrasivo (Nuprep, D.O.Weaver, Aurora, EUA) da testa do sujeito, foi colocado o eletródio de superfície (terra) com uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O.Weaver, EUA). O eletródio de referência em forma de concha foi colocado no canto do olho ipsilateral ao olho testado, com ajuda da pasta eletrolítica. Todos foram instruídos sobre a necessidade de ficarem imóveis e atentos durante a aquisição da mfERG. O teste foi realizado monocularmente, e o olho contralateral foi ocluído durante a realização do registro.

Após a medida monocular da acuidade visual com a melhor correção dióptrica através do autorrefratômetro (Humphrey System), os registros contínuos foram captado por eletródio corneano DTL (DAWSON, TRICK & LITZKOW, 1979) no olho com menor erro dióptrico. A impedância do eletródio sempre esteve abaixo de  $5 \text{ k}\Omega$ . Os sinais bioelétricos foram amplificados com um ganho de 100.000 vezes, e usados filtros passa-banda eletrônicos de 5-100 Hz usando um amplificador (Physiodata Amplifier), e digitalizados à 1 KHz. Quando da perda de fixação, ou da presença de artefatos (causado, por exemplo, por movimento involuntário dos olhos ou pelo ato de piscar) o segmento era interrompido e descartado.

### 4.2.3 Análise dos resultados

Os *kernels* de primeira ordem foram gerados pelo programa Rolland, e os registros foram medidos em seis (06) anéis concêntricos (anel #1 inicia no hexágono central, Figura 24). Mediu-se a amplitude e o tempo implícito N1, P1 e N2 do registro de cada anel concêntrico. A amplitude do componente N1 foi definida como a diferença de voltagem entre a linha de base e a deflexão N1 (pico negativo) na janela de tempo localiza-se entre 15 e 45 milissegundos (ms). Já a amplitude do componente P1 foi calculada pela diferença entre a deflexão N1 e o pico P1, o que ocorreu na janela de tempo entre 35 e 75 ms, enquanto que a deflexão N2 foi calculada pela diferença entre a linha de base e o pico negativo N2, que estava situada da janela de tempo entre 50 e 125 ms (Figura 23).

Com o objetivo de reduzir a variabilidade inter-individual, foi medido a razão da amplitude dos componentes de cada anel concêntrico, ou seja, do anel #1 até o anel #6.



**Figura 23.** Estimulação visual do mfERG e análise. **(A)** Arranjo constituído de 103 elementos hexagonais aplicado para obtenção das respostas do mfERG. As respostas foram avaliadas em seis (06) anéis concêntricos. O hexágono central correspondeu ao anel concêntrico número 1 (R1). **(B)** Exemplo do registro de resposta obtido pelo mfERG e os componentes N1, P1 e N2 característicos da resposta. A amplitude dos componentes N1 e N2 são medidas da linha de base até a deflexão mais negativa, enquanto que a amplitude P1 foi definida como a diferença de voltagem entre a deflexão N1 e o pico P1.

#### 4.2.4 Análise estatística

Foram calculados o valor médio e o erro padrão, com o objetivo de calcular o erro padrão estimado dos dados. Também se utilizou o teste ANOVA duas vias ( $\alpha = 0.05$ , teste *post-hoc*, com a correção de Bonferroni) para comparar o grupo controle com o grupo de pacientes com malária, para avaliar os parâmetros do mfERG das diferentes áreas da retina. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi usado para avaliar o efeito da dose cumulativa e a dose cumulativa por peso dos pacientes, em relação aos parâmetros do mfERG.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. RESULTADOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 1

#### 5.1.1. Valor da razão da amplitude RMS ótima encontrada para discriminar registros normais daqueles registros sem sinal

Seguida da composição dos dados dos registros em razão sinal e razão ruído, distribuição da frequência da razão amplitude RMS, finalizando com a distribuição cumulativa associada à distribuição de dados do sinal e ruído e posterior aplicação da análise ROC, o valor da razão da amplitude RMS ótima para diferenciar registros constituídos de sinal daqueles registros sem sinal foi 0,47.

#### 5.1.2. Valor da razão da amplitude RMS ótima encontrada para discriminar registros normais daqueles registros com sinal atenuado

Utilizando-se o método descrito por WRIGHT *et al.* (2006), calculou-se a razão da amplitude RMS para atenuar os registros originais através da equação 5, e os valores ótimos encontrados para diferenciar registros normais daqueles registros com sinal atenuado estão indicados no quadro abaixo.

**QUADRO 1.** Valores ótimos encontrados para diferenciar registros com sinal, daqueles registros atenuados. O valor ótimo da razão da amplitude RMS apresentou alto *trade-off* entre a taxa de acertos (HR) e erros.

Nível de atenuação	Valor ótimo
Ruído	0.47
5	0.44
4	0.48
3	0.57
2	0.78
1	1.21

### 5.1.3. Demonstração da confiabilidade da razão da amplitude RMS em diferenciar registros com diferentes níveis de atenuação

Após o cálculo da taxa de acerto (HR) utilizando-se a equação 6, foi possível classificar automaticamente os níveis de atenuação dos registros. O quadro 2 mostra o HR obtidos pelo classificador usando cada razão da amplitude RMS ótima para diferenciar registros normais daqueles registros com diferentes níveis de atenuação, e dessa forma demonstrar a confiabilidade do método.

**QUADRO 2.** Taxa de acerto estimado para ser usada como valor ótimo nos diferentes níveis de atenuação.

Valor ótimo	Taxa de acerto (%)				
	N.A. 5	N.A. 4	N.A. 3	N.A. 2	N.A. 1
0,47	99 ± 0,8	98,9 ± 0,9	96,4 ± 3,5	84,7 ± 16,7	51,5 ± 30,7
0,44	98,4 ± 1,7	97,5 ± 3,1	94 ± 7,1	81,1 ± 21,3	46,5 ± 32,5
0,48	98,7 ± 1,5	98,3 ± 2,3	95,3 ± 5,8	83,6 ± 18,7	50,4 ± 33
0,57	<b>99,3 ± 0,7</b>	<b>99 ± 1,2</b>	97,1 ± 4,6	88,6 ± 14,5	57,1 ± 35
0,78	97,6 ± 3	97,6 ± 3	<b>97,4 ± 2,9</b>	<b>94,2 ± 6,1</b>	68,7 ± 30,4
1,21	81,7 ± 19,3	81,7 ± 19,3	81,7 ± 19,3	81,7 ± 19,2	<b>73,4 ± 15</b>

N.A. nível de atenuação.

O classificador tem uma melhor ação em diferenciar registros normais daqueles registros levemente atenuados (N.A. 1) usando o valor ótimo 1,21, enquanto o valor ótimo de 0,78 foi melhor para diferenciar registros normais daqueles registros com atenuação intermediária (N.A. 2 e 3), e o valor ótimo de 0,57 foi melhor para diferenciar registros altamente atenuados ou registros com ruído (N.A. 4 e 5) dos registros originais.

As análises foram capazes de determinar o limite de ação da razão da amplitude RMS que é necessária para classificar qualquer registro eletrorretinográfico obtido do arranjo de 103 hexágonos (Quadro 3). Pode-se argumentar que os registros atenuados no nível 1 correspondem a uma verdadeira perda visual ou está dentro da variabilidade da amplitude de um registro eletrofisiológico, e que registros moderadamente ou altamente atenuados tem uma

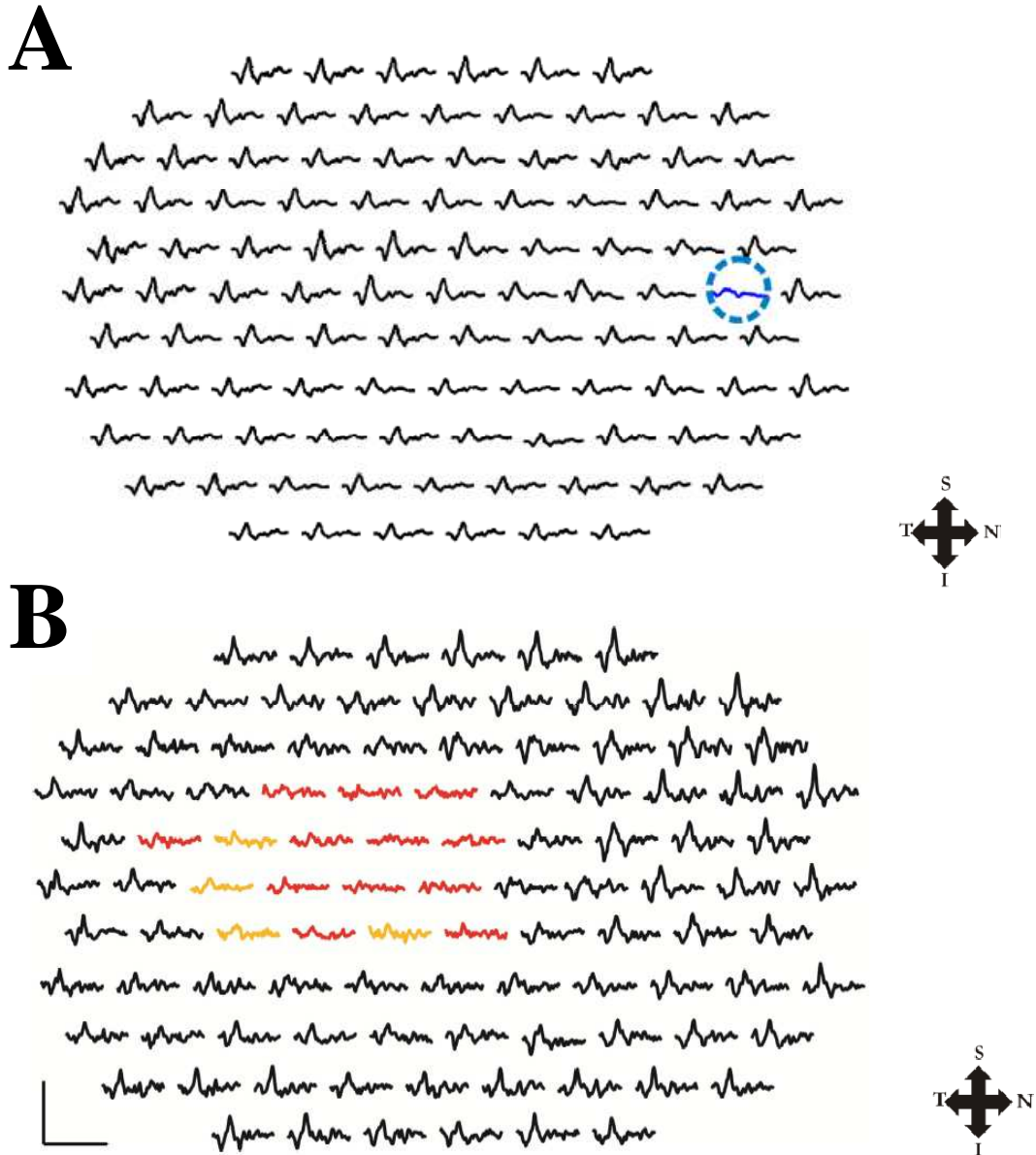


diminuição considerável da amplitude do sinal, sendo que sua importância clínica deve ser considerada.

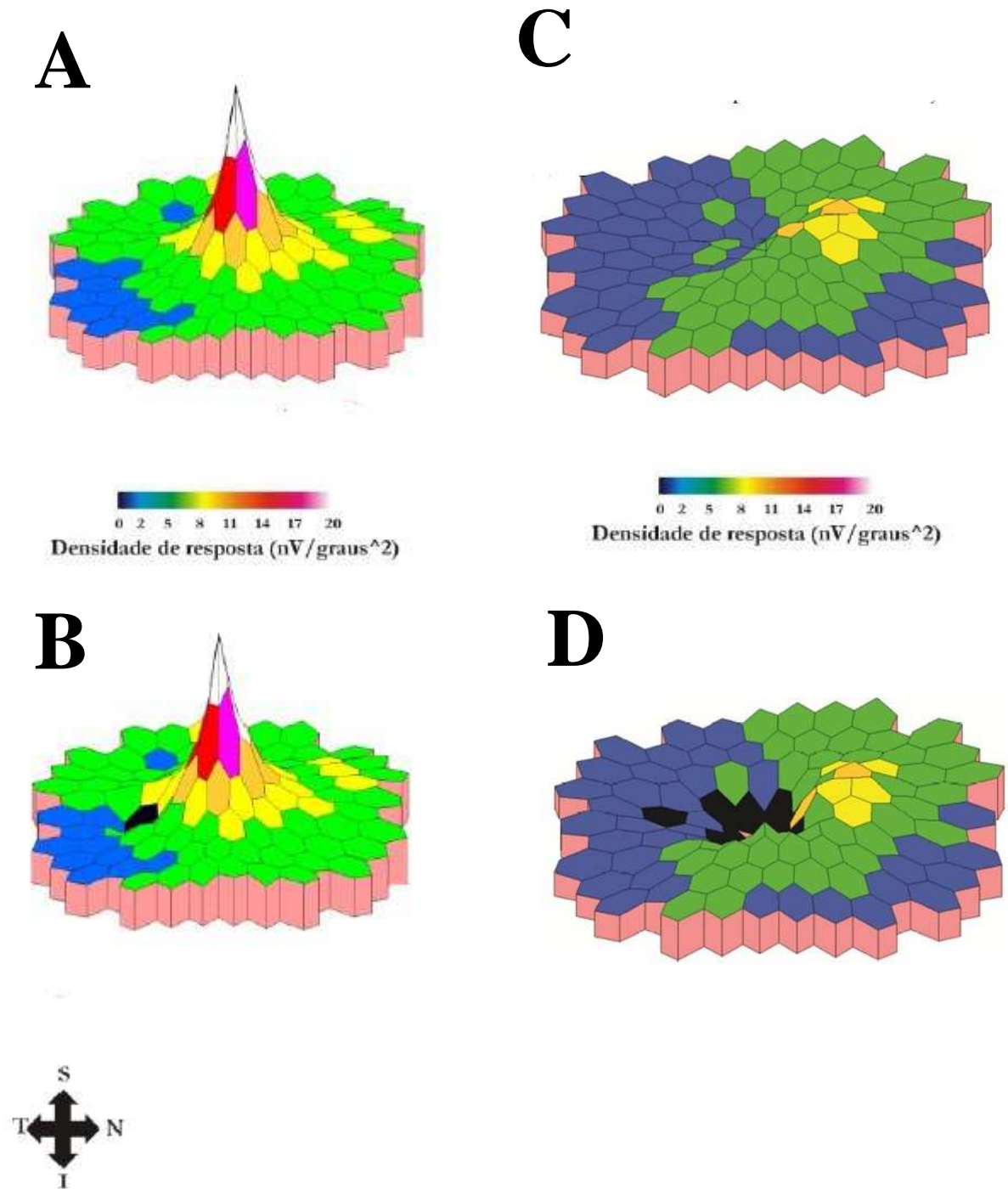
**QUADRO 3.** Classificação dos registros eletrorretinográficos (mfERG) através dos limites da razão sinal-ruído (SNR). Em parênteses a taxa de acerto (HR) do classificador que usa cada valor ótimo.

Classificação dos registros eletrorretinográficos (mfERG)	
Amplitude altamente atenuada	SNR < 0,57 (HR > 97 – 99%)
Amplitude moderadamente atenuada	0,78 > SNR ≥ 0,57 (HR ≈ 94 – 97%)
Amplitude levemente atenuada	1,21 > SNR ≥ 0,78 (HR ≈ 73 – 94%)
Registros normais	SNR ≥ 1,21 (HR ≈ 73%)

Para simular uma situação real, aplicou-se o protocolo de avaliação de registros em um paciente controle saudável e com toxoplasmose ocular. A figura 24 mostra o arranjo de registros destes pacientes após a análise em questão, mostrando os registros retinianos associados à cicatriz retiniana indicada em diferentes cores (FIGURA 24 B). E a figura 25 mostra a densidade de resposta dos dados mostrados na figura 24, com e sem a avaliação SNR.



**FIGURA 24.** Avaliação do registro eletrorretinográfico (mfERG) de um paciente controle saudável (A), e com perda visual causada pela toxoplasmose ocular (B), após aplicação do protocolo de avaliação. A área cicatrizada da retina foi delimitada pelo protocolo em laranja (registros moderadamente atenuados) e vermelho (registros altamente atenuados). Respostas em preto indicam registros normais ou levemente atenuados. Escala horizontal: 100 ms; escala vertical: 1 $\mu$ V.



**FIGURA 25.** Gráfico de densidade de resposta calculado dos mesmos sujeitos (saudável: primeira coluna e paciente: segunda coluna) da figura 25. Os gráficos de densidade de resposta foram programados sem (A e C) e com avaliação SNR (B e D), respectivamente. Os hexágonos sem nenhuma resposta tem densidade de resposta zero, e estão marcados em preto.

## 5.2. RESULTADOS RELACIONADOS AO OBJETIVO GERAL 2

### 5.2.1. Dose cumulativa total

Dos quarenta e oito pacientes (48) testados, 19% (09) eram do sexo feminino e 81% (39) eram do sexo masculino. O número de infecções pelo *P. vivax* que cada paciente adquiriu no decorrer do tempo de vida, variou entre uma (01) e dezoito (18) vezes. Nesse período, a dose média de cloroquina ingerida foi de  $5,429.0 \pm 782.3$  mg (dose mínima: 1,050 mg e dose máxima: 2,700 mg). A dose cumulativa normalizada de acordo com o peso corporal variou entre 14.58 e 545.45 mg/kg.

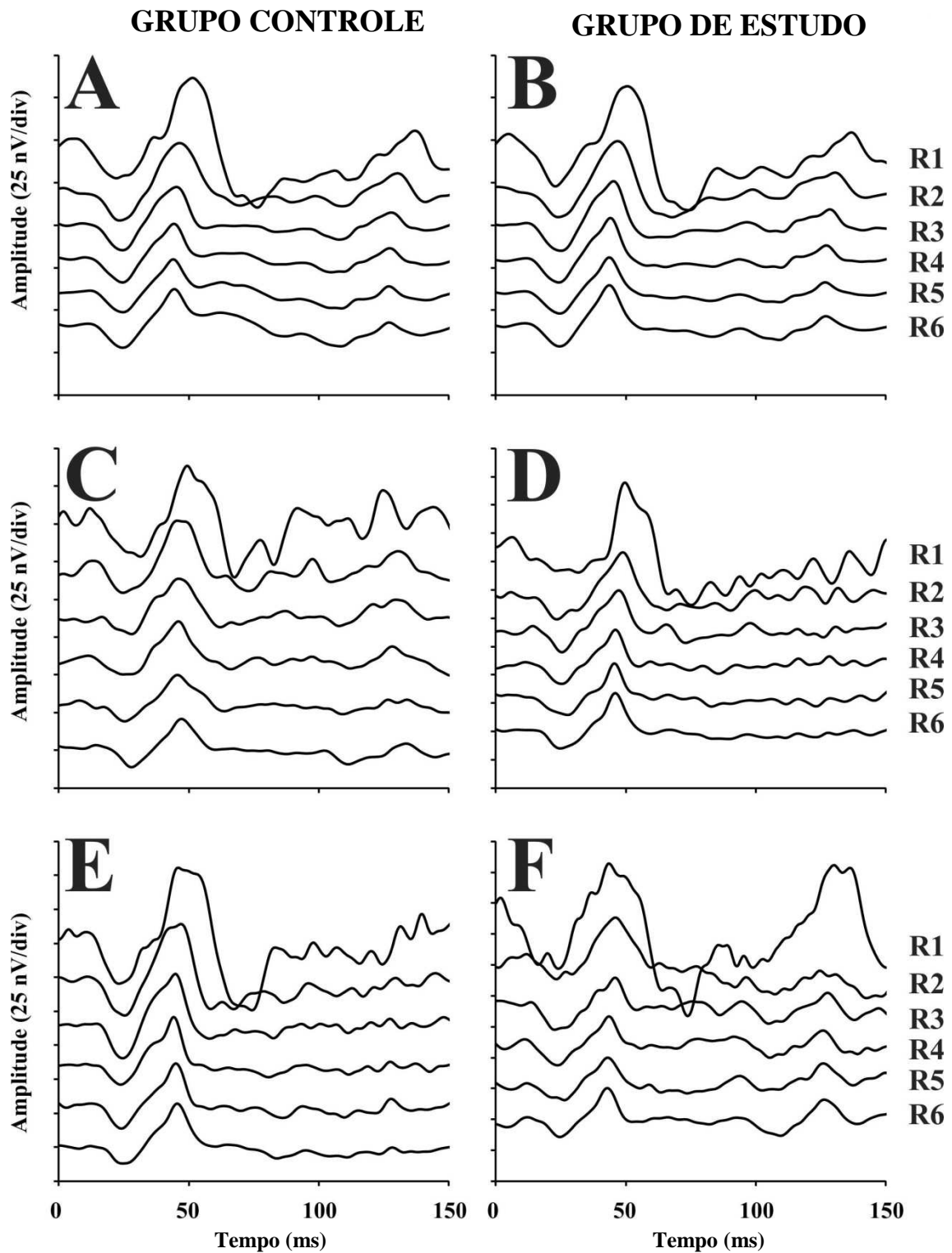
### 5.2.2. Amplitude e tempo implícito dos componentes N1, P1 e N2 dos seis anéis concêntricos originários do mfERG

A figura 26 mostra a média das respostas obtidas de todos os indivíduos do grupo controle (26A) e dos pacientes com malária (26B). As respostas dos seis (06) anéis concêntricos são mostradas. Além do mais, os registros de dois (02) indivíduos do grupo controle (Figura 26C e E) e de dois pacientes com malária (Figura 26D e F) são mostrados.

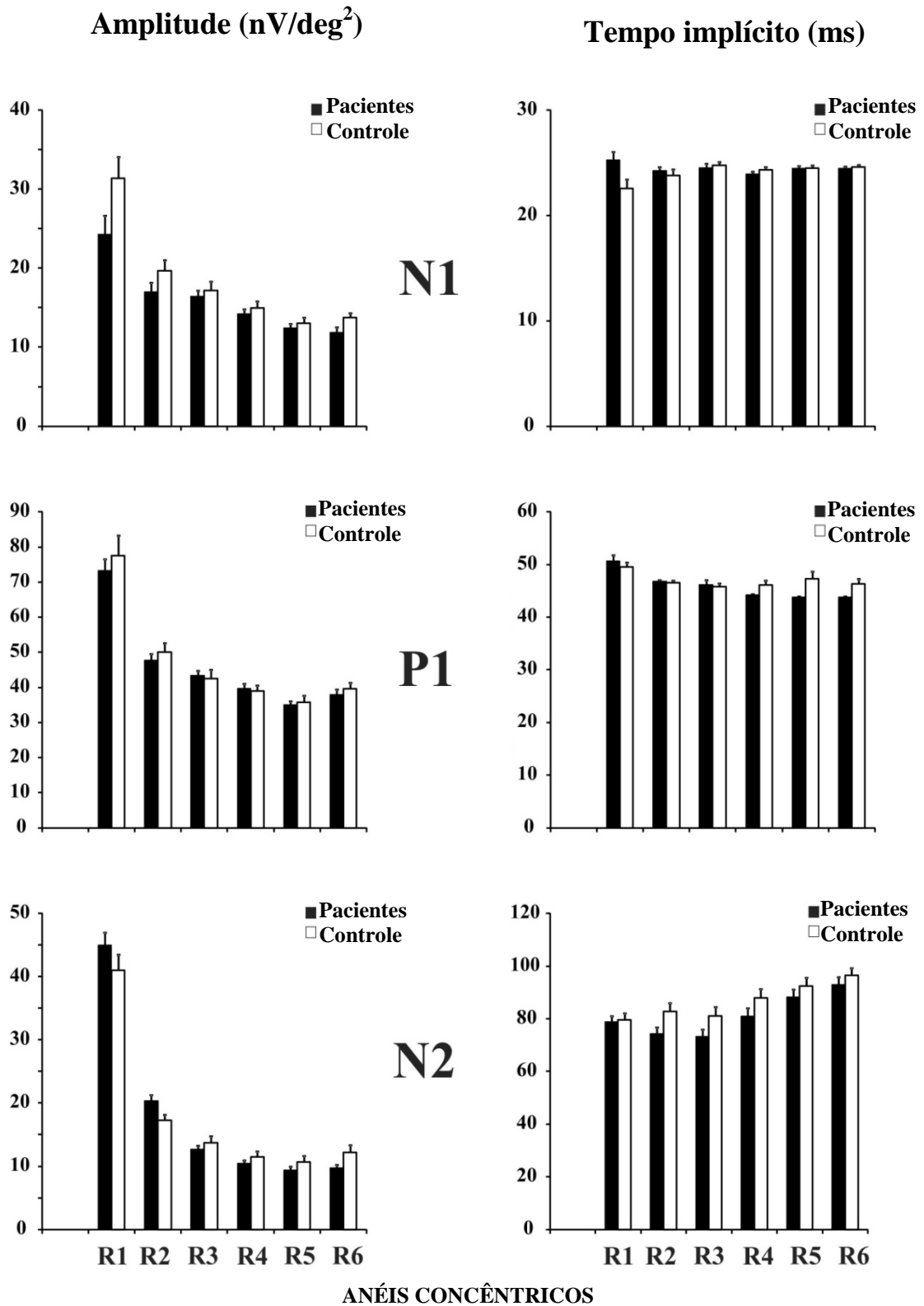
Não foi observado nenhuma diferença significativa da amplitude e o tempo implícito do mfERG, de todos os anéis concêntricos, entre o grupo controle e o grupo estudado (pacientes infectados pelo *P. vivax*) (Figura 27). Levando-se em consideração a razão da amplitude, também não foi observada nenhuma diferença significativa na amplitude dos anéis concêntricos, do R1 até o R6.

### 5.2.3. Respostas (mfERG) X Dose cumulativa total

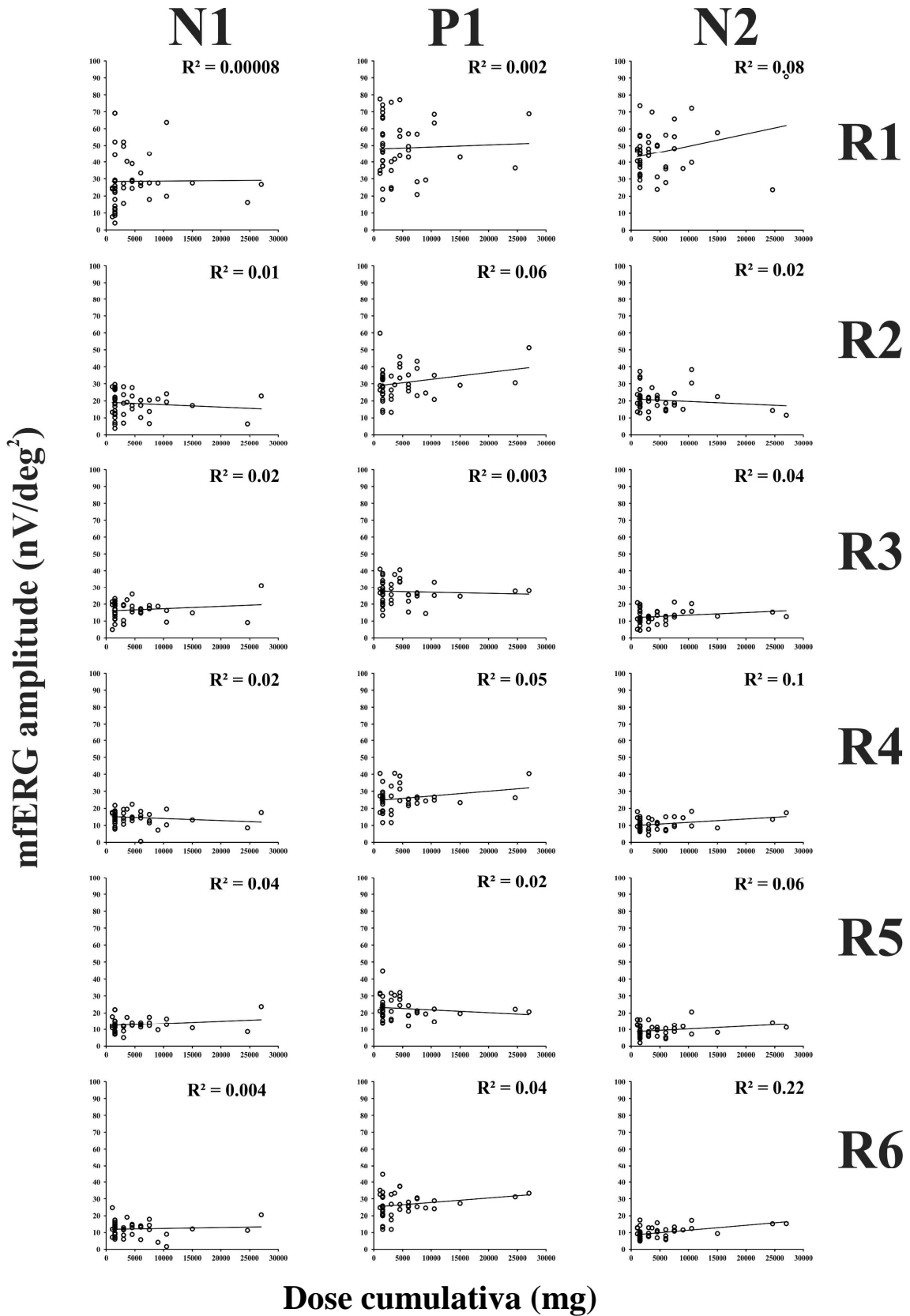
Observou-se que não houve correlação entre a amplitude de todos os componentes (N1, P1 e N2) com a dose cumulativa e com a dose cumulativa por peso, para todos os sujeitos ( $p > 0.05$ ) (Figura 29).



**FIGURA 26.** Registros obtidos através do mfERG do grupo controle (coluna da esquerda) e do grupo de pacientes com malária infectados pelo *P. vivax* (coluna da direita). A – B: Média das respostas dos seis anéis concêntricos obtidos dos registros do grupo controle (A) e do grupo com malária (B). C – F: registros de um único sujeito controle (C e E), e de um único sujeito com malária infectado pelo *P. vivax* (D e F).



**FIGURA 27.** Amplitude (coluna da esquerda) e tempo implícito (coluna da direita) dos diferentes componentes pertencentes aos seis anéis concêntricos analisados, plotados separadamente para o grupo controle (barra em branco) e grupo dos pacientes com malária (barra em preto). Os valores dos componentes N1, P1 e N2 são mostrados nas linhas superior, média e inferior, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a amplitude e o tempo implícito nos dois grupos estudados.



**FIGURA 28.** Variação da amplitude do eletrorretinograma multifocal em função da dose cumulativa estimada de cloroquina nos pacientes. R1-R6 representam áreas retinianas mais central para áreas mais periféricas, respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

---

### 6.1. DISCUSSÃO DO OBJETIVO GERAL 1

Atualmente, poucos são os métodos de análise disponíveis que auxiliam os pesquisadores a avaliarem as respostas da ampla variedade de técnicas eletrofisiológicas presentes no mercado. A diferenciação do que é verdadeiramente sinal e do que é ruído é de extrema importância para o uso confiável e seguro de tais metodologias. Foi mostrado que o produto *dot* entre as respostas e o *template* do sinal artificial pode aumentar a razão sinal-ruído (SNR) dos dados (SUTTER & TRAN, 1992). Alguns estudos sugerem métodos objetivos para avaliar a confiabilidade do mfERG (HOOD *et al.*, 1998; SEELINGER *et al.*, 1998).

Hood *et al.* (1998), sugerem a comparação da amplitude RMS do sinal dos registros com a amplitude RMS do *template* em diferentes intervalos de tempo. O mais próximo no tempo foi a equivalência entre ambas as amplitudes RMS, e o melhor foi a SNR. Por outro lado, Seelinger *et al.* (1998), mediram o tempo implícito do mfERG para determinar sua distribuição na extensão da retina. Esses autores, através do cálculo da mediana do tempo implícito de cada setor dos sujeitos do grupo controle normal, seguido da subtração deste mesmo valor do tempo implícito dos pacientes, encontraram uma pequena variabilidade inter-sujeito e um elevado tempo implícito no ponto cego, retina superior e inferior, além da região macular.

Desde a criação da técnica multifocal, em 1992, sua aplicabilidade nos diferentes campos da oftalmologia clínica foi imediata (HUANG *et al.*, 1997; KRETSCHMANN *et al.*, 2000; VENTURA *et al.*, 2004; RASTER *et al.*, 2011), e em mais de 700 artigos este tema já foi discutido. A experiência do oftalmologista é de extrema importância na hora de fazer o mapeamento funcional, dessa forma tornando a avaliação topográfica muito subjetiva (HOOD *et al.*, 2003). O método sugerido por nós pode ser usado como uma alternativa objetiva da avaliação subjetiva convencional do mfERG.

A aplicação da avaliação sinal-ruído deste trabalho no programa que gera os registros do mfERG (VERIS System ou Retiscan ROLAND) podem auxiliar os oftalmologistas e pesquisadores a evitar erros na identificação do registro com resposta normal, resposta diminuída ou ruído. Outra aplicabilidade dos resultados após análise SNR é na programação dos mapas de densidade de resposta. E este tema já é bastante explorado na literatura, uma vez que os mapas de densidade de



resposta podem gerar, de maneira errônea, picos centrais em respostas sem sinal (HOOD *et al.*, 2003, 2008).

Após a avaliação da razão sinal-ruído, foi possível identificar trechos relacionados à ausência de resposta e dessa forma, foi possível programar os mapas de densidade de resposta com estas informações, ajustando a densidade zero na densidade de resposta do hexágono se nenhuma resposta.

A principal contribuição deste trabalho é a descrição de um método para estimar a extensão da SNR capaz de classificar respostas desconhecidas do mfERG. Hood e Li (1997) e Wright *et al.* (2008), propuseram outros métodos para medir a diferença entre registros do mfERG e o *template* estimado dos registros pertencentes ao grupo controle. Quanto maior for a diferença entre ambos os registros, menor a probabilidade de que o registro contenha o sinal. Seelinger *et al.* (1998), sugerem diferenças no tempo implícito do componente P1 entre os *templates* e os registros desconhecidos. Estes autores encontraram altos desvios no tempo implícito nos registros obtidos de pacientes com retinite pigmentosa.

Os valores absolutos da SNR podem ser diferentes quando comparamos diferentes dados entre diferentes processos. Neste trabalho os registros foram realizados usando-se o eletródio Burian-Allen e estímulo contendo 103 hexágonos, entretanto, é importante saber que outros registros e parâmetros de estimulação podem mudar os valores absolutos da faixa limite. Outros trabalhos já descreveram a influencia das diferentes condições experimentais na avaliação sinal-ruído dos registros do eletroretinograma multifocal (KRETSCHMANN *et al.*, 2000).

A aplicação do método aqui desenvolvido auxilia pesquisadores e oftalmologistas a mapear a função retiniana e quantificar o número de registros em cada limite da SNR, dessa forma usar como ferramenta para se obter parâmetros da avaliação seqüencial da história da doença retiniana.

## 6.2 DISCUSSÃO DO OBJETIVO GERAL 2

A cloroquina, antimalárico usado para o tratamento de doenças reumáticas, é um potencial agente causador de perda visual. Mesmo que o mecanismo pelo qual a retinopatia ocorra não esteja bem definido, existe uma grande evidencia de alterações funcionais na retina (ROSENTHAL *et al.*, 1978). O eletroretinograma multifocal é um dos mais novos métodos utilizados para monitorar a função visual após a terapia com uso da cloroquina, mostrando que as áreas centrais e

paracentrais da retina são as mais afetadas pelo uso prolongado da cloroquina (KELLNER *et al.*, 2000, 2006; MATURI *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2005; LYONS & SEVERNS, 2009; XIAOYUN *et al.*, 2010; RASTER *et al.*, 2011). Entretanto, perda visual difusa tem sido relatada (TZEKOV *et al.*, 2004; KELLNER *et al.*, 2006; LYONS & SEVERNS, 2009).

As doses diárias e cumulativas de cloroquina divergem entre os diversos autores (GOLDHARDT *et al.*, 2002; BERTAGNOLIO *et al.*, 2001; SILVA & SILVA; 2009; XIAOYUN *et al.*, 2010). Entretanto, todos esses autores evidenciam a importância de um monitoramento, principalmente depois dos critérios estabelecidos pela Academia America de Oftalmologia e descritos no documento de MARMOR *et al.*, 2011.

GOLDHARDT *et al.* (2002), afirmam que doses diárias inferiores que 6,5 mg/kg e dose cumulativa inferior a 200g, o paciente não necessariamente precisa de um acompanhamento a cada seis meses. Entretanto, o mesmo afirma que o fator mais importante na segurança terapêutica é a dose diária, pois altas doses de cloroquina, como de 250 a 750 mg administradas diariamente durante 3 anos, costumam causar séria toxicidade ocular.

SILVA & SILVA (2009), assentiram as afirmações de GOLDHARDT *et al.* (2002), que o fator mais importante na toxicidade ocular pela cloroquina é a dose diária. Pelo fato de que se a dose diária for mantida em um limiar seguro, não parece haver limite para a duração do tratamento e nem para a dose total cumulativa, não obstante a grande afinidade da cloroquina pelos tecidos pigmentados do olho e sua excreção renal lenta. O mesmo autor também estabelece a necessidade de ajustar a dose para portadores de insuficiência renal. Alertando assim, no manejo destes pacientes, uma estreita interação do oftalmologista com o clínico.

XIAYON *et al.* (2010), enfatizam a importância da dose diária por peso, porém em seus estudos os pacientes possuíam pesos similares e por isso não foi possível ter uma avaliação melhor sobre a influência da dosagem por peso e atenta que o sobrepeso de alguns pacientes pode ser um risco se a dose não for calculada corretamente, pois estes pacientes poderiam ser seriamente superdosados. Concordando com MARMOR *et al.*, 2010 e RODRIGUES, 2009.

MARMOR *et al.* (2011), afirmaram que a maioria dos casos de toxicidade ocorreu em pacientes com o uso de cloroquina por mais de 7 anos ou por doses

cumulativas que excediam 460g e essa quantidade é atingida em 5 anos de uso de cloroquina. Enquanto que BERTAGNOLIO *et al.* (2002), concluíram que uma dose certa ainda não está estabelecida como prejudicial, porém acreditam que uma dose cumulativa maior que 700 g pode ser tóxica, o que corresponderia a 100 mg por dia durante 20 anos. Os mesmos alegaram que sentiram que era aconselhável considerar o risco da cloroquina por seu efeito colateral devido ao seu potencial prognóstico grave. Assim como a importância para determinar quando deve ser interrompido, a dosagem diária e cumulativa segura que pode ser tolerada sem incorrer no risco de desenvolvimento de retinopatia. E afirmam em seus estudos que o regime de dosagem e a dose total de cloroquina associada com o risco de retinopatia são ainda controversos. Além disso, as variações individuais na susceptibilidade para o efeito tóxico de cloroquina também não devem ser desconsiderados, principalmente no que concerne à presença de possíveis mutações no gene *ABCA4* que segundo alguns pesquisadores predispõem ao desenvolvimento de doenças retinianas (TSYBOVSKY *et al.*, 2010).

No Brasil, pacientes com malária recebem baixas doses cumulativas de cloroquina, mas doses diárias relativamente elevadas, dessa forma tornando a malária um modelo para estudar o efeito agudo do uso da cloroquina no sistema visual. Contudo, o efeito de tratamentos contínuos com cloroquina após vários surtos de malária pode ser estudado.

ROSENTHAL *et al.* (1978), realizaram uma pesquisa de grande importância. Neste trabalho foi realizado uma avaliação histológica da retina de macacos expostos à cloroquina, e observou-se que ocorreram primariamente mudanças nas estruturas da retina, antes mesmo que mudanças do fundo de olho fossem detectadas pelo eletrorretinograma. As primeiras mudanças que ocorreram foram: degeneração das células ganglionares, após uma semana do uso da cloroquina, ou seja, uso agudo. A exposição por um longo período à cloroquina causa degeneração dos fotorreceptores e do epitélio pigmentar. Na retina de humanos, foi mostrado que a exposição crônica levou à mudanças histopatológicas, especialmente nas células ganglionares, camada plexiforme interna, camada nuclear interna, fotorreceptores e células pigmentadas da retina.

Achados obtidos com a tomografia de coerência óptica também indicam que o uso prolongado da cloroquina, com sintomas clínicos, causa espessamento parafoveal da camada nuclear externa da retina (KELLNER *et al.*, 2009; XIAOYUN

*et al.*, 2010). Essas mudanças foram observadas na retina externa e na camada de fibras da retina. Além do mais, a presença da malária em si pode interferir no desenvolvimento da retinopatia, no caso de manifestações graves como malária cerebral (ESSUMAN *et al.*, 2010).

O presente estudo é a primeira investigação sobre os efeitos do uso agudo da cloroquina após infecção pela malária usando o mfERG. Vale ressaltar a ausência de indivíduos com malária cerebral ou grave. No mesmo, é possível a comparação com outro trabalho de RASTER *et al.* (2011), que estuda o efeito do uso da cloroquina em pacientes reumáticos avaliados com o mfERG, na mesma região do Brasil, dessa forma excluindo possíveis aspectos ambientais e/ou genéticos.

Apesar dos testes eletrofisiológicos aplicados aos pacientes do Instituto Evandro Chagas infectados pelo *P. vivax*, não mostrarem nenhuma alteração visual, não podemos excluir qualquer tipo de alteração. Haja vista, que o trabalho realizado por ROSENTHAL *et al.* (1978), mostrou que alterações visuais ocorrem mesmo nos estágios iniciais do tratamento por cloroquina, caracterizando o uso agudo da droga.

O eletrorretinograma multifocal é uma técnica promissora para avaliação das perdas visuais causadas pelo uso crônico da cloroquina. Entretanto, existem muitos estudos que mostram uma variedade de resultados sobre a eficácia e confiabilidade dos resultados, principalmente quando se fala sobre o uso agudo deste antimalárico.

RODRIGUES *et al.* (2009), descrevem uma série de técnicas que podem ajudar no rastreamento, porém consideram que não há um teste padrão para detecção precoce. O teste de visão de cores e a retinografia são opcionais e indicados, principalmente, para o diagnóstico diferencial de outras doenças que não estejam associadas ao uso de cloroquina e em estágios iniciais.

Este mesmo autor cita que a angiofluoresceinografia é indicada apenas nos pacientes de alto risco ou com suspeita de retinopatia. O eletrorretinograma multifocal deve ser realizado na fase inicial do tratamento, para a obtenção da resposta basal a ser utilizada como parâmetro nos exames subsequentes. Os testes possivelmente mais sensíveis seriam o eletrorretinograma multifocal (mfERG) e a tomografia de coerência óptica (OCT), no entanto, necessitam de mais estudos sobre sua sensibilidade. E afirmam que por mais que sejam mais indicados ainda não são mais sensíveis que a campimetria visual.

KELLNER *et al.* (2009), em um amplo estudo considerou as técnicas de mfERG, fundoscopia auto-fluorescente, tomografia de coerência óptica de alta resolução úteis em vários estágios da doença. A dificuldade fica em torno do grande número de pacientes que fazem o uso da cloroquina e pela falta de especificação dos sintomas iniciais. Os autores descreveram em seus resultados que os pacientes com retinopatia cloroquinica testados com o sd-OCT (tomografia de coerência óptica de domínio espectral) mostraram perda ou ausência de fotorreceptores. Entretanto, com o mfERG puderam observar alteração estrutural na retina correspondente a disfunção dos fotorreceptores e um aumento da concentração de lipofucsina e decréscimo da concentração de melanina. Em sua avaliação prospectiva da espessura da camada nuclear externa, durante o tratamento, pode fornecer uma suspeita mesmo antes do aparecimento da degeneração retiniana, o que se torna importante já que nem todas as técnicas são facilmente encontradas. Os autores chamam atenção para o teste sd-OCT, pois em alguns casos essa técnica detectou algumas áreas que nas outras técnicas passaram despercebidos, porém conclui que os exames devem ter uma grande correlação, pois um auxilia o outro no diagnóstico de retinopatia por cloroquina.

XIAOYUN *et al.* (2010), utilizaram o campo visual de Humphrey, estratégia 10-2 e o mfERG. E afirmam que o Humphrey 10-2 é o mais sensível dentre outros testes que levam em consideração o campo visual, por detectar o escotoma mais cedo, sendo essa manifestação primária a maculopatia.

MARMOR *et al.* (2011), salientaram em seu estudo que uma série de testes pode objetivamente documentar os danos anatômico ou funcional do uso da cloroquina, e estes podem ser extremamente úteis para verificar e quantificar a toxicidade. O mesmo enfatiza que os novos testes como mfERG e OCT podem ser mais sensíveis que testes de campo. E recomenda a utilização de um desses testes mais específicos. Adicionalmente, refere que o ERG de campo total, amplamente usado para detectar anormalidades na forma mais avançada de toxicidade, não é sensível para detectar mudança funcional na mácula. É útil, no entanto, na avaliação de pacientes com toxicidade manifestada para avaliar a gravidade que o dano pode causar.

Finalizando, MARMOR *et al.* (2011), ressaltam a importância dos testes campimetria estática de Humphrey, estratégia 10-2, sd-OCT e mfERG estarem presentes nos exames de triagem, por serem mais sensíveis para detecção de

retinopatia por cloroquina em estágios iniciais, defendendo que a utilização dos mesmos oferece uma documentação sensível e objetiva da função visual.

## 7. CONCLUSÕES

---

### 7.1. CONCLUSÕES DO OBJETIVO 1

Baseando-se nos resultados e no que foi proposto no objetivo 1, concluiu-se que foi possível descrever um método confiável que poderá ser utilizado para identificar a razão sinal-ruído (SNR) ótima, e dessa forma classificar respostas eletrorretinográficas de registros obtidos através do eletrorretinograma multifocal (mfERG) como registros com amplitude normal, registros com amplitude diminuída ou registros que não apresentam sinal. Tal método foi validado em um grupo de pacientes com toxoplasmose ocular, pois a lesão cicatricial é bem evidente e possível de ser correlacionada com os achados eletrofisiológicos.

Ainda que a técnica eletrorretinográfica multifocal seja um método relativamente novo de investigação visual, estudos que contribuam para o melhoramento e aperfeiçoamento da eficácia do mesmo devem ser incentivados. O método descrito aqui se destina a auxiliar no diagnóstico neuro-oftalmológico através da estimação dos limites da razão sinal-ruído (SNR) como indicador da qualidade das respostas eletrorretinográficas. É importante salientar que se faz necessário que cada laboratório defina sua rotina de trabalho, uma vez que presença de variantes individuais, geográficas e até mesmo culturais possam influenciar os resultados.

### 7.2. CONCLUSÕES DO OBJETIVO 2

No que concerne ao objetivo 2, e após a análise dos resultados foi possível concluir que o uso agudo da cloroquina, como forma de tratamento, em pacientes infectados pelo *P. vivax* não causa perda visual que seja detectada pelo eletrorretinograma multifocal. Haja vista que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na amplitude e no tempo implícito dos componentes N1, P1 e N2 dos anéis concêntricos, quando comparados ao grupo controle saudável. Mesmo em pacientes que foram infectados mais de uma vez pelo *P. vivax*, e consequentemente, receberam mais de um tratamento, pois se observaram que não houve correlação entre a amplitude dos componentes N1, P1 e N2 com a dose cumulativa e com a dose cumulativa por peso.

Entretanto, não podemos descartar que o componente estrutural da retina destes pacientes não tenha sofrido algum tipo dano pela exposição ao antimalárico, principalmente nos tecidos melanotrópicos, uma vez que há relatos na literatura de

alterações morfológicas que não foram detectadas por exames eletrorretinográficos, por exemplo.

Ambos os temas discutidos são bastante complexos, e por isso, conclui-se que mais estudos são necessários para se elucidar os pontos cruciais para seu entendimento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEIXO, A. L. Q. C.; BENCHIMOL, E. I.; NEVES, E. S.; SILVA, C. S. P.; COURA, L. C.; AMENDOEIRA, M. R. R. Frequência de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular em uma população rural do estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 42 (2), p. 165 – 169, 2009.
- ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian, Amazon. **Emerg. Infect. Dis.**, vol. 16 (10), p. 1611 – 1614, 2010.
- ALKADI, H. O. Antimalarial drug toxicity: a review. **Chemotherapy.**, vol. 53, p. 385 – 391, 2007.
- ALVES, J. M.; MAGALHÃES, V.; MATOS, M. A. G. Retinocoroidite toxoplásmica em pacientes com AIDS e neurotoxoplasmose. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 73 (2), p. 150 – 154, 2010.
- ANTUNES, D. A. L.; CAVALCANTI, H. D.; LEAL, D.; SANTANA, H. V.; SANTOS, R. A. V.; SANTOS, L. P. F. Alterações da camada de fibras nervosas da retina em usuários crônicos de cloroquina. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 68 (2), p. 195 – 197, 2005.
- ARANA, L. A.; ARANA, J.; HASIMOTO, A. R.; SCHIRR, G.; ARANA, E.; BECKHAUSER, A. P.; ARAÚJO, F. SKARE, T. Tomografia de coerência óptica na avaliação da camada das fibras nervosas peripapilar nos usuários de cloroquina. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 73 (1), p. 28 – 32, 2010.
- BASSAT, Q. The use of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. **PloS. Negl. Trop. Dis.**, vol. 5 (12), p. 1 – 10, 2011.
- BEARE, N. A. V.; SOUTHERN, C.; KAYIRA, K.; TAYLOR, T. E.; HARDING, S. P. Visual outcomes in children in Malawi following retinopathy of severe malaria. **Br. J. Ophthalmol.**, vol. 88, p. 321 – 324, 2004.
- BEARE, N. A. V.; TAYLOR, T. E.; HARDING, S. P.; LEWALLEN, S.; MOLYNEUX, M. E. Malaria retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 75 (5), p. 790 – 797, 2006.
- BEARE, N. A. V.; GLOVER, S. J.; MOLYNEUX, M. E. Malaria retinopathy in cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 80 (2), p. 171, 2009.
- BEARE, N. A. V.; LEWALLEN, S.; TAYLOR, T. E.; MOLYNEUX, M. E. Redefining cerebral malaria by including malaria retinopathy. **Future Microbiol.**, vol. 6 (3), p. 349 – 355, 2011.
- BEREZOVSKY, A.; SALOMÃO, S. R.; PEREIRA, J. M.; SACAI, P. Y.; CHOJNIK, M. M. M. Eletrorretinograma multifocal em pacientes tratados com tamoxifeno em baixa dosagem. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 67 (4), p. 631 – 635, 2004.

BERTAGNOLIO, S.; TACCONELLI, E.; CAMILLI, G.; TUMBARELLO, M. Case report: retinopathy after malaria prophylaxis with chloroquine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 65 (5), p. 637 – 638, 2001.

BOIVIN, M. J.; GLADSTONE, M. J.; VOKHIWA, M.; BIRBECK, G. L.; MAGEN, J. G.; PAGE, C.; SEMRUD-CLIKEMAN, M.; KAUYE, F.; TAYLOR, T. E. Developmental outcomes in Malawian children with retinopathy-positive cerebral malaria. **Trop. Med. Int. Health.**, vol. 16 (3), p. 263 – 271, 2011.

BONFIOLLI, A. A.; OREFICE, F. Toxoplasmosis. **Semin. Ophthalmol.**, vol. 20 (3), p. 129 – 141, 2005.

BOSCH-DRIESSEN, L. H.; PLAISIER, M. B.; STILMA, J. S.; VAN DER LELIJ, A.; ROTHOVA, A. Reactivations of ocular toxoplasmosis after cataract extraction. **Am. Acad. Ophthalmol.**, vol. 109 (1), p. 41 – 45, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias. Aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle: guia de bolso.** Brasília, 220 p. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de terapêutica da malária.** Brasília, 104 p. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.** Brasília, 320 p. 2005. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prática de tratamento da malária no Brasil.** Brasília, 36 p. 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

CAETANO, J. A.; LIMA, M. A.; SILVA, D. A.; NASCIMENTO, J. C. Repercussão da visão monocular após trauma ocular. **Rev. Bras. Enf.**, vol. 64 (5), p. 845 – 848, 2011.

CAMARGO, E. P. Doenças Tropicais. **Estudos Avançados**, vol. 22 (64), p. 95 – 110, 2008.

CARMO, E. L.; ALMEIDA, E. F.; BICHARA, C. N.; PÓVOA, M. M. Pesquisa de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em fluidos intra-oculares (humor vítreo e humor aquoso) de pacientes com toxoplasmose ocular, na cidade de Belém, PA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 38 (1), p. 77 – 79, 2005.

CARVALHO, A. C.; SOUZA, G. S.; GOMES, B. D.; LIMA, L. J. B.; VENTURA, D. F.; SILVEIRA, L. C. L. investigação eletrofisiológica multifocal de sujeitos com toxoplasmose ocular. **Rev. Par. Med.**, vol. 23 (1), p. 1 – 8, 2009.

CARVALHO, A. C.; SCHWARZ, M.; SOUZA, G. S. S.; GOMES, B. D.; ROSA, A. A. M. R.; VENTURA, A. M. R. S.; SOUZA, J. M. S.; SILVEIRA, L. C. L.; KREMERS, J.

Multifocal electroretinography after high dose chloroquine therapy for malaria. **J. Ophthalmol. Vis. Res.**, vol. 8 (3), p. 193 – 198, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Parasites – Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>. Acesso em: 10 jan. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Neglected parasitic infections in the United States – Toxoplasmosis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/npi.html>. Acesso em: 25 jan. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Malaria. Disponível em: <http://www.sds.gov/malaria>. Acesso em: 06 fev. 2014.

CHAPPELOW, A. V.; MARMOR, M. F. Effects of pre-adaptation conditions and ambient room lighting on the multifocal ERG. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 105, p. 23 – 31, 2002.

CHHABRA, M. S.; PRAKASH, G.; VASHISHT, N.; GARG, S. P. Retinitis pigmentosa and congenital toxoplasmosis: a rare coexistence. **Ind. J. Ophthalmol.**, vol. 55, p. 303 – 304, 2007.

CHIANG, E.; GOLDSTEIN, D. A.; SHAPIRO, M. J.; METS, M. B. Branch retinal artery occlusion caused by toxoplasmosis in an adolescent. **Case Rep. Ophthalmol.**, vol. 3, p. 333 – 338, 2012.

COHEN, M. J. Hanseníase ocular: uma abordagem histórica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 72 (5), p. 728 – 733, 2009.

COMMODARO, A. G.; PERON, J. P. S.; LOPES, C. T.; ARSLANIAN, C.; BELFORT JR., R.; RIZZO, L. V.; BUENO, V. Evaluation of experimental autoimmune uveitis in mice treated with FTY720. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 51 (5), p. 2568 – 2574, 2010.

CORDEIRO, C. A.; MOREIRA, P. R.; DUTRA, W. O.; YOUNG, L.; CAMPOS, W. R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA JR., A. L. Imunologia da retinocoroidite toxoplásmica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 73 (6), p. 548 – 551, 2010.

COSTA, M. S.; GALLO, M. E. N.; NERY, J. A. C.; BENCHIMOL, E. Avaliação oftalmológica em hanseníase multibacilar. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 62 (6), p. 701 – 703, 1999.

DAWSON, W. W.; TRICK, G. L.; LITZKOW, C. A. Improved electrode for eletrorretinography. **Inv. Ophthalm. & Vis. Sci.**, vol. 18, p. 988 – 991, 1979.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – na overview. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, vol. 22, pag. 88 – 92, 1991.

- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, vol. 11 (2), p. 267 – 299, 1998.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Vet. Parasitol.**, vol. 117, p. 229 – 234, 2003.
- DIMANTAS, M. A. P.; LOWDER, C.; MUCCIOLI, C. Uveítes anteriores associadas a doenças sistêmicas. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 66, p. 235 – 238, 2003.
- EASTERBROOK, M. Ocular effects and safety of antimalarial agents. **The J. Med.**, vol. 85, p. 23 – 29, 1988.
- ESSUMAN, V. A.; NTIM-AMPONSAH, C. T.; ASTRUP, B. S.; ADJEI, G. O.; KURTZHALS, J. A. L.; NDANU, T. A.; GOKA, B. Retinopathy in severe malaria in Ghanaian children - overlap between fundus changes in cerebral and non-cerebral malaria. **Malaria J.**, vol. 9, p. 232 – 237, 2010.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Vet. Parasitol.**, vol. 86, p. 155 – 171, 1999.
- FERGUSON, D. J. P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int. J. Parasitol.**, vol. 34, p. 347 – 360, 2004.
- FERON, R. J.; KLAREN, V. N. A.; WIERENGA, E. A.; VERJANS, G. M. G. M.; KIJLSTRA, A. Characterization of *Toxoplasma gondii*-specific T cells recovered from vitreous fluid of patients with ocular toxoplasmosis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 42 (13), p. 3228 – 3232, 2001.
- FERREIRA, A. I. C.; BRANDÃO DE MATOS, C. C.; FREDERICO, F. B.; MEIRA, C. S.; ALMEIDA, G. C.; NAKASHIMA, F.; BERNARDO, C. R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MATTOS, L. C. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. **Epidemiol. Infect.**, vol. 142, p. 142 – 148, 2014.
- FERRERAS, A.; PINILLA, I. ABECIA, E. PAJARÍN, A. B.; HONRUBIA, F. M. Retinal toxicity following chloroquine therapy. **Arch. Soc. Esp. Oftalmol.**, vol. 82, p. 103 – 108, 2007.
- FURTADO, J. M.; ASHANDER, L. M.; MOHS, K.; CHIPPS, T. J.; APPUKUTTAN, B.; SMITH, J. R. *Toxoplasma gondii* migration within and infection of human retina. **Plos One**, vol. 8 (2), p. 1 – 6, 2013.
- 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. **Pan. Am. J. Public Health.**, vol. 6 (3), p. 157 – 163, 1999.

GARCIA, E. A.; CONDE, C. K. Cisticercose intraocular bilateral: relato de um caso. **Acta Med. Misericordiae**, vol. 1 (1), 1998.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFONALO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, vol. 2 (8), p. 1 – 7, 2008.

GOLDHARDT, R.; CORREA, Z. M. S.; EICHENBERG, M. C.; MARCON, I. M.; VACCARO-FILHO, A. Avaliação da toxicidade ocular por derivados da 4-aminoquinolona. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 65, p. 645 – 649, 2002.

GORMLEY, P. D.; PAVESIO, C. E.; LUTHERT, P.; LIGHTMAN, S. Retinochoroiditis is induced by oral administration of *Toxoplasma gondii* cysts in the hamster model. **Exp. Eye Res.**, vol. 68, p. 657 – 661, 1999.

GOUVEIA, E. B.; MORALES, M. S. A.; GOUVEIA, G. B.; LOURENZI, V. P. Toxicidade ocular por derivados da 4-aminoquinolona. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 70 (6), p. 1046 – 1051, 2007.

GRILL-SPECTOR, K; MALACH, R. The human visual cortex. **Annu. Rev. Neurosci.**, vol. 27, p. 649 – 677, 2004.

GUEx-CROSIER, Y. Update on the treatment of ocular toxoplasmosis. **Int. J. Med. Sci.**, vol. 6, p. 140 – 142, 2009.

HAFIDI, Z.; DAOUDI, R. Chorioretinal toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med.**, vol. 370 (4), p. 361, 2014.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. **Am. Soc. Hematol.**, p. 87 – 93, 2009.

HASSENE, A.; VITAL, A.; ANGHEL, A.; GUEZ, S.; SERIES, C. Acute acquired toxoplasmosis presenting as polymyositis and chorioretinitis in immunocompetent patient. **Joint. Bone spine**, vol. 75, p. 603 – 605, 2008.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Europ. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, vol. 8, p. 634-640, 2002.

HOBBS, H. E., SORSBY, A.; FREEDMAN, A. Retinopathy following chloroquine therapy. **The Lancet**, p. 478 – 480, 1956.

HOOD, D. C. Assessing retinal function with the multifocal technique. **Prog. Retinal and Eye Res.**, vol. 19 (5), p. 607 – 646, 2000.

HOOD, D. C.; HOLOPIGIAN, K.; GREENSTEIN, V.; SEIPLE, W.; LI, J.; SUTTER, E. E.; CARR, R. E. Assessment of local retinal function in patients with retinitis pigmentosa using the multifocal ERG technique. **Vision Res.**, vol. 38 (10), p. 163 – 179, 1998.

HOOD, D. C.; GREENSTEIN, V.; FRISHMAN, L.; HOLOPIGIAN, K. VISWANATHAN, S.; SEIPLE, W.; AHMED, J.; ROBSON, J. G. Identifying inner retinal contributions to the human multifocal ERG. **Vis. Res.**, vol. 39, p. 2285 – 2291, 1999.

HOOD, D. C.; FRISHMAN, L. J.; SASZIK, S.; VISWANATHAN, S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 43 (5), p. 1673 – 1685, 2002.

HOOD, D. C.; ODEL, J. G.; CHEN, C. S.; WINN, B. J. The multifocal electrorretinogram. **J. Neuro-Ophthalmol.**, vol. 23 (3), p. 225 – 235, 2003.

HOOD, D. C.; BACH, M.; BRIGELL, M.; KEATING, D.; KONDO, M.; LYONS, J. S.; PALMOWSKI-WOLFE, A. M. ISCEV guidelines for clinical multifocal electrorretinography (2007 edition). **Doc. Ophthalmol.**, vol. 116, p. 1 – 11, 2008.

HUANG, H.; YAMAZAKI, H.; KAWABATA, H.; NINOMIYA, T.; ADACHI-USAMI, E. Multifocal electrorretinogram in multiple evanescent white dot syndrome. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 92, p. 301 – 309, 1997.

JENUM, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K. K.; KAPPERRUD, G.; WHITELAW, A.; ESKILD, A.; ENG, JAN. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. **Am. Soc. Microbiol.**, vol. 36 (10), p. 2900 – 2906, 1998.

JONES, J. L.; MUCCIOLI, C.; BELFORT JR., R.; HOLLAND, G. N.; ROBERTS, J. M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, vol. 12 (4), p. 582 – 587, 2006.

JOSHI, V. S.; MAUDE, R. J.; REINHARDT, J. M.; TANG, L.; GARVIN, M. K.; SAYEED, A. A.; GHOSE, A.; HASSAN, M. U.; ABRAMOFF, M. D. Automated detection of malarial retinopathy-associated retinal hemorrhages. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 53 (10), p. 6582 – 6588, 2012.

KALIA, S.; DUTZ, J. P. New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. **Dermatol. Ther.**, vol. 20 (4), p. 160 – 174, jul./aug. 2007.

KALIAPERUMAL, S.; RAO, V. A.; PARIJA, S. C. Cysticercosis of the eye in South India: a case series. **Indian J. Med. Microbiol.**, vol. 23 (4), p. 227 – 230, 2005.

KAMATH, Y. S.; RATHINAM, S. R.; KAWALI, A. Ocular toxoplasmosis associated with scleritis. **Indian J. Ophthalmol.**, vol. 61 (6), p. 295 – 297, 2013.

KARUNAJEEWA, H. A.; IIET, K. F.; MUELLER, I.; SIBA, P.; LAW, I.; PAGE-SHARP, M.; LIN, E.; LAMMEY, J.; BATTY, K. T.; DAVIS, T. M. E. Pharmacokinetics and efficacy of piperazine and chloroquine in Melanesian children with uncomplicated malaria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol. 52 (1), p. 237 – 243, 2008.

KEATING, D.; PARKS, S.; EVANS, A. Technical aspects of multifocal ERG recording. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 100, p. 77 – 98, 2000.

KELLNER, U.; KRAUS, H.; FOERSTER, M. H. Multifocal ERG in chloroquine retinopathy: regional variance of retinal dysfunction. **Graefe's Arch. Clin Exp. Ophthalmol.**, vol. 238, p. 94 – 97, 2000.

KELLNER, U. RENNER, A. B.; TILLACK, H. Fundus autofluorescence and mfERG for early detection of retinal alterations in patients using chloroquine/hydroxychloroquine. **Inv. Ophthalmol. & Vis. Scien.**, vol. 47, p. 3531 – 3538, 2006.

KELLNER, S.; WEINITZ, S.; KELLNER, U. Spectral domain optical coherence tomography detects early stages of chloroquine retinopathy similar to multifocal electroretinography, fundus autofluorescence and near-infrared autofluorescence. **Br. J. Ophthalmol.**, vol. 93, p. 1444 – 1447, 2009.

KRETSCHMANN, U.; BOCK, M.; GOCKELN, R.; ZRENNER, E. Clinical applications of multifocal electroretinography. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 100, p. 99 – 113, 2000.

LACAVA, A. C. Complicações oculares da terapêutica com a cloroquina e derivados. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 73 (4), p. 384 – 389, 2010.

LAI, T. Y. Y.; CHAN, W.; LI, H.; LAI, R. Y.; LAM, D. S. C. Multifocal electroretinographic changes in patients receiving hydroxychloroquine therapy. **Am. J. Ophthalmol.**, vol. 140, p. 794 – 807, 2005.

LAI, T. Y. Y.; CHAN, W.; LAI, R. Y. K.; NGAI, J. W. S.; LI, H.; LAM, D. S. C. The clinical applications of multifocal electroretinography: a systematic review. **Surv. Ophthalmol.**, vol. 52 (1), p. 32 – 96, 2007.

LYONS, J. S.; SEVERN, L. Using multifocal ERG ring ratios to detect and follow plaquenil retinal toxicity: a review. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 118, p. 29 – 36, 2009.

LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque Amazônico.** Belém: Cejup, 1997.

LEE, B. L. Paths to colour in the retina. **Clin. Exp. Optom.**, vol 87, 2004.

LEE, J. H.; CHIN, H. S.; CHUNG, M.; MOON, Y. S. Case report: retinal hemorrhage in *Plasmodium vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 82 (2), p. 219 – 222, 2010.

LEWALLEN, S.; BROZAN, R. N.; BEARE, N. A.; HARDING, S. P.; MOLYNEUX, M. E.; TAYLOR, T. E. Using malaria retinopathy to improve the classification of children with cerebral malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, vol. 102 (11), p. 1089 – 1094, 2008.

MACCORMICK, I. J. C.; BEARE, N. A.V.; TAYLOR, T. E.; BARRERA, V.; WHITE, V. A.; HISCOTT, P.; MOLYNEUX, M. E.; DHILLON, B.; HARDING, S. P. Cerebral malaria in children: using the retina to study the brain. **Brain J. Neurol.**, p. 1 – 24, 2014.

MADALENA, B. V.; OSHIMA, A.; SERRACARBASSA, P. D. Tela de Amsler e campo visual no rastreamento da retinopatia por cloroquina. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 75 (3), p. 170 – 173, 2012.

MARMOR, M. F.; CHAPPELOW, A. V.; LUO, G. Recognition of small stimulus sreen masks using the multifocal ERG. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 104, p. 277 – 286, 2002 (A)

MARMOR, M. F.; CARR, R. E.; EASTERBROOK, M.; FARJO, A. A.; MIELER, W. F. Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. **Ophthalmology**, vol. 109, p. 1377 – 1382, 2002 (B)

MARMOR, M. F.; HOLDER, G. E.; SEELIGER, M. W.; YAMAMOTO, S. Standard for clinical electrorretinography (2004 update). **Doc. Ophthalmol.**, vol. 108, p. 107 – 114, 2004.

MARMOR, M. F.; FULTON, A. B.; HOLDER, G. E.; MIYAKE, Y.; BRIGELL, M.; BACH, M. ISCEV standard for full-field clinical electrorretinography (2008 update). **Doc. Ophthalmol.**, vol. 118, p. 69 – 77, 2009.

MARMOR, M. F.; KELLNER, U., LAI, T. Y. Y.; LYONS, J. S.; MIELER, W. F. Revised recommendations on screening for chloroquine and hidroxychloroquine retinopathy. **Ophthalmology**, vol. 118 (2), p. 415 – 422, 2011.

MATURI, R. K.; YU, M.; WELEBER, R. G. Multifocal electrorretinographic evaluation of long-term hydroxychloroquine users. **Arch. Ophthalmol.**, vol. 122, p. 973 – 981, 2004.

MONNET, D.; AVEROUS, K.; DELAIR, E.; BRÉZIN, A. P. Optical coherence tomography in ocular toxoplasmosis. **Int. J. Med. Sci.**, vol. 6 (3), p. 137 – 138, 2009.

MOORE, B. R.; PAGE-SHARP, M.; STONEY, J. R.; ILLET, K. F.; JAGO, J. D.; BATTY, K. T. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and allometric scalling os chloroquine in a murine malaria model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, vol. 55 (8), p. 3899 – 3907, 2011.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JR., P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento de artrite reumatóide. **Rev. Bras. Reumatol.**, vol. 52 (2), p. 135 – 174, 2012.

NEBBIOSO, M.; GRENGA, R.; KARAVITIS, P. Early detection of macular changes with multifocal ERG in patients on antimalarial drug therapy. **J. Ophthalmol. Pharmacol. Therap.**, vol. 25 (3), p. 249 – 258, 2009.

NETO, L. B.; MESQUITA, A. S. Maculopatia tóxica por antimaláricos – detecção pela tomografia óptica espectral de alta resolução: relato de caso. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 72 (5), p. 710 – 714, 2009.



NÓBREGA, M. J.; ROSA, E. L. Toxoplasmosis retinochoroiditis after photodynamic therapy and intravitreal triamcinolone for a supposed choroidal neovascularization: a case report. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 70 (1), p. 157 – 160, 2007.

NOROSE, K.; AOSAI, F.; MIZOTA, A.; YAMAMOTO, S.; MUM, H.; YANO, A. Deterioration of visual function as examined by electrorretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected INF- $\gamma$ -knockout mice. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 46 (1), p. 317 – 321, 2005.

OYAMADA, M. K.; DOTTO, P. F.; ABDALLA, M. Fatores técnicos intervenientes na realização do exame de eletrorretinograma multifocal (ERGmf). **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 70 (4), p. 713 – 717, 2007.

POLLITO, P. A. Z.; TOMAZELLO-FILHO, M. *Cinchona amazônica* Stand1. (Rubiaceae) no estado do Acre, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi.** vol. 1, n. 1, p. 9 – 18, 2006.

POSTELS, D. G.; BIRBECK, G. L.; Children with retinopathy-negative cerebral malaria: a pathophysiological puzzle. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, vol. 30 (11), p. 953 – 956, 2011.

PRATA, J. A.; PRATA JR., J. A.; CORREIA, D.; PRATA, A. R. Alterações oculares na Doença de Chagas crônica: comprovação na região endêmica de Água Comprida (MG). **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 63 (6), p. 445 – 448, 2000.

RASTER, M.; HORN, F.; JUNEMANN, A.; ROSA, A. A. M.; SOUZA, G. S.; GOMES, B. D.; LIMA, M. G.; SILVEIRA, L. C. L.; KREMERS, J. Retinal disorders in northern Brazilian patients treated with chloroquine assessed by multifocal ERG. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 122, p. 77 – 86, 2011.

RODRIGUES, L. D.; SHINJO, S. K.; OYAMADA, M. K.; SERRACARBASSA, P. D.; TAKAHASHI, W. Y.; BORBA, E. F.; BONFÁ, E. S. D. O.; NAKASHIMA, Y. Métodos diagnósticos para retinopatia induzida pelo difosfato de cloroquina nos portadores de lúpus eritematoso sistêmico. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 72 (3), p. 313 – 320, 2009.

ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **J. Exp. Biol.**, vol. 206, p. 3735 – 3744, 2003.

RYNES, R. I. Antimalarial drugs in the treatment of rheumatological diseases. **Brit. J. Rheumatol.**, vol. 36 (7), p. 799 – 805, 1997.

SABBATANI, S.; FIORINO, S.; MANFREDI, R. The emerge malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? **Braz. J. infect. Dis.**, vol. 14 (3), p. 299 – 309, 2010.

SATO, E. I.; BONFÁ, E. D.; COSTALLAT L. T. L.; SILVA, N. A.; BRENOL, J. C. T.; SANTIAGO, M. B.; SZAJUBOK, J. C. M.; RACHID FILHO, A.; BARROS, R. T.; VASCONCELOS, M. Consenso brasileiro para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev. Bras. Reumatol.**, vol. 42 (6), p. 362 – 370, 2002.

SAYEED, A. A.; MAUDE, R. J.; HASAN, M. U.; MOHAMMED, N.; HOQUE, M. G.; DONDORP, A. M.; FAIZ, M. A. Malarial retinopathy in Bangladeshi adults. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 84 (1), p. 141 – 147, 2011.

SCHÉMANN, J. F.; DOUMBBO, O.; MALVY, D.; TRAORE, L.; KONE, A.; SIDIBE, T.; KEITA, M. Ocular lesions associated with malaria in children in Mali. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 67 (1), p. 61 – 63, 2002.

SCHIMITZEK, T.; BACH, M. The influence of luminance on the multifocal ERG. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 113, p. 187 – 192, 2006.

SEELIGER, M. W.; KRETSCHMANN, U. H.; APFELSTED-SYLLA, E.; ZRENNER, E. Implicit time topography of multifocal electroretinograms. **Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.**, vol. 39 (5), p. 718 – 723, 1998.

SILVA, N. A.; SILVA, F. A. Maculopatia tóxica por cloroquina. **Rev. Bras. Oftalmol.**, vol 68 (3), p. 161 – 167, 2009.

SILVA, P. R. M.; SILVA, K. L. T.; FILHO, P. G.; BARANDAS, J. F.; PEREIRA, G. C. Malária ocular: estudo histopatológico experimental das alterações coriorretinianas. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 66, p. 305 – 309, 2003.

SILVEIRA, L. C. L.; SAITO, C. A.; LEE, B. B.; KREMERS, J.; DA SILVA FILHO, M.; KILAVIK, B. E.; YAMADA, E. S.; PERRY, V. H. Morphology and physiology of primate M- and P-cells. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 144, p. 21 – 46, 2004.

SUTTER, E. E. The interpretation of multifocal binary kernels. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 100, p. 49 – 75, 2000.

SUTTER, E. E.; TRAN, D. The field topography of ERG components in man-I. The photopic luminance response. **Vision Res.**, vol. 32 (3), p. 433 – 446, 1992.

TANDON, R.; SIHOTA, R.; DADA, T.; VERMA, L. Optic neuritis following albendazole therapy for orbital cysticercosis. **Australian New Zealand J. Ophthalmol.**, vol. 26, p. 339 – 341, 1998.

TEDESCO, R. C.; VITOR, R. W. A.; BRANDÃO, G. P.; CALABRESE, K. S. Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. **Micron 38**, vol. 38, p. 729 – 733, 2007.

TEMPORINI, E. R.; KARA-JOSÉ, N. A perda da visão – estratégias de prevenção. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 67 (4), p. 597 – 601, 2004.

TOOTELL, R. B. H.; DALE, A. M.; SERENO, M. I.; MALACH, R. New images from human visual cortex. **Trends Neurosci.**, vol. 19, p. 481 – 849, 1996.

TORIBIO, R. C.; ALVAREZ, R. R. A.; MENDES, G. F.; SOUZA, A. L. B. Alterações oculares e incapacidade visual de pacientes com hanseníase – um estudo no Distrito federal. **An. Bras. Dermatol.**, vol. 76 (5), p. 543 – 550, 2001.

TRACY, J.B.; WEBSTER JR., L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN A.G.; LIMBIRD L.E., eds. Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. McGraw-Hill Companies, p. 987 – 108, 1996.

TSYBOVSKY, Y.; MOLDAY, R. S.; PALCZEWSKI, K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. **Adv. Exp. Med. Biol.**, vol. 703, p. 105 – 125, 2010.

TZEKOV, R. T.; GERTH, C.; WERNER, J. S. Senescence of human multifocal electrorretinogram components: a localized approach. **Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, vol. 242, p. 549 – 560, 2004.

VALLOCHI, A.L.; NAKAMURA, M. V.; SCHLESINGER, D.; MARTINS, M.C.; SILVEIRA, C., BELFORT JR., R.; RIZZO, L. V. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. **Scand. J. Immunol.**, vol. 55, p. 324 – 328, 2002.

VENTURA, D. F.; SILVEIRA, L. C. L.; NISHI, M.; COSTA, M. F.; GUALTIERI, M.; SANTOS, R. M. A.; PINTO, C. T.; MOURA, A. L. A.; SAKURADA, C.; SAUMA, M. F. L. C.; SOUZA, J. M. Color vision loss in patients treated with chloroquine. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 66, p. 9 – 15, 2003.

VENTURA, D. F.; COSTA, M. T. V.; COSTA, M. F.; BEREZOVSKY, A.; SALOMÃO, S. R.; SIMÕES, A. L.; LAGO, M.; CANTO PEREIRA, L. H. M.; FARIA, M. A. M.; SOUZA, J. M.; SILVEIRA, L. C. L. Multifocal and full-field electrorretinogram changes associated with color-vision loss in Mercury vapor exposure. **Vis. Neurosc.**, vol 21, p. 421 – 429, 2004.

VIEIRA, F. M. J.; MARTINS, J. E.C. Porfiria cutânea tardia. **An. Bras. Dermatol.**, vol 81 (6), p. 573 – 584, 2006.

VIETH, H.; SALOTTI, S. R. A. Prevenção de lesões oculares em hanseníase. In: DUERKSEN, F.; VIRMOND, M. I. **Cirurgia reparadora e reabilitação em hanseníase**, p. 165 – 174, 1997.

WELLS, T. N. C.; BURROWS, J. N.; BAIRD, K. Targeting the hypnozoite reservoir of Plasmodium vivax: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends Parasitol.**, vol. 23 (3), p. 145 – 151, 2010.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for the treatment of malaria**. 2010.

WRIGHT, T.; NILSSON, J.; GERTH, C.; WESTALL, C. A comparison of signal detection techniques in the multifocal electroretinogram. **Doc. Ophthalmol.**, vol. 117, p. 163 – 170, 2008.

XIAOYUN, M. A.; DONGYI, H. E.; LINPING, H. E. Assessing chloroquine toxicity in RA patients using retinal nerve fibre layer thickness, multifocal electroretinography and visual field test. **Br. J. ophthalmol.**, vol. 94, p. 1632 – 1636, 2010.

YOSHII, M.; YANASHIMA, K.; WAKAGURI, T.; SAKEMI, F.; KIKUCHI, Y.; SUZUKI, S.; OKISAKA, S. A basic investigation of multifocal electroretinogram: reproducibility and effect of luminance. **Jpn. J. ophthalmol.**, vol. 44, p. 122 – 127, 2000.

ZAJDENWEBER, M.; MUCCIOLI, C.; BELFORT JR., R. Acometimento ocular em pacientes com AIDS e toxoplasmose do sistema nervoso central – antes e depois do HAART. **Arq. Bras. Oftalmol.**, vol. 68 (6), p. 773 – 775, 2005.

ZHANG, X. Simultaneously recording local luminance responses, spatial and temporal interactions in the visual system with m-sequences. **Vis. Res.**, vol. 43, p. 1689 – 1698, 2003.

## APÊNDICES

## APÊNDICE 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto de Pesquisa: **ESTUDO DAS RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS RETINIANAS À ESTIMULAÇÃO MULTIFOCAL – DADOS NORMATIVOS PARA O SISTEMA VERIS (EDI) E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TOXOPLASMOSE OCULAR.**

Estamos realizando uma pesquisa que tem como objetivo normatizar dados e investigar as respostas eletrofisiológicas retinianas de pacientes com sorologia positiva para toxoplasmose, que será realizada de acordo com a seguinte metodologia:

Antes do teste serão aplicadas no globo ocular do paciente duas gotas de anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%) e duas gotas de dilatadores de pupila (tropicamida 1% e cloridrato de fenilefrina 10%). Após esse procedimento, aguardaremos dez minutos para que ocorra a dilatação de pelo menos 6 mm da pupila. Em seguida, será instilada metilcelulose na lente do eletródio para proteção da córnea, limpeza do lobo da orelha com gel abrasivo, e colocação do eletródio terra com uma pasta eletrolítica. Então, o estímulo visual será mostrado em uma pequena câmera. Tais procedimentos ocorrerão no Laboratório de Eletrofisiologia Humana do Núcleo de Medicina Tropical, com duração de aproximadamente 1 (uma) hora. Os pacientes não correm o risco de sofrer qualquer tipo de choque elétrico e não há indícios de lesões corneanas causadas pelo uso do eletródio corneano.

Pretendemos obter resultados que nos auxiliem a padronizar dados que são considerados normais, e a partir daí, comparar com os pacientes que apresentam lesões retinianas decorrentes da Toxoplasmose.

A sua participação será de livre e espontânea vontade, informamos também que sua privacidade será assegurada. O senhor (a) tem plena liberdade de interromper sua participação na pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de penalização ou prejuízo. Os indivíduos terão acesso às informações sobre seu estado de saúde visual que o equipamento fornece.

Responsável pela Pesquisa: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira.  
 End.: Av. Generalíssimo Deodoro, 92. Bairro: Umarizal. CEP: 66055-240  
 Fone: 3201-6819 Fone/Fax: 3241-0032 E-mail: luiz@ufpa.br

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, concordo em participar, desde que sejam respeitadas todas as disposições citadas.

Assinatura

Belém, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_.

Nome: \_\_\_\_\_

End.: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**  
**LABORATÓRIO DE NEUROLOGIA TROPICAL**  
**Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal – Belém/PA**

**Anamnese**

**1 - Identificação**

Código: \_\_\_\_\_  
 Procedência: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_  
 Sexo: F ( ) M ( )                              Idade: \_\_\_\_\_ anos  
 Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_              Fone: \_\_\_\_\_  
 Cor: Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Índio ( ) Amarelo ( )  
 Estado Civil: Solteiro ( ) Casado ( ) Viúvo ( ) Divorciado ( )  
 Residência atual: \_\_\_\_\_  
 Residência anterior: \_\_\_\_\_  
 Escolaridade: \_\_\_\_\_  
 Profissão atual: \_\_\_\_\_  
 Profissão anterior: \_\_\_\_\_

**2-Histórico**

Diagnóstico oftalmológico? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Doença retiniana /macular pré-existente? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Doença neurológica? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Doença infecciosa? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Doença Renal? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Medicamentos em uso? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Alergia a medicamentos, medicamentos, pólen? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Fuma? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Ingera bebida alcoólica? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Alterações na pressão arterial? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Predisposição familiar (AMD, Diabetes, Hipertensão? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_

**3 - Histórico da doença**

Já teve malária antes? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_  
 Carga parasitária? \_\_\_\_\_  
 Dia de tratamento? ( )D1 ( )D2 ( )D3 ( )D4 ( )D5 ( )D6 ( )D7 \_\_\_\_\_  
 Qual a via de administração da cloroquina / hidroxiclороquina? \_\_\_\_\_  
 Dose cumulativa (estimada pelo pesquisador): \_\_\_\_\_

**4 – Resultados dos exames oftalmológicos**

Teste de Amsler: \_\_\_\_\_  
 Exame de fundo de olho: \_\_\_\_\_  
 Exame de curvatura da córnea: \_\_\_\_\_

**4 – Dados biométricos**

Peso corporal (kg): \_\_\_\_\_  
 Altura (m): \_\_\_\_\_  
 Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_  
 Circunferência da cintura: \_\_\_\_\_  
 Circunferência do quadril: \_\_\_\_\_  
 Gordura corporal: \_\_\_\_\_

**5 – Dados do teste**

Olho testado? ( ) Olho direito – OD ( ) Olho esquerdo – OE

Impedância do eletródio: Ativo \_\_\_\_\_ Referência \_\_\_\_\_

Artefatos do registro:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Considerações finais: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data e responsável pelo teste



### APÊNDICE 3

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, COMO DISPOSTO NA RESOLUÇÃO CNS 196/96 E NA RESOLUÇÃO CEP Nº 016/2000.**

**Título do Projeto de Pesquisa: Detecção precoce da toxicidade retiniana em pacientes que fizeram uso de Cloroquina / Hidroxicloroquina através da análise de respostas retinianas com eletrorretinografia multifocal.**

Estamos realizando uma pesquisa que objetiva avaliar a função retiniana associada a doses cumulativas de cloroquina / hidroxicloroquina (um remédio para malária e outras doenças sistêmicas), possíveis mutações em um gene, e alguns processos de inflamação induzidas pelo uso dessa medicação; essa pesquisa será realizada de acordo com a seguinte metodologia: os sujeitos serão avaliados através de eletrorretinografia (ou seja, avaliação da atividade elétrica da retina, uma porção do olho) e alguns deles terão amostras de sangue coletadas; essas amostras serão processadas posteriormente em um laboratório, em busca de informações sobre os processos inflamatórios e possíveis mutações no gene em que estamos interessados. Esses dois processos (eletrorretinografia e, possivelmente, coleta de sangue) serão feitos no Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará, durante os meses de janeiro a abril de 2009 e fevereiro à abril de 2010. A sua participação consiste na avaliação de eletrorretinografia: você será submetido a testes eletrofisiológicos (ou seja, medida da atividade elétrica) da retina e, possivelmente, à coleta de uma amostra de sangue. Todos os procedimentos são feitos por profissionais capacitados e sob estritas regulações de segurança, para garantir que você não sofra nenhum dano. Caso haja desconforto, será devido à dilatação da pupila; esse desconforto é bastante breve. Gostaríamos que você soubesse que essa pesquisa é de extrema importância para desvendarmos os danos que a malária e o uso crônico da cloroquina ou da hidroxicloroquina causam na visão; esperamos, com esse trabalho, desenvolver novos métodos de diagnóstico para esses danos.

A sua participação será de livre e espontânea vontade e informamos também que sua privacidade será assegurada e que o senhor (a) tem plena liberdade de interromper a sua participação na pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de penalização ou prejuízo.

---

Responsável pela Pesquisa: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira  
 End: Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – CEP: 66055-240 – Umarizal – Belém – Pará  
 Fone: (91) 32016819      Celular: 99681407      E-mail: luiz@ufpa.br

#### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, concordo em participar da pesquisa, desde que sejam respeitadas todas as disposições citadas.

Belém,.....de.....de 2010.

Nome:

Endereço:

Telefone:

Celular:

E-mail:

## APÊNDICE 4

### 1) Código para calcular a razão sinal ruído como descrito na equação 3 e 4.

**Trace\_Array** é a matrix com 103 linhas e 193 colunas.

**Trace\_Array** representa as informações dos registros. Cada linha representa um dos 103 registros e cada coluna é a voltagem de cada registro

#### **Início:**

```
RMS_Signal = ones(1,103);%RMS_Signal will receive the RMS amplitude of the
signal interval
```

```
RMS_Noise = ones(1,103);%RMS_Noise will receive the RMS amplitude of the noise
interval
```

```
SNR_Signal = ones(1,103);%SNR_Signal will receive the Signal ratio
```

```
SNR_Noise = ones(1,103);%SNR_Noise will receive the Noise ratio
```

```
%Next loop executes the calculus of RMS amplitude of the signal interval
for i = 1:103
```

```
RMS_Signal(1,i) = std(Trace_Array(i,1:78),1);
```

```
end
```

```
%Next loop executes the calculus of RMS amplitude of the noise interval
for Line= 1:103
```

```
RMS_Noise(1,line) = std(Trace_Array(i,116:193),1);
```

```
end
```

```
meanRMS_Noise = mean(RMS_Noise);%Calculus of the average of all Noise RMS
amplitudes
```

```
Next loop executes the calculus of Signal ratio for i = 1:103
```

```
SNR_Signal(1,i) = (RMS_Signal(1,i)/meanRMS)-1;
```

```
end
```

```
%Next loop executes the calculus of Noise ratio for i = 1:103
```

```
SNR_Noise(1,i) = (RMS_Noise(1,i)/meanRMS_Noise)-1;
```

```
end
```

**Fim.**

## 2) Código para realizar a atenuação artificial dos registros

O código abaixo permite a atenuação artificial no nível cinco (5). Para realizar outro nível de atenuação, o usuário deve mudar somente o valor da variação “Att\_level”.

### Início:

```
Att_Rec = ones(103,193);%Attenuated_recording will receive the attenuated waveforms
```

```
Att_level = 5; %Att_level sets the attenuation level to proceed
```

```
%Next loop will create build a matrix of attenuated waveforms as indicated in equation (5) for i = 1:103
```

```
Att_Rec(i,:)=[(Trace_Array(i,1:78)+Att_level*Trace_Array(i,116:193))/(F+1),Trace_Array(i,79:193)];
```

```
end
```

### Fim.

## 3) Código para calcular a distribuição cumulativa da informação do sinal e do ruído pertencente à amostra

No próximo código, **Signal** é a matrix com todos os valores da razão sinal da amostra, e **Noise** é a matrix com todos os valores da razão ruído da amostra.

### Início:

```
interval = 0.05;
```

```
max_Signal = max(Signal); % finding maximum value of Signal ratio
```

```
min_Noise = min(Noise); %finding minimum value of Noise ratio
```

```
x = min_Noise:interval:max_Signal;
```

```
data_Signal = histc(Signal,x);%to calculate the number of elements in each Signal ratio of the interval x_Signal
```

```
data_Noise = histc(Noise,x); %to calculate the number of elements in each Noise ratio of the interval x_Noise
```

```
sum_Signal = sum(data_Signal);
```

```

sum_Noise = sum(data_Noise);

percent_sum_Signal = data_Signal ./sum_Signal;

percent_sum_Noise = data_Noise ./sum_Noise;

%Next loop will calculate the cumulative distribution for signal and noise information
for i = 1:1:length(x)

cum_sum_Signal(i)=sum(percent_sum_Signal(1,i:length(percent_sum_Signal)));

cum_sum_Noise(i)=sum(percent_sum_Noise(1,i:length(percent_sum_Signal)));

end

```

**Fim.**

#### **4) Código para calcular o valor ótimo para diferenciar a informação do sinal da informação do ruído.**

O código abaixo é a continuação do código anterior. The code below is continuing of the previous code. Mantivemos os nomes das variáveis do código anterior no próximo código.

**Início:**

```

x = min_Noise:interval:max_Signal; %Interval including SNR of Noise and Signal
information

FA = cum_sum_Noise; %False positive rate

HIT = cum_sum_Signal; %True positive rate

m = length(FA);

trade_off = ones(1,m);

%Next loop will calculate of the trade-off in the ROC space for i = 1:m

trade_off(1,i) = abs(FA(1,i)-HIT(1,i));

end

counter = 1;

maximum_trade_off = max(trade_off);%Finding the maximum trade-off between hit
and false alarm

```

```
%Next loop will find the position of the maximum_trade_off in 1 the matrix trade_off  
for i = 1:m
```

```
if (maximum_trade_off == trade_off(1,t))
```

```
break
```

```
else
```

```
counter = counter + 1;
```

```
end
```

```
end
```

```
Optimal_SNR = x(1,counter);%Optimal_SNR is the SNR value in the same position  
in x of maximum_trade_off in trade_off.
```

## **ANEXOS**

**ANEXO 1**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

**PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

1. **Protocolo:** N°057/2008-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** ESTUDO DAS RESPOSTAS ELETROFISIOLOGICAS RETINIANAS À ESTIMULAÇÃO MULTIFOCAL – DADOS NORMATIVOS PARA O SISTEMA VERIS (EDI) E APLICAÇÃO CLÍNICA EM TOXOPLASMOSE OCULAR.
3. **Pesquisador Responsável:** Luiz Carlos de Lima Silveira.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFP..
5. **Data de Entrada:** 10/11/2008.
6. **Data do Parecer:** 26/11/2008.

**PARECER**

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 09 de janeiro de 2009.

  
**Profº Teijchi Oikawa**  
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

## ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

### PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº003 /2009-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** DETECCÇÃO PRECOCE DA TOXICIDADE RETINIANA EM PACIENTES QUE FIZERAM USO DE CLOROQUINA/HIDROXICOROQUINA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RESPOSTAS RETINIANAS COM ELETORRETINOGRRAFIA MULTIFOCAL.
3. **Pesquisador Responsável:** Luiz Carlos de Lima Silveira.
4. **Instituição / Unidade:**NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 13/01/2009.
6. **Data do Parecer:** 28/01/2009.

#### PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 28 de março de 2009.

*Teiichi Oikawa*  
**Profº Teiichi Oikawa**  
 Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

*Recebido em 06/09/2012.*  
*Análise finalizada*