



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS POLICLONAIS
PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA UTILIZANDO
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

**MANAUS
2018**

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

**DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS POLICLONAIS
PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA UTILIZANDO
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

Orientador: Dr. Luís André Morais Mariúba

**MANAUS
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G562d Gloria, Juliane Corrêa
Desenvolvimento de anticorpos policlonais para diagnóstico de malária utilizando peptídeos sintéticos / Juliane Corrêa Gloria. 2018
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Malária. 2. peptídeos sintéticos. 3. pLDH. 4. anticorpos policlonais. 5. imunofluorescência. I. Mariúba, Luís André Morais II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

**DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS POLICLONAIS
PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA UTILIZANDO
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

APROVADA EM: ____/____/____

Orientador: Dr. Luís André Morais Mariúba

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba, Presidente
Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ ILMD

Prof. Dr. Helber Abellini Astolpho, Membro
Universidade Estácio de Sá do Amazonas

Prof. Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira, Membro
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

MANAUS – AMAZONAS
2018

*Aos meus pais, **Célia Corrêa e Ezeclério Glória Jr.**,
sem os quais eu não teria aprendido a valorizar o
conhecimento. Eu amo vocês.*

*Dedico também ao meu orientador **Dr. Luís André
Mariúba**, pela confiança, infinita paciência e
excelente orientação.*

*Aos demais **familiares e amigos** que, direta ou
indiretamente, tornaram este momento possível.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser tão maravilhoso, encher meu caminho com pessoas incríveis e me abençoar com a perseverança necessária para encarar os desafios que encontro.

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador, **Dr. Luís André Mariúba**, por estar comigo em todas as etapas deste projeto, pela paciência e confiança. Muito obrigada.

À **Dra. Nara Rubim Mazarakis**, de Biomanguinhos, pelo tempo e esforço dedicado a essa parceria, muito obrigada.

Aos meus pais **Célia e Ezeclério Jr.**, irmãs **Ana Célia e Bruna** e aos demais familiares, por serem meu porto seguro, pelo apoio às escolhas que eu faço e pela torcida por meu sucesso.

Aos meus **amigos da minha cidade natal**, por terem a paciência de continuar a amizade, mesmo frente ao pouco tempo dedicado a eles. Obrigada pelo apoio infinito.

Agradecimentos especiais à **Paula Taquita** e **Edilene Martins**, pela imensa ajuda na escrita desta dissertação, vocês merecem um mundo de felicidade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, **Edilene Martins, Paula Taquita, Késsia Caroline, Fernanda Batalha, Natália Lopes, Diogo Castro, Danielle Farias, Túlio Romão, Yury Chaves, Fhabelle Bezerra, Walter Neves, Felipe Araújo, Lucas Barbosa, Ruth Moura, Alessandra Cavalcante, Jeniffer Clorives, Eliz Farias, Wellington, Danielle, Kerolaine, Ítala, Emmily, Emily Marcele, Aline, João Victor, Karol, Maele, Yasmin, Tati, Gleice, Vani, Dandara, Ingrid, Raiana, Yago, Dana, Jessiane, Manoel, Alice** e a todos os outros. Boa parte disso é graças a vocês, meus ocasionais psicólogos, professores e alunos. Agradeço de coração por toda a ajuda, risos e abraços.

Ao grupo de pesquisa de **Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA)**, em especial ao **Dr. Paulo Nogueira, Dra. Patrícia Orlandi** e **Dra. Stefanie Lopes** por apoiarem este projeto e se disporem a ajudar em quaisquer que seja a atividade proposta.

Ao **Dr. Ricardo Andrés Machado de Ávila** e sua equipe na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) pelo auxílio com o desenho dos peptídeos sintéticos, e pela síntese destes.

Ao **Biotério Central do INPA** e seus técnicos, **Msc. Leonardo Brandão, Tânia Sumita** e **Andressa Karina** pelo apoio com a execução dos procedimentos de experimentação animal, obrigada pela parceria e paciência.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD – FIOCRUZ Amazônia)** pelo suporte estrutural e seus técnicos e funcionários **Michelle, Juracy, Sebastião, Patrícia, Marizete, Giovana, Ketelen, Evandro, Lúcio, Luciano, Naldo, Arimar**, entre outros, por todo auxílio.

Aos meus **amigos da Pós Graduação** (também conhecidos como Crianças do Mestrado), **Késsia Caroline, Felipe Guedes, Anny Maíza, Aline Brilhante, Sabrina Meireles, Laís**

Garcia, Carlos Dannel e Filipe Mendes. Foi um verdadeiro prazer conhecer e estudar com vocês.

À coordenação **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)**, **Nubiane, Jackeline, Dr. Carlos Gustavo, Dr. Edmar Vaz de Andrade e Dr. Adolfo José da Mota.** Obrigada pela ajuda em questões burocráticas. Aos professores do mesmo programa, por proporcionar uma ótima formação aos alunos.

Aos membros da banca de minha aula de qualificação, **Dr. Adolfo Mota, Dra. Maria Cristina e Dr. Hugo Valério** pelas correções e sugestões valorosas.

Ao **Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos**, em especial ao **Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED)** pela colaboração e auxílio contínuo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa na Amazônia (FAPEAM)** pelo apoio financeiro ao longo da execução do projeto.

*Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres,
porque sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo e te
sustento com a destra da minha justiça.*

Isaías 41,10

RESUMO

A malária continua sendo um sério problema de saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, a doença ainda apresenta elevado número de ocorrências, no qual o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é responsável pela maioria dos casos. Uma das principais maneiras de controle desta enfermidade está ligada ao seu diagnóstico correto logo nos estágios iniciais, o que o método diagnóstico por microscopia, ainda considerado “padrão ouro”, muitas vezes não é capaz de proporcionar. Isso demonstra a necessidade de produção e distribuição de testes de diagnóstico que não dependam de muitos equipamentos e profissionais qualificados, e que sejam capazes de fornecer resultados rápidos e acurados, mesmo em regiões remotas. Portanto, o presente trabalho promoveu o desenho de peptídeos sintéticos contra regiões específicas da proteína Lactato Desidrogenase de *Plasmodium* (*pLDH*) e a imunização de camundongos para obtenção de anticorpos policlonais contra estes, dos quais apenas dois deles tiveram resposta de anticorpos específicos satisfatória. O reconhecimento destes anticorpos à proteína nativa de LDH de *Plasmodium vivax* foram confirmados através de imunofluorescência. Estudos futuros são necessários para confirmar a especificidade dos anticorpos, para serem avaliados com marcadores de infecções de malária que possam compor um kit de diagnóstico nacional de malária.

Palavras-chave: Malária, peptídeos sintéticos, *pLDH*, anticorpos policlonais, imunofluorescência.

ABSTRACT

Malaria remains a serious public health problem widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, the disease still presents high numbers of cases, in which *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) is responsible for most cases. One of the main ways of controlling this disease is linked to its correct diagnosis in the early stages, which the diagnostic method still considered "gold standard" is often not able to provide. This demonstrates the need to produce and distribute diagnostic tests which are not dependent on equipments and/or skilled professionals and are capable of delivering fast and accurate results even in remote regions. Therefore, the present study promoted the design and synthesis of peptides against specific regions of *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase (pLDH) protein to obtain polyclonal antibodies through immunization of mice to obtain polyclonal antibodies against them, which only two of them have satisfactory specific antibody responses. The recognition of these antibodies to the native LDH protein of *Plasmodium vivax* have been confirmed by immunofluorescence. More studies are needed to confirm the specificity of the antibodies to be evaluated with markers of malaria infections that may constitute a national malaria diagnostic kit.

Keywords: Malaria, synthetic peptides, pLDH, polyclonal antibodies, lateral flow.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de peptídeos selecionados para síntese no Departamento de Bioquímica (UNESC).....	45
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> em hospedeiro humano.	20
Figura 2: Mundo Livre da Malária.	22
Figura 3: Países e territórios endêmicos para transmissão de malária no mundo e status em 2016.	23
Figura 4: Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2016, por município.	24
Figura 5: Porcentagem dos casos notificados de malária na Região Amazônica, segundo mês da notificação, 2015 e 2016.	24
Figura 6: Países e Territórios das Américas e Metas de Redução até 2020.	25
Figura 7: Plano de Eliminação da Malária no Brasil – Diagnóstico.	26
Figura 8: Diagnóstico de malária por microscopia.	28
Figura 9: Princípios básicos do ELISA.	31
Figura 10: Reação catalisada pela enzima LDH.	32
Figura 11: Esquema de funcionamento de testes de diagnósticos rápidos (TDRs).	33
Figura 12: Componentes e interpretações para ensaio imunocromatográfico.	34
Figura 13: Proporção de casos suspeitos de Malária que receberam diagnóstico, 2010-2016.	35
Figura 14: Casos de malária reportados por método de diagnóstico no Brasil, 2010 a 2016.	36
Figura 15: Custo total das estratégias de diagnóstico para 33 mil exames na região Amazônica, Brasil, em 2006.	37
Figura 16: Análise de epítipo Pan específico (<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>) quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB.	Erro! Indicador não definido.
Figura 17: Análise de epítipo Pan específico (<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>) quanto sua hidrofiliçidade, feita pelo programa IEDB.	47
Figura 18: Análise de epítipo <i>P. falciparum</i> específico quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB.	Erro! Indicador não definido.
Figura 19: Análise de epítipo <i>P. falciparum</i> específico quanto sua hidrofiliçidade, feita pelo programa IEDB.	48
Figura 20: Análise de epítipo <i>P. vivax</i> específico quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em laranja está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdal et al., (2010).	Erro! Indicador não definido.
Figura 21: Análise de epítipo <i>P. vivax</i> específico quanto sua hidrofiliçidade, feita pelo programa IEDB.	49
Figura 22: Alinhamento das proteínas LDH humanos (de <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i>) feito através do Clustal Ômega.	50
Figura 23: Alinhamento das proteínas LDH humana (de <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i>) feito através do Clustal Ômega.	50
Figura 24: Estruturas em 3D de subunidades de pLDH, visualizadas através do programa PDB Viewer.	51
Figura 25: Gráfico de ELISA de soros de camundongos contra os peptídeos sintéticos.	53
Figura 26: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% contendo a purificação das amostras em estudo.	54
Figura 27: Controle da imunofluorescência visualizado em objetiva de 60X.	56
Figura 28: Imunofluorescência de trofozoítos com os anti-peptídeos P1 e P2 visualizado em objetiva de 60X.	57
Figura 29: Imunofluorescência de merozoítos com os anti-peptídeos P1 e P2 e controles visualizado em objetiva de 40X.	58

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µL	Microlitros
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DO	Densidade ótica
EDAC	Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EIA	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
H	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HRP	Histidine-rich proteins
IC	Intervalo de confiança
IEDB	Immuno Epitope Database and Analysis Resource –
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
kDa	Kilo Dalton
KLH	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOPS	ácido 3-(N-mofolino)propanesulfônico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramas
NHS	N-hidroxissuccinimida
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TMB	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 ASPECTOS GERAIS	18
1.2 CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium sp.</i> EM HOSPEDEIRO VERTEBRADO	19
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	21
1.3.1 Malária no Brasil.....	23
1.4 DIAGNÓSTICO PARA MALÁRIA.....	27
1.4.1 Diagnóstico Parasitológico por Microscopia	27
1.4.2 Biossensores	28
1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
1.4.4 Diagnóstico Sorológico	30
1.4.5 Testes de Diagnóstico Rápido de Malária.....	33
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. METODOLOGIA.....	40
3.1 MODELO DE ESTUDO	40
3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	40
3.3 DESENHO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	40
3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	41
3.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS.....	42
3.5.1 ELISA Indireto.....	42
3.6 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS EM COLUNA DE PROTEÍNA G	42
3.7 CONFIRMAÇÃO DO RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DESENVOLVIDOS PELA <i>p</i> LDH NATIVA.....	43
3.7.1 Imunofluorescência Indireta.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	44
4.2 SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	44
4.3 AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	52
4.4 RECONHECIMENTO DOS ANTI-PEPTÍDEOS CONTRA A PROTEÍNA LDH NATIVA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	54

5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. ANEXO 1	67
7.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	67
7.2 ARTIGO DE REVISÃO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	69
7.3 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO	81

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecto-parasitária que continua representando um grave problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2016). Em 2016, estima-se que ocorreram 216 milhões de casos de malária, sendo destes 445 mil óbitos (WHO, 2017). O agente etiológico desta infecção são parasitas do gênero *Plasmodium spp*, e seus vetores são mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* que, por meio de repasto sanguíneo, inoculam formas infectantes do parasita na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados (SEED; KITCHEN; DAVIS, 2005).

São cinco as espécies de plasmódio que causam malária em humanos sendo que duas dominam o cenário global: o *Plasmodium falciparum* é responsável pela forma mais grave de malária, com maior ocorrência no continente africano representando 99% dos casos; O *Plasmodium vivax* possui ampla distribuição mundial, sendo predominante nas Américas, representando 64% dos casos (WHO, 2017). Apesar de este último estar associado a uma forma menos grave de malária, estudos têm demonstrado que também é capaz de causar sintomas mais graves (VENTURA, 2010).

No Brasil, em 2016, foram registrados aproximadamente 175 mil casos com 37 óbitos. Sendo que 45% destes casos encontram-se nos estados do Acre e Amazonas (WHO, 2017). Estando entre os países que possuem meta de redução de $\geq 40\%$, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), divulgou em 2017 o Plano de Eliminação da Malária no Brasil, com estratégias para o diagnóstico, vigilância, tratamento, controle vetorial, educação em saúde e mobilização social e monitoramento (BRASIL, 2016).

Recentemente, *World Health Organization* (WHO) criou uma iniciativa com três núcleos para acelerar os avanços para controle e eliminação da malária no mundo até 2030, com metas de progresso em 2020 (redução de 40%), em 2025 (redução de 75%) e 2030 (redução de 90%). Para atingir estes objetivos, são propostas várias medidas de ação e, dentre elas, o diagnóstico e tratamento precoce de pacientes com malária destaca-se por ser uma maneira eficaz para impedir que casos leves evoluam para quadros graves e contribuam para novos casos da doença (WHO, 2017).

O diagnóstico de malária por microscopia ainda é o método mais utilizado para o diagnóstico para malária no Brasil devido ao baixo custo e a viabilidade de diferenciar as espécies de *Plasmodium*. Porém existem limitações envolvidas na interpretação dos resultados, que dependem da perícia do examinador, podendo levar a erros na identificação

das espécies (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011). Além disso, este método de diagnóstico exige uma infraestrutura adequada o que aumenta os custos principalmente em regiões de difícil acesso (MANGOLD et al., 2005).

Neste cenário, os Testes de Diagnóstico Rápido (TDRs) apresentam-se como uma alternativa por possuírem uma boa sensibilidade e especificidade, serem de fácil utilização, rápidos e independentes de equipamentos (ABBA et al., 2014; BHARTI et al., 2008; WHO, 2016). No Brasil, o emprego de TDR como método diagnóstico para malária vem subindo gradativamente desde 2011 (WHO 2017), porém seu alto custo ainda impede seu uso em larga escala. Uma avaliação do TDR OptiMal® (Flow Inc., Portland, Oreg.) na região Amazônica demonstrou que, em regiões de difícil acesso, o custo do diagnóstico por microscopia é maior do que o uso de TDR (R\$22,01 e R\$ 16,66, respectivamente), uma vez que estas regiões necessitam de gastos com a qualificação profissional, equipamento, manutenção e transporte (DE OLIVEIRA; CASTRO; TOSCANO, 2010). Apesar disso, a ausência de um TDR de origem nacional dificulta seu uso no Brasil em termos de custo e logística, sendo este um dos motivos pelo qual este método ainda é pouco utilizado.

Tendo em vista esta problemática, um trabalho desenvolvido por Souza e colaboradores (2014) promoveu a produção de proteínas recombinantes de Lactato desidrogenase; proteína do parasita amplamente empregada tanto como marcador de infecção específicos, quanto como marcador Pan específico (MOODY, 2002), de *Plasmodium vivax*, para aquisição de anticorpos, e desenvolvido um ELISA sanduíche que obteve sucesso na identificação do *P. vivax*. No entanto, quando aplicados em testes de fluxo lateral, estes anticorpos não mostraram um bom desempenho, provavelmente devido à interação desses anticorpos que, por serem contra uma região maior e mais interna na proteína, necessitam de um tempo maior para que ocorra o reconhecimento (SOUZA et al., 2014).

Visando solucionar este problema, propomos a utilização de peptídeos sintéticos, uma vez que é necessária uma quantidade mínima de epítomos imunogênicos para desencadear uma resposta imune adequada, além de permitir uma abordagem multi-epítopo, permitindo uma cobertura maior da diversidade antigênica do patógeno (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

Acreditamos que obtenção de anticorpos contra peptídeos sintéticos de regiões específicas da proteína LDH de *Plasmodium* possa ter aplicação futura para diagnóstico de malária, seja em imunoenaios, seja em testes de fluxo lateral, garantindo a especificidade necessária para essas aplicações. Além disso, a criação de um TDR de origem nacional irá

minimizar custos e facilitar seu uso no diagnóstico de rotina, melhorando a intervenção terapêutica e contribuindo para a meta de erradicação a malária.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS GERAIS

A malária é uma infecção aguda, sistêmica, não contagiosa, causada por protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, ordem *Coccidiida*, subordem *Haemosporidiidae*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Considera-se que tenha surgido na África há milhões de anos e tenha se espalhado para regiões tropicais e subtropicais do mundo através de migrações, exploradores, missionários e escravos (COX, 2002), sendo endêmica para essas áreas.

De todas as espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, apenas as espécies *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* são capazes de infectar humanos. Esta última, inicialmente encontrada apenas em primatas, já foi descrita como sendo capaz de infectar seres humanos e ocorre somente em algumas áreas florestais do sudeste da Ásia (SINGH; DANESHVAR, 2013).

Os principais vetores responsáveis pela transmissão da doença são as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, através do repasto sanguíneo. Os humanos infectados, mesmo os que não apresentam sintomas clínicos (assintomáticos), são capazes de abrigar formas sexuais dos parasitas, sendo assim reservatórios para infecção de mosquitos. A malária também pode ser transmitida por transfusões sanguíneas ou do compartilhamento de seringas contaminadas, embora esses casos ocorram com menos frequência (SEED; KITCHEN; DAVIS, 2005).

O sintoma mais característico da malária é a febre de 40°C ou mais, em intervalos geralmente bem definidos de 48 horas ou 72 horas, podendo passar a ser intermitente após os primeiros eventos. As febres causadas pelos parasitas *P. vivax* e *P. ovale*, são chamadas de terçã (com intervalos de 48 horas) benigna, enquanto as causadas pelo *P. falciparum* são chamadas de terçã maligna, em decorrência à gravidade das infecções causadas por esses parasitas. Designa-se o termo quartã (intervalos de 72 horas) para se referir à febre causada pelo *P. malariae* (SIROMA; FERRANI; RIGO, 2016).

Outros sintomas comuns à infecção por malária incluem: cefaleia, calafrios, sudorese, náuseas, vômitos e mialgia. A gravidade das manifestações clínicas varia de acordo com uma série de fatores como a espécie do parasita causador da doença, níveis de parasitemia e a

imunidade da pessoa infectada, incluindo indivíduos susceptíveis como as grávidas, lactantes e crianças (WEISS et al., 2010).

O *P. falciparum* é o parasita que causa a forma mais grave de malária em humanos, devido ao fato de possuírem afinidade com hemácias em qualquer estágio de maturação, o que eleva os níveis de parasitemia, resultando em sintomas mais agudos (GILLES, 2004; DE SOUZA; RILEY, 2002). Além disso, esta espécie de *Plasmodium* é capaz de fazer sequestração de parasita, podendo levar à lesão nos tecidos cerebrais, sendo denominada malária cerebral (IDRO et al., 2010; WASSMER et al., 2015).

Por outro lado, o *P. vivax* e o *P. ovale* infectam preferencialmente as hemácias jovens, os reticulócitos (DE SOUZA; RILEY, 2002). Por esse motivo, os níveis de parasitemia tendem a ser menores e os sintomas clínicos, menos graves. Apesar disso, tem-se observado um aumento da gravidade dos sintomas clínicos associados à malária *vivax* como, por exemplo, a anemia grave e plaquetopenia, resultando em uma morbidade e mortalidade maior (VENTURA, 2010). Já o *P. malariae* tem preferência de invasão em hemácias maduras, resultando na chamada malária benigna (DE SOUZA; RILEY, 2002).

De modo geral, os sintomas causados pela malária são muitas vezes semelhantes aos causados por doenças como hepatite viral, dengue e leptospirose, entre outras, o que dificulta seu diagnóstico (COSTA et al., 2010).

1.2 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium sp.* EM HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Para seu desenvolvimento, o *Plasmodium* possui a necessidade de parasitar dois hospedeiros distintos: um hospedeiro vertebrado, que pode ser humano ou animal; e um vetor invertebrado, fêmeas de mosquito do gênero *Anopheles*. No hospedeiro vertebrado, ocorre a fase assexuada, sendo por isso chamado de hospedeiro intermediário. Já no mosquito, ocorre a fase sexuada do ciclo de vida do parasita, por este motivo é chamado de hospedeiro definitivo (BARBOSA et al., 2014) (Figura 1).

O ciclo de vida inicia no hospedeiro intermediário quando as fêmeas de *Anopheles* introduzem durante o repasto sanguíneo, formas dos parasitas chamadas de esporozoítos (MILLER et al., 2002), o qual é inoculado abaixo do tecido cutâneo, permanecendo na derme antes de penetrar na corrente sanguínea (AMINO et al., 2006). Na corrente sanguínea, os esporozoítos são transportados até o fígado e invadem os hepatócitos, os quais possuem as condições ideais para multiplicação e maturação do parasita, iniciando a fase pré-eritrocítica

(MILLER et al., 2002). Nesta etapa, os esporozoítos formam os esquizontes, realizando a maturação do parasita. Os esporozoítos de *Plasmodium* do gênero *vivax* e *ovale* podem ficar em estado de latência como hipnozoítos resistentes por vários meses, e até mesmo anos, podendo voltar a serem esquizontes teciduais a qualquer momento e, assim, causarem recaídas (KROTOSKI, 1985; ASHLEY et al., 2006). Ao fim da fase pré-eritrocítica, os esquizontes hepáticos maduros rompem os hepatócitos, liberando na corrente sanguínea o *Plasmodium* na forma de merozoítos, que irão invadir os eritrócitos (KROTOSKI, 1985; FARID et al., 1993) (Figura 1).

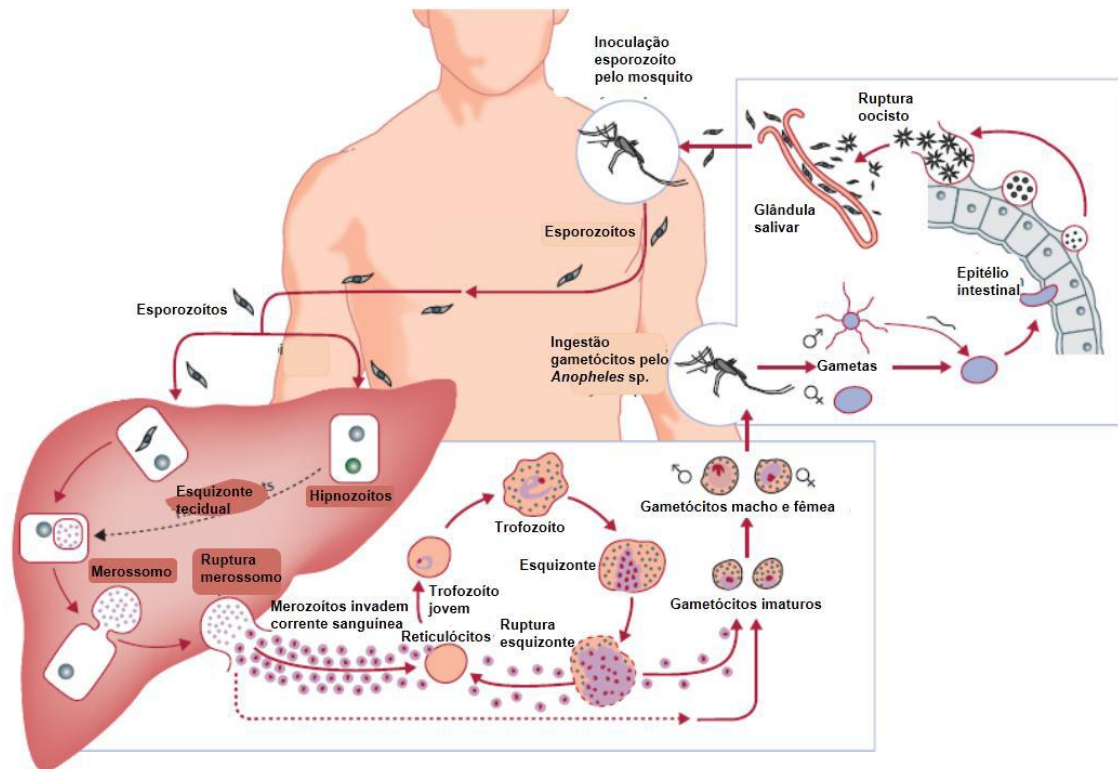


Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. em hospedeiro humano. MUELLER et al., (2009).

Uma vez nas hemácias, inicia-se o ciclo eritrocítico no qual os merozoítos se replicam dando origem aos trofozoítos, parasitas de forma anelada que utilizam a hemoglobina como fonte de energia para seu metabolismo, e formam novamente esquizontes de maturação. Quando ocorre a ruptura do esquizonte, são liberados novos merozoítos na corrente sanguínea que irão invadir eritrócitos e, assim, reiniciar o ciclo. É durante essa fase que antígenos do parasita são encontrados em maior quantidade no sangue dos pacientes infectados e os sintomas clínicos da doença começam a se manifestar (D'ACREMONT et al., 2014; HVIID, 1998).

Uma parcela dos trofozoítos do ciclo eritrocítico se diferencia em gametócitos femininos e masculinos (macrogametócitos e microgametócitos, respectivamente), que infectam o vetor durante o repasto sanguíneo e iniciam a fase sexuada do ciclo de vida do plasmódio (BRASIL, 2009; DE SOUZA; RILEY, 2002).

No vetor, as hemácias parasitadas ingeridas são irrompidas, o gametócito masculino forma os microgametas através da exflagelação e fecundam os macrogametócitos, dando origem ao oocineto. Este migra pelas células epiteliais do estômago do mosquito, onde se transforma em oocisto, o qual se mantém fixado no intestino médio do vetor, sofrendo mudanças estruturais e replicando esporozoítos em seu interior. Após a maturação do oocisto, acontece sua ruptura e os esporozoítos são liberados na hemolinfa e transportados até as glândulas salivares do mosquito. Após esse momento, o mosquito se torna apto a transmitir os parasitas aos hospedeiros intermediários (vertebrados), completando ciclo geral do plasmódio (BRUCE et al., 1990; MOORE et al., 2002).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Em 2015, foram registrados 212 milhões de casos de malária, sendo que aproximadamente 430 mil destes casos foram a óbito, principalmente entre as crianças (WHO, 2016). Utilizando estes números como ponto de partida, foi formada uma iniciativa com três núcleos para acelerar os progressos para controle e eliminação da malária no mundo até 2030: a estratégia técnica global da *World Health Organization* (WHO) para Malária 2016-2030 (GTS); o plano de apoio *roll back malaria*, ações e investimentos para combate da malária 2016-2030 (AIM); e as metas de desenvolvimento sustentável (SDG's), Meta 3.3 focadas em tuberculose, malária e doenças tropicais negligenciadas. Esta iniciativa propõe a redução da incidência dos casos de malária, comparados com os de 2015, em pelo menos 40% até 2020, 75% até 2025 e 90% até 2030 (WHO, 2017) (Figura 2).

GTS: Metas Globais para 2030 e Marcos de Progresso para 2020 e 2025

Visão - Um Mundo Livre de Malária

Pilares			
Pilar 1	Garantir acesso universal a prevenção, diagnóstico e tratamento da malária		
Pilar 2	Acelerar os esforços em direção a eliminação e obtenção do <i>status</i> livre de malária		
Pilar 3	Transformar a vigilância em malária em uma intervenção de núcleo		
Objetivos	Marcos de Progresso		Metas
	2020	2025	2030
1. Reduzir as taxas de morte por malária global comparada por 2015	Pelo menos 40%	Pelo menos 75%	Pelo menos 90%
2. Reduzir os casos de incidência de malária global comparada por 2015	Pelo menos 40%	Pelo menos 75%	Pelo menos 90%
3. Eliminar a malária dos países nos quais a malária foi transmitida em 2015	Pelo menos 10 países	Pelo menos 20 países	Pelo menos 35 países
4. Prevenir o re-estabelecimento da malária em todos os países livres de malária	Prevenção do re-estabelecimento	Prevenção do re-estabelecimento	Prevenção do re-estabelecimento

GTS, *Global technical strategy for malaria 2016–2030***Figura 2:** Mundo Livre da Malária: Metas Globais para 2030 e Marcos de Progresso para 2020 e 2025. Adaptado de WHO, 2017.

Um ano após o estabelecimento desta iniciativa, em 2016, estima-se que ocorreram 216 milhões de casos de malária (95% IC), 445 mil óbitos, sendo que 90% dos casos estão concentrados na região africana (WHO, 2017). Dos 91 países considerados endêmicos de malária em 2016, somente 15 países são responsáveis por 80% dos casos de malária global - todos na África, exceto a Índia. Na África subsaariana, o *P. falciparum* é o parasita mais prevalente, representando 99% dos casos; o *P. vivax* é predominante nas Américas, representando 64% dos casos. Apesar da aparente falta de redução de incidência global, dois países, antes endêmicos, foram certificados pelo WHO com o *status* de Livre de Malária em 2016, o Kyrgyzstan e o Sri Lanka, e 11 possuem o potencial de obtê-lo por possuírem pelo menos 3 anos consecutivos sem casos de malária (WHO, 2017) (Figura 3).

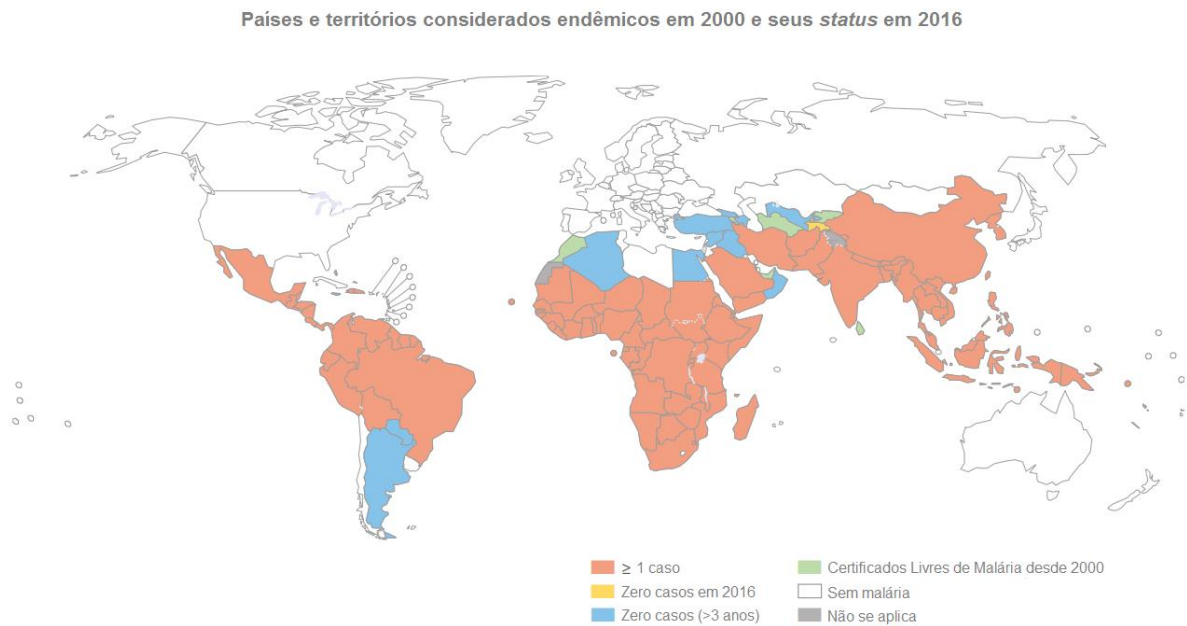


Figura 3: Países e territórios endêmicos para transmissão de malária no mundo e status em 2016.
Adaptado de WHO, 2017.

A malária, além de comprometer diretamente a saúde da população, causa um impacto na economia dos países nos quais ocorre. Na África, essa observação fica clara quando se apresenta um comprometimento de quase 2% do seu produto interno bruto devido ao acometimento da malária a pessoas em idade produtiva (GALLUP; SACHS, 2012). Além dos efeitos na economia, há implicações na integridade mental e física nas pessoas afetadas pela malária, o que contribui para o empobrecimento dos países endêmicos para essa infecção (FERNANDO et al., 2003). Somando-se a tudo isso, estudos já demonstraram que a malária é capaz de afetar o desempenho escolar das crianças que sofrem com episódios da doença (VITOR-SILVA et al., 2009; VORASAN et al., 2015).

1.3.1 Malária no Brasil

A malária é a infecção parasitária que mais ocorre no Brasil, sendo que as regiões de maior risco se encontram na Amazônia legal (Figura 4) (BRASIL, 2017), e as infecções causadas pelo *Plasmodium vivax* são as mais prevalentes. Em 2016, foram registrados aproximadamente 175 mil casos com 37 óbitos (WHO, 2017) e somente 15 municípios, pertencentes aos estados do Acre e Amazonas, são responsáveis por aproximadamente 45% destes casos de malária (WHO, 2017). Em 2016, o *P. vivax* foi responsável por

aproximadamente 88% dos casos, seguido das infecções por *P. falciparum* (12%), e pelo *P. malariae*, responsável por menos de 1% dos casos (BRASIL, 2017).

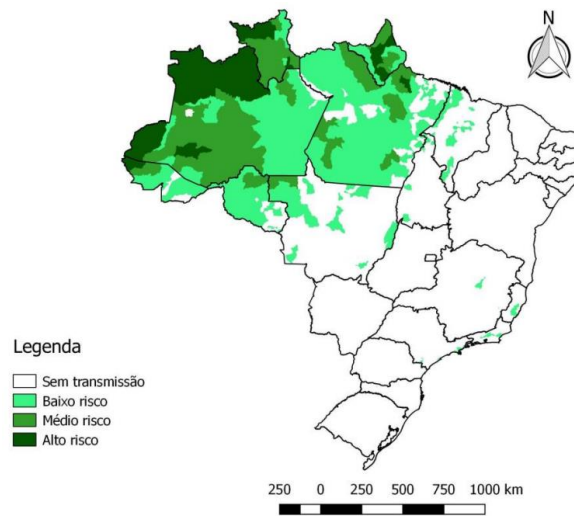


Figura 4: Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2016, por município. FONTE: BRASIL, 2017.

A região amazônica possui as características propícias para desenvolvimento do principal vetor da malária, o *Anopheles darlingi*, possuindo o clima tropical úmido, suas vias hidrográficas, chuvas abundantes e temperatura elevada (PENHALBEL et al., 2005). Por esse motivo, esta região concentra a maioria dos casos do país. O número de casos de malária na Região Amazônica varia de ano para ano, o que tem ligação direta com as características climáticas de cada temporada, pois os picos de transmissão de malária são observados nos períodos chuvosos (BRASIL, 2009) (Figura 5).

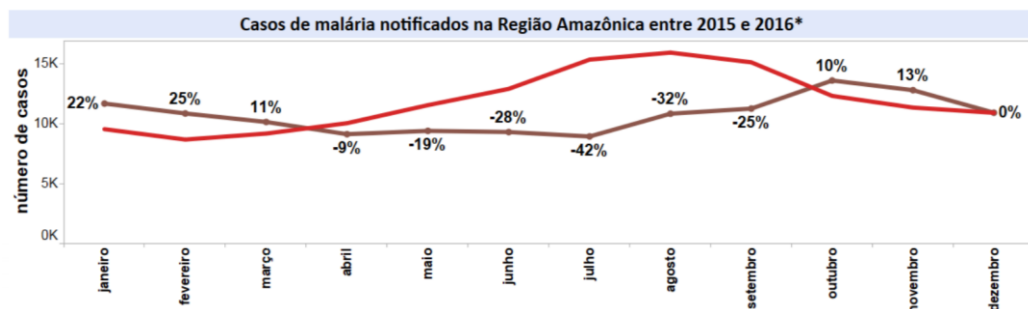


Figura 5: Porcentagem dos casos notificados de malária na Região Amazônica, segundo mês da notificação, 2015 e 2016. * Dados preliminares, podem sofrer alterações. Fonte: PNCM, 2017.

A malária, em decorrência de um esforço iniciado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no século XX, teve uma diminuição significativa em números de casos no Brasil, sendo quase extinguida de algumas regiões antes endêmicas. No entanto, entre as décadas de

60 e 70 o número de casos voltou a crescer. Esse crescimento se deve, principalmente, a fatores como desmatamento da Região Amazônica para expansão urbana e garimpo, o que intensificou as migrações provenientes do Nordeste, Centro-Oeste e Sul, para essa região (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002). As áreas urbanas periféricas também contribuíram na elevação do número de casos devido às baixas condições de saneamento básico causadas pelo êxodo rural, proporcionando condições adequadas à transmissão da doença (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002).

Para atingir a marco de diminuição de 40% de incidência global de malária até 2020, a recente iniciativa para eliminar a malária do mundo (GTS/AIM/SDG's 2016-2030), classificou os 18 países endêmicos para malária das Américas entre: aqueles que terão como meta a redução $\geq 40\%$ (12 países); e os que possuem como meta a redução de 20-30% (5 países). O Brasil está entre os países com meta de redução de $\geq 40\%$ (Figura 6) (WHO, 2017).

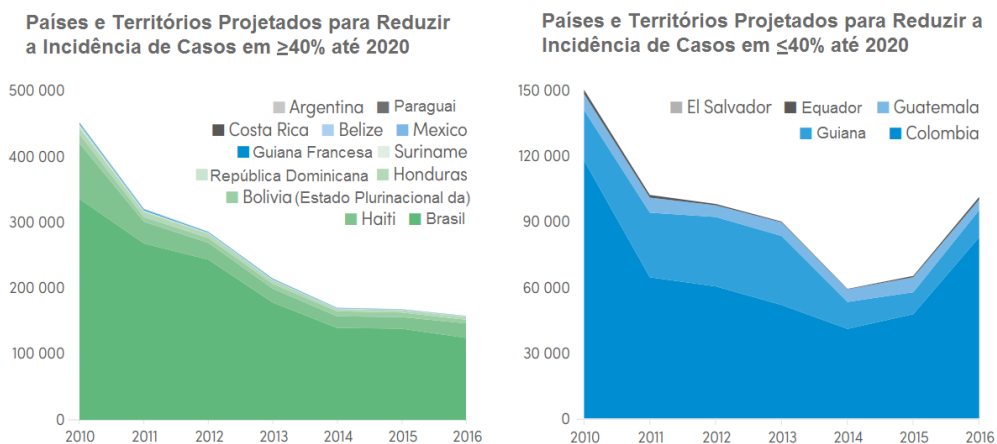


Figura 6: Países e Territórios das Américas e Metas de Redução até 2020. Adaptado de WHO, 2017.

Visando alcançar esta meta, o Brasil, pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), divulgou em janeiro de 2017 o Plano de Eliminação da Malária no Brasil. A eliminação de malária é considerada a interrupção da transmissão vetorial de malária e redução à zero da incidência de infecções numa determinada área geográfica, requerendo, ainda, de manutenção das medidas de controle e vigilância por tempo indeterminado. Neste Plano de Eliminação, são divulgadas estratégias para o diagnóstico, vigilância, tratamento, controle vetorial, educação em saúde e mobilização social e monitoramento (BRASIL, 2016), sendo que, dentre estes, o diagnóstico precoce e preciso é considerado o primordial, uma vez que é o primeiro passo em direção à eliminação (Figura 7).

Diagnóstico			
Alta e média transmissão	Pré-eliminação	Eliminação	Prevenção à reintrodução
Pontos de diagnóstico próximos às comunidades afetadas.	Pontos de diagnóstico próximos às comunidades afetadas.	Definição de unidade de referência municipal.	Definição de unidade de referência estadual. (*)
Oferta de diagnóstico de malária no pré-natal.	Oferta de diagnóstico de malária no pré-natal.		
Envolvimento dos Agentes Comunitários de Saúde na detecção e acompanhamento de casos no seu território de atuação.	Envolvimento dos Agentes Comunitários de Saúde na detecção e acompanhamento de casos no seu território de atuação.		

Figura 7: Plano de Eliminação da Malária no Brasil – Diagnóstico. Fonte: BRASIL, 2016.

Apesar de todos os incentivos anteriores para erradicação dessa doença, a eliminação da malária no Brasil ainda não foi possível devido a fatores como diagnóstico tardio ou errôneo, a crescente resistência dos parasitas aos antimaláricos e o turismo em regiões endêmicas, (WELLEMS; MILLER, 2003).

A disponibilidade de diagnóstico deve contemplar uma análise profunda da epidemiologia local, com a identificação das áreas de transmissão, população de risco e limitações de acesso e estrutura. Desta forma, a oferta de diagnóstico deve ser equivalente a situação regional, de fácil acesso as áreas de risco e ampla divulgação, permitindo um intervalo menor entre a identificação e o tratamento e quebrando o ciclo de transmissão (BRASIL, 2016).

A OMS (2016) direciona uma série de ações para tratamento e prevenção da malária, tais como: o uso de mosquiteiros tratados com inseticida (MTI); pulverização de inseticidas de eliminação de larvas; tratamento com antimaláricos para indivíduos vulneráveis como crianças e mulheres grávidas; celeridade na confirmação das suspeitas de infecção por meio de teste microscópico e/ou teste de diagnóstico rápido (TDR); administração rápida tratamento com as drogas adequado a espécie de parasita causador da infecção. Seguindo todas essas diretrizes, o controle e tratamento da doença se tornam muito mais prováveis.

1.4 DIAGNÓSTICO PARA MALÁRIA

O diagnóstico e tratamento precoce de pacientes com malária é a maneira mais eficaz para impedir que casos leves evoluam para quadros graves, além de impedir que contribuam para novos casos da doença. É recomendado que todos os casos suspeitos de malária sejam confirmados por microscopia ou testes de diagnóstico rápido (TDR) antes de administrado o tratamento, garantindo a utilização do medicamento correto para cada espécie de *Plasmodium* e seu uso apenas quando necessário, minimizando a possibilidade de falha de tratamento e/ou possível resistência dos parasitas aos medicamentos (WHO, 2017).

Por mais de 100 anos, a microscopia se mantém como o teste de diagnóstico considerado como padrão ouro para detecção de malária (MURPHY et al., 2013). No entanto, há vários métodos que podem ser utilizados para detecção da infecção por malária, como ensaios imunoenzimáticos (EIA), testes imunocromatográficos rápidos, reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outros.

1.4.1 Diagnóstico Parasitológico por Microscopia

O teste microscópico possui características desejáveis ao diagnóstico de malária, tais como custo baixo, especificidade e sensibilidade alta. Por esses motivos, se mantém como padrão-ouro para detecção de malária (MURPHY et al., 2013).

Este diagnóstico é realizado através da técnica do esfregaço delgado ou espesso (gota espessa), desenvolvida por Ross em 1903 (GOTIJO, 1995). A gota espessa (Figura 8) é mais utilizada, pois o sangue concentrado facilita a visualização de parasitas (BRASIL, 2009). Esta técnica se baseia na coleta de sangue periférico de pacientes com suspeitas de infecção malárica para preparo de lâminas coradas com Giemsa (ou outros corantes específicos) por 20 a 30 minutos e posterior visualização em microscópio óptico, possibilitando a diferenciação de espécies de parasitas encontrados e também uma contagem de parasitas por campo, sendo assim, qualitativo e quantitativo (BRASIL, 2009).

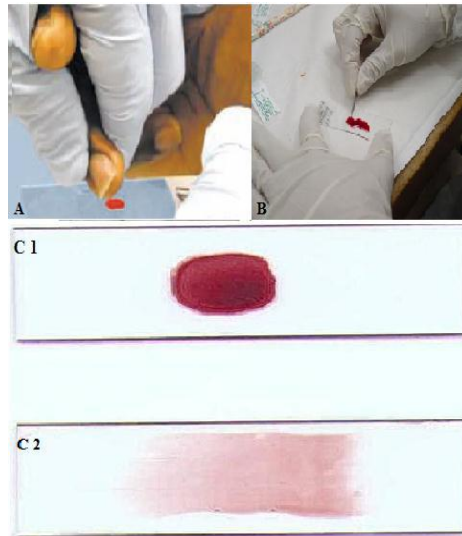


Figura 8: Diagnóstico de malária por microscopia. A) Punção digital; B) Preparação de lâminas; C1) Gota espessa e C2) Esfregaço sanguíneo. Fonte: www.rph.wa.gov.au/malaria/diagnosis.

Este exame permite a detecção de até 5-10 parasitas/ μ l, no entanto, esse limite é dependente do nível de experiência do responsável pela interpretação do teste. Em condições adversas como as encontradas em estudos de campo, essa capacidade passa a ser de cerca de 100 parasitas/ μ l de sangue. O tempo de aplicação total deste exame é de cerca de 60 minutos (BRASIL, 2009).

Apesar das vantagens apresentadas, faz-se necessário levar em consideração as limitações envolvidas na interpretação dos resultados, tais como: preparo inadequado das lâminas, lise das hemácias e consequentes mudanças na morfologia dos parasitas e, com isso, erros na identificação das espécies, o que poderia levar a administração de antimaláricos inadequados para as infecções (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011). Portanto, este método de diagnóstico exige uma infraestrutura adequada e profissionais muito bem qualificados para execução e interpretação dos exames (MANGOLD et al., 2005).

1.4.2 Biossensores

Novas tecnologias *point-of-care* estão sendo desenvolvidas visando maior sensibilidade e estabilidade em campo. Dentre essas tecnologias, temos os sensores

eletroquímicos, os quais são dispositivos que detectam variações ao receberem estímulos de natureza física ou química, respondendo com um sinal elétrico que pode ser canalizado, amplificado e modificado através de dispositivos eletrônicos (YOON, 2013)

Os sensores químicos são compostos por um elemento detector e um elemento transdutor. O detector é formado por receptores de reconhecimento, que são unidades moleculares diferentes que possuem o potencial de interagir seletivamente com o analito, transformando a informação gerada em energia que é capaz de ser lida pelo transdutor. Esse transdutor, então, produz um sinal analítico a partir da energia gerada pelo estímulo dos receptores (BANICA, 2012).

Algumas pesquisas buscam o desenvolvimento de biossensores para detecção de malária a partir de aptâmeros e anticorpos como elementos de detecção. Lee e colaboradores (2012) descreveram o desenvolvimento de aptassensores para malária, baseados na detecção da proteína *p*LDH empregando um sistema de reconhecimento composto de um aptâmero modificado como ligações tiol sobre um eletrodo de ouro, sendo a leitura do sinal realizada em uma plataforma de espectroscopia eletroquímica de impedância (EIS), neste estudo, o limite de detecção reportado para os aptassensores foi de 108.5 fM e 120.1 fM para LDH de *P. vivax* e LDH do *P. falciparum*, respectivamente.

A capacidade de detectar baixas concentrações do antígeno possibilitaria também utilizar amostras de coleta menos invasiva. Gbotosho e colaboradores (2010) demonstrou a presença de antígenos maláricos estão presentes na saliva, porém em baixas concentrações. No entanto, o emprego desta tecnologia ainda é recente e são necessários estudos que permitam o desenvolvimento de testes com biossensores que sejam, ao mesmo tempo, sensíveis e específicos, fáceis de utilizar, de relativo baixo custo e aplicáveis em campo, pois a necessidade de equipamentos para utilização desta técnica é um ponto negativo a ser considerado.

1.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As técnicas moleculares vêm sendo amplamente empregadas para diagnóstico de doenças infecciosas (TANG; PROCOP; PERSING, 1997). A PCR como método de detecção de malária foi inicialmente descrita por Waters & McCutchan, em 1989, e consiste na

amplificação de sequências específicas da região codificadora da subunidade menor de RNA ribossomal (18S rRNA) de plasmódio através da utilização de *primers* (sequências iniciadoras) responsáveis por se anelar em regiões específicas do DNA. A enzima DNA polimerase (Taq DNA polimerase) realiza, então, a síntese por meio de ciclagem de temperaturas específicas para desnaturação e extensão do DNA, resultando na aquisição de milhares de cópias da sequência alvo (KIMURA et al., 1997; LORENZ, 2012).

Esta técnica, em sua variação PCR em tempo real, permite uma análise mais sensível e específica que as já apresentadas. Sendo, até o presente momento, o único método de diagnóstico para malária, rotineiramente empregado, capaz de detectar infecções assintomáticas e diferenciar entre as espécies de plasmódio existentes. Por esses motivos, é a mais indicada para *screening* em bancos de sangue e para confirmação de casos suspeitos de malária que apresentam resultados negativos nas demais formas de diagnóstico (ALI et al., 2005; HÄNSCHEID, 1999).

Apesar de todas as vantagens relacionadas a esta tecnologia, seu uso continua sendo restrito ao ambiente laboratorial, em decorrência ao alto custo dos reagentes e equipamentos utilizados, necessidade de profissionais qualificados para a execução e o cuidado para evitar contaminações.

1.4.4 Diagnóstico Sorológico

Os diagnósticos sorológicos se baseiam na interação entre antígenos do parasita na fase sanguínea assexuada presentes no soro dos pacientes com malária com anticorpos produzidos contra estes, utilizando técnicas como ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ou imunofluorescência (TANGPUKDEE et al., 2009).

Em geral, os ensaios imunoenzimáticos (EIA) possuem alta sensibilidade e especificidade, por se tratarem de testes baseados na ligação antígeno-anticorpo, que são ligações específicas (FRIGUET et al., 1985). Na técnica ELISA indireto, são usadas microplacas com 96 poços nos quais são aderidos antígenos. Os soros dos pacientes são adicionados em cada poço e, durante a incubação, ocorre ligação entre o antígeno aderido à placa e o anticorpo presente no soro adicionado. Em seguida, adiciona-se um segundo anticorpo que se ligará às imunoglobulinas da espécie que estão sendo testadas, e este está conjugado à enzima peroxidase, a qual, em contato com uma solução cromatogênica

adequada como, por exemplo, o tetrametilbenzidina (TBM) com o substrato da enzima, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), provocam uma reação colorimétrica, possibilitando a mensuração da quantidade de anticorpos presentes no soro dos pacientes. Este ensaio, pelo fato de se basear na busca de anticorpos contra antígenos, e não na busca de antígenos, geralmente é mais empregado em estudos para avaliar a resposta imune humoral de pacientes (DRAME et al., 2010; POINSIGNON et al., 2008).

O ELISA sanduíche se baseia, além das etapas já descritas, em mais uma etapa inicial a qual consiste na sensibilização da placa com anticorpos para captura de antígenos alvo (GONÇALES; GONÇALES, JR, 2004), as reações posteriores acontecem como o descrito acima (Figura 9).

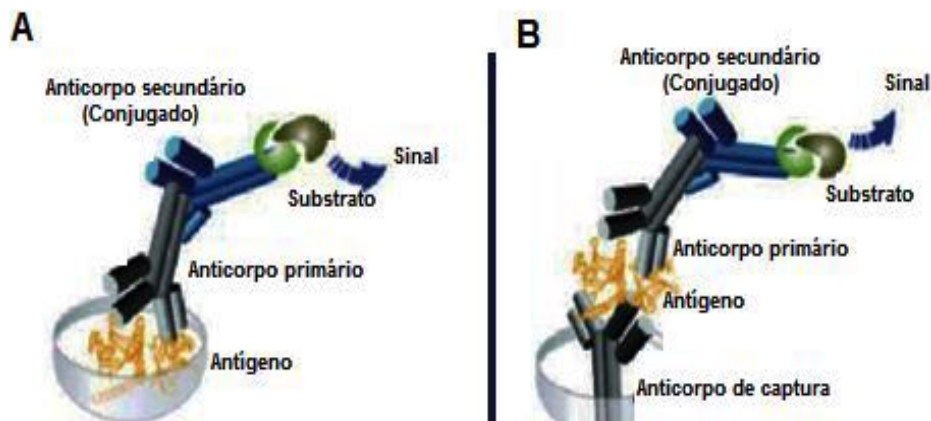


Figura 9: Princípios básicos do ELISA. A) ELISA indireto. B) ELISA sanduíche.

Os biomarcadores de infecção mais empregados são as Aldolases de *Plasmodium*, proteína rica em histidina-2 (HRP-2) de *Plasmodium falciparum* e a lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH).

As aldolases são as principais enzimas da via glicolítica do *Plasmodium*, liberadas no sangue dos pacientes infectados e são encontradas no citoplasma dos parasitas (DZAKAH et al., 2013), sendo conservada e expressa por todas as espécies de *Plasmodium*, ao longo de todo o seu ciclo de vida, podendo ser usada como um diagnóstico Pan específico.

A HRP (Histidine-rich Proteins) são proteínas nas quais o aminoácido histidina representa mais de 70% da composição da cadeia polipeptídica. A HRP-2 de *Plasmodium* é exclusiva do *P. falciparum*, e se encontra presente no soro, e em outros fluidos de indivíduos infectados com este parasita (JAIN et al., 2014). A proteína PfHRP-2, embora amplamente

utilizada em testes de diagnóstico rápido, possui o viés de permanecer no organismo por 3 a 5 semanas, mesmo após a cura do paciente, podendo levar a falsos positivos que acarretam na administração desnecessária de antimaláricos (HOUZE et al., 2009; IQBAL et al., 2004). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que pode haver a deleção do gene de HRP-2 em algumas cepas de *P. falciparum*, acarretando em falsos negativos para os testes de diagnóstico que usam esse antígeno como marcador (KOITA et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

A LDH de plasmódio (pLDH) é tetramérica, contém 316 aminoácidos, e faz parte da via glicolítica do metabolismo do parasita, sendo produzida em todas as etapas de seu ciclo de vida (MOODY, 2002). Como a via glicolítica é a principal fonte de energia para o desenvolvimento do parasita, o consumo de glicose das hemácias infectadas pelo parasita é muito aumentado, chegando a ser entre 50 a 100 vezes maior do que as hemácias saudáveis (PREUSS; JORTZIK; BECKER, 2012; PODLASEK; MCPHERSON, 1989; WALLQVIST et al., 2016). A LDH participa da última reação da via glicolítica, convertendo piruvato a lactato, e novamente em piruvato, para formar NAD⁺ dando prosseguimento a glicólise anaeróbica (Figura 10). Como a glicólise anaeróbica ocorre no ciclo biológico do *Plasmodium* no interior dos eritrócitos, o metabolismo da glicose proporciona a energia necessária ao crescimento intracelular (BERWAL et al, 2006).

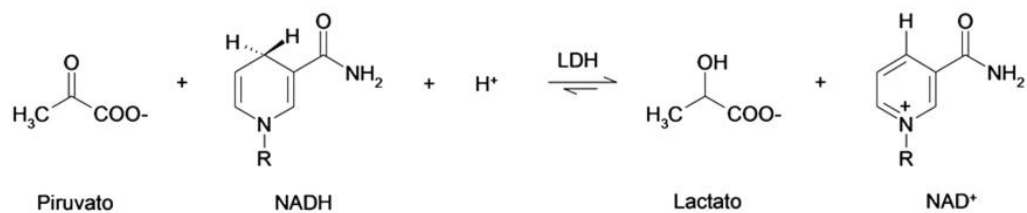


Figura 10: Reação catalisada pela enzima LDH. Fonte: OLIVEIRA e FRANÇA, 2016.

Todas as espécies de parasitas que causam a malária em humanos expressam a LDH. Estas enzimas, ainda que exercendo a mesma função biológica que a LDH humana, apresentam diferenças nas características imunológicas, estruturais e nos níveis de expressão, quando comparadas (WIWANITKIT, 2007).

A pLDH (LDH de *Plasmodium sp*) possui uma série de características que a tornam um ótimo marcador de infecção para malária como, por exemplo, o fato de ser uma enzima utilizada para do desenvolvimento intracelular do parasita, tornando sua concentração

relacionáveis aos níveis de parasitas no sangue de pessoas infectadas, no que diz respeito ao *Plasmodium falciparum* (MAKLER; HINRICHS, 1993; VAN GENDEREN et al., 2004). Parte das características estruturais dessa proteína são conservadas entre as espécies de plasmódio que causa malária em humanos, o que torna possível a sua utilização como um marcador pan específico. Além disso, essas enzimas não são encontradas em pacientes sem infecção 7 dias após o tratamento efetivo ou cura (HOUZE et al., 2009; MBABAZI et al., 2015).

1.4.5 Testes de Diagnóstico Rápido de Malária

Os testes de diagnóstico rápido (TDR) para malária partem do princípio da imobilização de antígenos através de uma ligação antígeno-anticorpo. Eles possuem duas fases: a fase fixa e a móvel. Na fase fixa, são aderidos anticorpos específicos a uma membrana de nitrocelulose; Na fase móvel, anticorpos específicos são aderidos a partículas de ouro coloidal. O sangue de paciente com suspeita de malária é colocado com a fase líquida do kit diagnóstico e, quando em contato com a membrana teste, resulta na ligação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização de uma linha colorida (MOODY, 2002; PIPER et al., 1999) (Figura 11).

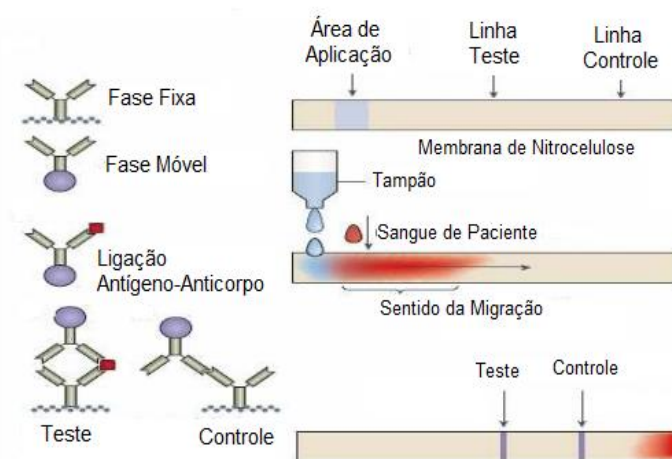


Figura 11: Esquema de funcionamento de testes de diagnósticos rápidos (TDRs). Adaptado de WHO et al., 2008.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma série de diretrizes para a produção de TDR para aplicações *point-of-care*. Essas diretrizes, basicamente, recomendam que os testes tenham facilidade de acesso àqueles que necessitam, tenham uma boa

sensibilidade e especificidade, que sejam fáceis de usar, rápidos e independentes de equipamentos (WHO, 2011).

Quanto à sensibilidade e especificidade destes testes, a OMS determina devam ter uma sensibilidade, pelo menos, equivalente à da microscopia em condições de campo, que corresponde à detecção de aproximadamente 100 parasitas/ μl . Para essa parasitemia, os testes devem ser capazes de detectar os antígenos em 100% das vezes, com uma especificidade de 90%. Além disso, os testes devem ser específicos para os antígenos indicativos de parasitas vivos circulantes, não podendo ser reativos a produtos de parasitas inviáveis, como resquícios de proteínas ou ácidos nucleicos. Idealmente, também devem oferecer a verificação de eficácia de tratamentos ou resistência às drogas antimaláricas (WHO, 2011).

Atualmente, existem vários testes de diagnóstico rápido disponíveis no mercado. Os testes existentes geralmente são para detecção de *P. falciparum*, de *P. falciparum* + Pan específico (que é capaz de detectar *P. falciparum* e outras espécies de plasmódio que infectam humanos), de *P. falciparum* e *P. vivax*, *P. vivax* + Pan específico, testes apenas com anticorpo Pan específico ou somente para detecção de *P. vivax* (WHO, 2011) (Figura 12).

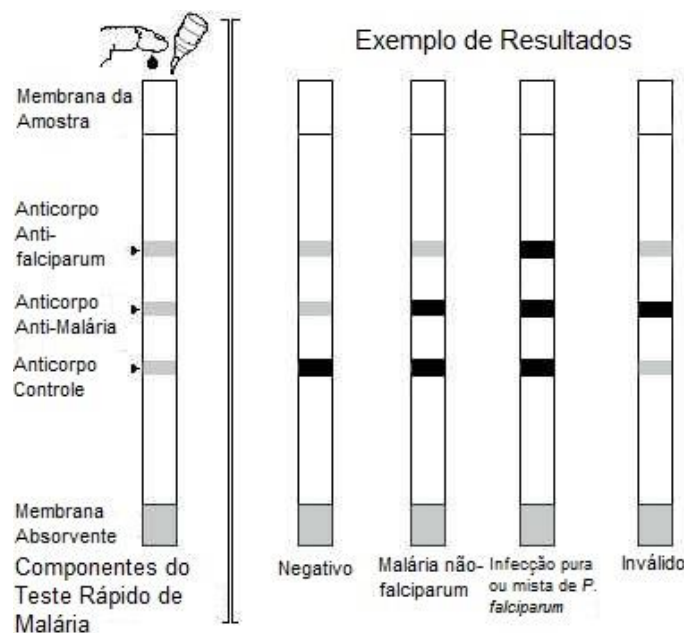
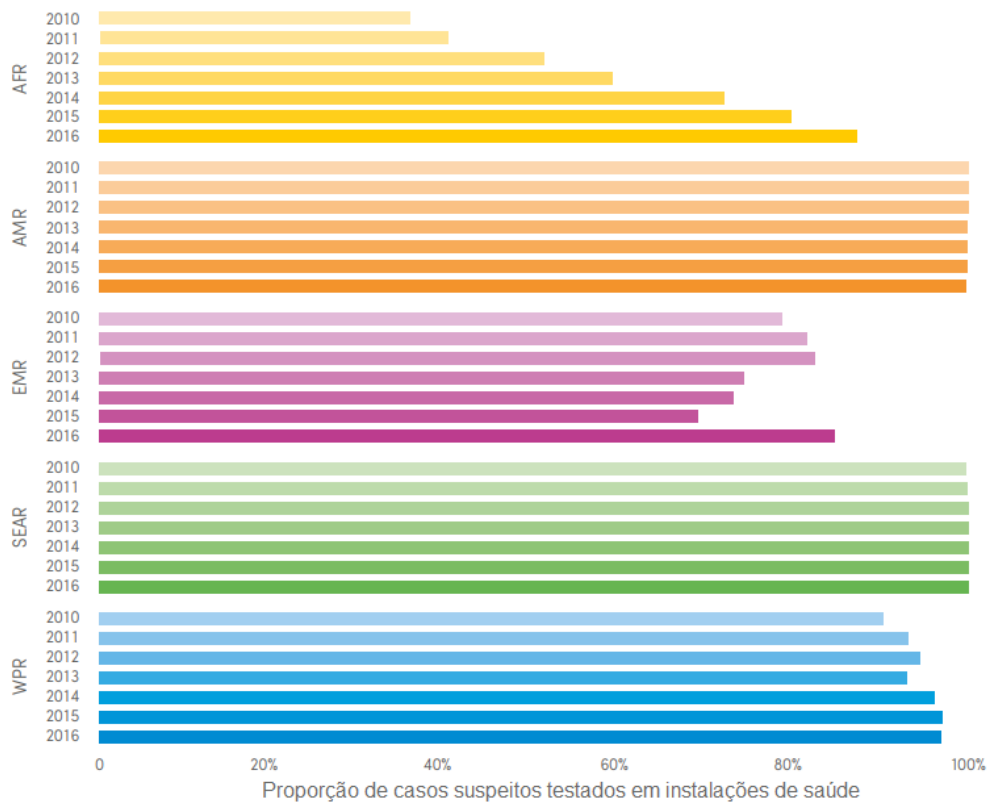


Figura 12: Componentes e interpretações para ensaio imunocromatográfico. Fonte: Adaptado de <http://www.malariasite.com/>.

Os testes de diagnóstico rápido vêm contribuindo para o tratamento correto da malária. A WHO possui o Programa de Teste de TDR para Malária, que durante o período de 2010 a

2016, estimou a venda de \$1,66 bilhões em TDRs comerciais que foram distribuídos globalmente. Este valor representa aproximadamente 312 milhões TDRs, sendo que 269 milhões destes foram entregues somente para Região Africana WHO. Em 2016, o uso de testes diagnóstico em casos suspeitos de malária na África aumentou de 36% em 2010 para 87% em 2016. Este aumento ocorreu principalmente devido ao aumento do uso de TDRs, que contaram por 63% de todos os diagnósticos realizados (WHO, 2017) (Figura 13).

Proporção de casos suspeitos de Malária atendidos em instalações de saúde que receberam diagnóstico por Região WHO, 2010-2016



AFR, Região WHO África; AMR, Região WHO das Américas; EMR, Região WHO Oriental do Mediterrâneo; SEAR, Região do Sudeste da Ásia; WPR Região Ocidental do Pacífico

Figura 13: Proporção de casos suspeitos de Malária que receberam diagnóstico, 2010-2016. Adaptado de WHO, 2017.

Apesar da microscopia ainda ser o método mais utilizado para o diagnóstico para malária no Brasil, o emprego de TDRs vem aumentando desde 2011, passando de 1486 em 2011 para 23273 em 2016. Estima-se que foram distribuídos no Brasil 68 mil unidades de TDRs pelo em 2016, logo, sua utilização ainda está abaixo da esperada (WHO, 2017). Isso ocorre porque os TDRs ainda não eliminam a necessidade da verificação por exame microscópico, em decorrência do fato de não serem capazes de detectar algumas infecções

com níveis muito baixos de parasitemia, por causa disso, os resultados negativos de pacientes que possuem sintomas clínicos devem ser ainda testados por microscopia (TANGPUKDEE, 2009).

WHO region Country/area	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Brazil	Presumido e confirmado	334 668	267 146	242 758	178 546	144 130	129 251
	Microscopia examinada	2 711 432	2 476 335	2 325 775	1 873 518	1 744 640	1 573 542
	Confirmada com microscopia	334 667	266 713	237 978	174 048	142 746	124 217
	TDR examinado	-	1 486	23 566	19 500	11 820	16 865
	Confirmado com TDR	-	433	4 780	3 719	1 384	3 318
	Casos importados	-	-	-	8 905	4 847	4 935

Figura 14: Casos de malária reportados por método de diagnóstico no Brasil, 2010 a 2016. Adaptado de WHO, 2016.

De modo geral, os TDRs são simples, eficientes e proporcionam resultados rapidamente (DE OLIVEIRA; DE CASTRO GOMES; TOSCANO, 2010) e sua aplicação em campo tem sido estimulada, tanto pela velocidade, sensibilidade e especificidade de diagnóstico, tanto pelo custo-benefício da técnica. Em um estudo realizado na Tanzânia – África - (LUBELL et al., 2008) avaliando os custos locais com malária em uma região com mais de 60% de incidência de casos, a comparação do diagnóstico por TDR, diagnóstico por microscopia e tratamento presuntivo com antimaláricos sem diagnóstico, demonstrou que o uso de TDR reduz significativamente os custos se o índice de aderência for maior de 65%.

De maneira semelhante, foi realizado uma comparação de custos entre um TDR comercial, *CareStart Rapid Diagnostic Kit* (Access Bio, Inc., New Jersey, USA), com o diagnóstico por microscopia (OGUNNIYI et al., 2016). Foram avaliados os valores de custo como estrutura, qualificação profissional, uso de instalações elétricas, material de consumo, horas de trabalho e tratamento, tendo como base os custos de uma unidade médica em Ibadan – África. Esse estudo estimou o custo total da microscopia em \$ 10.77, contra \$ 5.61 do TDR (aproximadamente R\$ 34,91 e R\$ 18,19, respectivamente, câmbio realizado em 07/03/2018) (OGUNNIYI et al., 2016).

Apesar disso, os custos variam de acordo com as condições epidemiológicas locais. No Brasil, uma avaliação do OptiMal® (Flow Inc., Portland, Oreg.) em 12 municípios endêmicos para malária do estado do Pará, na região Amazônica, demonstrou o custo por caso do diagnóstico por microscopia em aproximadamente \$6.79 e por TDR em \$5.14

(aproximadamente R\$22,01 e R\$ 16,66, respectivamente, câmbio realizado em 25/02/2018). Apesar do valor do TDR OptiMal® ser elevado em comparação com a microscopia (Figura 15), os altos custos relacionados a qualificação profissional, equipamento, manutenção e transporte para a microscopia diminuem seu custo-benefício (DE OLIVEIRA; CASTRO; TOSCANO, 2010)

Ítems	Microscopia (US\$)	TDR (US\$)
Microscopia	30,712.94	-
OptiMal Teste Rápido	-	143,224.18
Luvas de látex para usar com TDR	-	771.68
Salário do técnico de microscópio	23,826.86	-
Salário dos técnicos em saúde	17,557.55	17,557.55
Microscópios	3,059.56	-
Manutenção dos Microscópios	232.26	-
Transporte	18,272.90	9,136.45
Treinamento	133,653.46	1,392.22
Custo de Diagnóstico	227,315.53	172,082.09

Figura 15: Custo total das estratégias de diagnóstico para 33 mil exames na região Amazônica, Brasil, em 2006. Adaptado de OLIVEIRA et al 2010.

O alto custo ainda agregado aos TDRs em relação a microscopia (Figura 15) é um fator motivador para o incentivo em pesquisas e desenvolvimento visando o diagnóstico. Em 2016, estima-se que \$85 milhões foram investidos apenas em estudos visando o diagnóstico de malária (WHO, 2017). No Brasil, não considerando os fatores adicionais, o valor do TDR é aproximadamente 5 vezes maior que o da microscopia, principalmente devido à ausência de testes de origem nacional, o que aumenta significativamente o seu custo de distribuição, sendo este um dos fatores da baixa adesão ao uso de TDR (Figura 14).

Em trabalhos anteriores foi desenvolvida uma proteína recombinante de PvLDH (LDH de *Plasmodium vivax*) com a intenção de elaborar um imunoenensaio utilizando os anticorpos policlonais obtidos. Foi então proposto um ELISA sanduíche no qual se obteve sucesso para avaliar infecção de pacientes com malária por *P. vivax* (SOUSA et al., 2014), não apresentando reações cruzadas com infecções por *P. falciparum*. No entanto, estes anticorpos não demonstraram um bom desempenho quando aplicados em testes de fluxo lateral. A proteína PvLDH possui aproximadamente 312 aminoácidos (AVILA et al., 2002) e, dentre os possíveis problemas enfrentados, destaca-se a ausência de controle da estrutura onde o anticorpo será formado.

Visando solucionar este problema, foi proposta a utilização de peptídeos sintéticos. Sua aplicação tem sido amplamente utilizada para o desenvolvimento de vacinas, uma vez

que utiliza uma quantidade mínima de epítomos imunogênicos para desencadear uma resposta imune adequada. Além disso, esta técnica permite uma abordagem multi-epítomo, na qual são escolhidos vários epítomos imunogênicos de uma única proteína, permitindo uma cobertura maior da diversidade antigênica do patógeno (SKWARCZYNSKI et al., 2016).

Em estudo realizado com Hurdal e colaboradores (2010), foram produzidos anticorpos anti-peptídeos de LDH de *P. falciparum*, de *P. vivax* e LDH pan específico (*P. falciparum* + *P. vivax*), os quais se mostraram capazes de detectar e distinguir infecções maláricas entre *P. vivax* e *P. falciparum*, demonstrando que esse tipo de estratégia pode ser eficaz para diagnóstico. Porém, este estudo não avaliou o desempenho dos anticorpos obtidos por meio de testes em fluxo lateral.

Sendo assim, o presente trabalho propôs a obtenção e a confirmação de reconhecimento de anticorpos obtidos contra peptídeos sintéticos de regiões específicas da proteína LDH de *Plasmodium* à proteína nativa, para aplicação em diagnóstico de infecções maláricas. A utilização desses anticorpos pode ser uma saída para a obtenção de uma ferramenta de diagnóstico que seja eficiente para detecção de malária tanto na utilização em imunoenaios, quanto em uma futura aplicação em testes de fluxo lateral, garantindo a especificidade necessária para essas aplicações.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver anticorpos policlonais para diagnóstico de malária a partir de peptídeos sintéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar peptídeos referentes a regiões específicas da pLDH, *Pf*LDH e *Pv*LDH (LDH Pan específica, LDH de *Plasmodium falciparum* e LDH de *Plasmodium vivax*);
- Obter anticorpos policlonais contra os peptídeos produzidos;
- Confirmar o reconhecimento dos anticorpos policlonais obtidos com à proteína LDH nativa.

3. METODOLOGIA

3.1 MODELO DE ESTUDO

O trabalho realizado foi um estudo de pesquisa aplicada, no qual se esperou obter marcadores específicos de infecção malárica por meio da produção de anticorpos policlonais contra regiões da proteína pLDH, tanto escolhidas por Hurdal e colaboradores (2010), sendo chamadas de P1 a P3, selecionadas neste projeto, chamadas de P4 a P6. O estudo foi realizado em ambiente laboratorial e de caráter prospectivo.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi desenvolvido com camundongos requeridos para pesquisas e vinculado ao projeto “Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra proteína LDH de *Plasmodium vivax*”, deferido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), com CEUA-INPA 003/2015 (Anexo 1). As técnicas de experimentação foram executadas no Biotério Central do INPA. As amostras de sangue utilizadas são provenientes de coletas realizadas sob o comitê de ética da Universidade Federal do Amazonas, CAAE: 57293216.3.0000.0005.

3.3 DESENHO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Foi realizada uma análise com ferramentas de bioinformática para desenho dos peptídeos referentes a três regiões da proteína LDH de plasmódio. Utilizou-se a plataforma de bioinformática NCBI - *National Center for Biotechnology Information* – (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a obtenção das sequências da proteína LDH específica de *P. falciparum* (PDB ID: 1CEQ_A), *P. vivax* (GenBank ID: AFZ62592.1) e LDH de humano (GeneBank ID: CAE11711.1). As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal Ômega (<http://www.clustal.org/omega/>) e utilizada a ferramenta de predição de epítomos do IEDB - *Immuno Epitope Database and Analysis Resource* – (http://www.iedb.org/home_v3.php), no qual foram analisados parâmetros como semelhança de sequências entre as espécies, hidrofiliçidade e acessibilidade de epítomos. Foram selecionadas regiões comuns entre as espécies, pertencentes a epítomos com alta acessibilidade na estrutura tridimensional e alta hidrofiliçidade.

As sequências de aminoácidos escolhidos neste estudo e as sequências de três peptídeos propostos por Hurdal e colaboradores (2010) foram enviadas para análise na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em colaboração com o professor Dr. Ricardo Andréz Machado de Ávila. Após confirmação e correção das sequências, foi iniciada a síntese química dos peptídeos utilizando uma adaptação da técnica *Solid-Phase Peptide Sintesis* (MACHADO DE AVILA et al., 2011; MERRIFIELD, 1969), realizada por meio da mesma colaboração.

3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

As imunizações foram realizadas utilizando o adjuvante comercial KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin - Sigma-Aldrich[®]), que consiste na proteína hemocianina que possui a função de carreadora de oxigênio no sangue de moluscos e artrópodes. A hemocianina de *Megathura crenulata* é reconhecidamente imunogênica, sendo largamente utilizada como adjuvante experimental em animais, tendo a vantagem de possuir uma grande distância evolutiva com os animais geralmente utilizados em pesquisas experimentais, possibilitando a produção de anticorpos específicos (HARRIS; MARKL, 1999; LATEEF et al., 2007).

O acoplamento dos peptídeos ao adjuvante KLH foi feito antes de cada uma das imunizações, por meio da ligação covalente promovida pelos agentes químicos EDAC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] em concentração final de reação de 1,1mg/mL e NHS (N-hidroxissuccinimida), concentração final 100ng/mL, adicionados a 5mM de tampão MOPS [ácido 3-(N-mofolino)propanesulfônico], 0,4mg/mL de KLH e 1mg/mL de cada um dos peptídeo sintéticos.

Para esses ensaios, camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com 6 a 8 semanas de idade foram imunizados via intraperitoneal com 100µg dos peptídeos acoplados ao carreador juntamente com adjuvante de Freund (1:1), que funcionou como emulsificante da solução. No total foram imunizados seis peptídeos diferentes de *pLDH*, totalizando 6 grupos teste, e um grupo controle imunizado apenas com o KLH e adjuvante de Freund, formando assim, o grupo controle. Cada grupo continha três camundongos. Foram realizadas 6 imunizações com intervalos de 7 dias, seguidas de um *booster* adicional. Para a avaliação do progresso, os soros dos camundongos foram coletados após cada imunização e testados por ELISA indireto. Após

o *booster*, foi retirado o sangue total. A eutanásia foi feita por meio da anestesia dos camundongos seguido de deslocamento da cervical. O descarte das carcaças ficou a cargo da equipe técnica do Biotério Central do INPA.

3.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS

3.5.1 ELISA Indireto

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo Harlow e Lane (1988), com a finalidade de avaliar a aquisição de anticorpos pelos camundongos em decorrência às imunizações. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com cada um dos seis peptídeos *pLDH*, em duplicata para cada soro de camundongo, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9.6) *overnight* a 4° C. Em seguida, ocorreram 5 lavagens com PBS 1X, e bloqueio com PBS 1X+BSA 3%, adicionando-se 300µl/poço, e estes foram incubados a 37°C durante 1 hora. Os soros provenientes das imunizações foram diluídos em tampão de bloqueio a 1/100 e adicionados aos poços, seguido por uma incubação em câmara úmida em estufa a 37°C por 1h. Após este período, foram realizadas 5 lavagens com PBS 1X. Anticorpos anti-IgG de camundongo biotinizados foram diluídos 1/2000 em tampão de bloqueio e então adicionados nos poços e incubados a 37°C por 1 hora e, em seguida, lavados 5 vezes em PBS 1X. Foi realizada uma etapa adicional utilizando a estreptavidina acoplada com peroxidase nas mesmas condições citadas acima. Para a revelação da reação, foi adicionada a substância cromogênica Tetrametilbenzidina (TMB - Sigma) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 10 minutos e interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2M. Os dados foram obtidos por leitor de ELISA em um filtro de absorbância de 450nm. O *cut-off* foi calculado pela média da densidade ótica (DO) dos soros controles somado ao dobro do desvio padrão obtido.

3.6 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS EM COLUNA DE PROTEÍNA G

A coluna contendo resina de Proteína G Sepharose (Sigma) foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação (Fosfato de sódio 0,02M, pH 7.0). Os soros dos camundongos foram diluídos 1:10 em tampão de ligação e colocados na coluna, seguidos por lavagens com 15mL

de tampão de ligação. A resina foi eluída com 3 a 5mL de tampão de eluição (Glicina 0,1M, pH 2.7) e coletado em microtubos de 1,5mL. Em cada microtubo com soro purificado foi adicionado 50µl de tampão neutralizador (Tris HCL 1M, pH 9.0). Após a purificação, a coluna foi lavada com tampão de ligação (5 a 10mL) e armazenada com etanol 30%. A purificação foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE 12% a 100V por uma hora.

3.7 CONFIRMAÇÃO DO RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DESENVOLVIDOS PELA *p*LDH NATIVA

3.7.1 Imunofluorescência Indireta

Para a realização da imunofluorescência foi realizado o protocolo padronizado por Sanz et al., (2013), brevemente descrito a seguir. Utilizaram-se lâminas contendo hemácias parasitadas com *P. vivax*, pré-fixadas em trabalhos anteriores por imersão em acetona gelada, (BEZERRA, 2016), confeccionadas no Hospital de Medicina Tropical. As lâminas foram bloqueadas com PBS-BSA 3% por 30 minutos e foi adicionado os anti-peptídeos obtidos diluídos em tampão de bloqueio a 1mg/mL e incubados por 1h a 37°C em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes por imersão em PBS por 2 minutos. Foi adicionado o anticorpo fluorescente Alexa 488 Fluor (Thermofisher scientific) como anticorpo secundário, diluído a 1:1000 em tampão de bloqueio, e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes por imersão em PBS por 2 minutos. Ao final do processo, foram adicionadas gotas de glicerina e coberto com lamínulas sem fazer bolhas. Foram realizadas lâminas adicionais coradas com DAPI ou brometo de etídio por 10 minutos em temperatura ambiente para observar o padrão de integridade celular de acordo com o DNA. As amostras foram lidas em microscópio de imunofluorescência nas objetivas de 40X e 60X.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

Uma revisão bibliográfica discorrendo sobre métodos de diagnóstico foi realizada e aceita para publicação na revista *Scientia Amazonia* (ANEXO 7.2).

4.2 SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Neste estudo, realizamos a análise e produção de anticorpos provenientes de peptídeos sintéticos da proteína *pLDH*. Em estudos anteriores (SOUZA et al., 2014), esta proteína foi produzida de forma recombinante e utilizada para obtenção de anticorpos com a finalidade de diagnóstico. Contudo, os produtos gerados apresentaram aplicabilidade em testes tipo ELISA, porém não em testes de diagnóstico rápido.

Para solucionar este problema, foi proposta utilização de peptídeos sintéticos como estratégia de obtenção de anticorpos. Peptídeos com tamanho de 10-20 aminoácidos são considerados ideais como antígenos, uma vez que adotam uma conformação específica própria, que não necessariamente reflete a conformação da proteína nativa. Virtualmente isso significa que qualquer sequência pode ser tornar imunogênica se for apresentada ao sistema imune da maneira correta. Contudo, existem ainda muitos fatores que influenciam nesta resposta, como por exemplo, a hidrofiliçidade, antigenicidade, reconhecimento por células B, dentro outros. Logo, são recomendados para a otimização da busca de peptídeos de interesse, o uso de diferentes regiões de uma mesma proteína e imunizar mais de animal com cada peptídeo, pois muitas vezes os anticorpos gerados podem funcionar de maneiras diferentes em cada ensaio (HANCOCK; O'REILLY, 2005).

A análise dos epítomos pelo programa IEDB se mostrou efetiva para realizar a triagem *in silico* das sequências de LDH. As regiões com as maiores taxas referentes à hidrofiliçidade (Figura 16) de acessibilidade (Figura 17) da sequência de aminoácidos de LDH comum às espécies de *P. falciparum* e *P. vivax* (PDB ID: 1CEQ_A), aqui chamada de sequência Pan específica, se encontra na posição 96-110. Apesar do pico não ser positivo para o parâmetro de hidrofiliçidade, esta região foi escolhida por apresentar acessibilidade satisfatória quando analisada em sua estrutura tridimensional (Figura 24A), característica importante para

antígenos empregados na obtenção anticorpos, pois facilita assim o reconhecimento de anticorpos (SARAVANAN; BABU, 2010) e também por ser a única que além de possuir acessibilidade na superfície da proteína nativa, diferir da sequência escolhida por Hurdayal et al (2010).

Para a sequência de LDH específica para *P. falciparum* (PDB ID: 1CEQ_A), a região que demonstrou especificidade de sequência, bem como picos positivos de hidrofiliidade e acessibilidade, compreende a região 275-288 (Figura 18 e 19). Para a sequência de LDH específica para *P. vivax* (GenBank ID: AFZ62592.1), os epítotos preditos positivos para a hidrofiliidade (Figura 20) e acessibilidade (Figura 21) estão na região 274-288, distinguindo-se apenas em 4 aminoácidos da sequência específica do *P. falciparum*.

De maneira similar ao proposto neste estudo, por Hurdayal e colaboradores (2010) propôs a produção de anticorpos para aplicação em TDR por peptídeos sintéticos comum as espécies de *Plasmodium* (APGKSDKEWNRDDL), um específico para *P. falciparum* (LISDAELEAIFDC) e um específico para *P. vivax* (KITDEEVEGIFDC). Como resultados, os anticorpos produzidos apresentaram boa reatividade quando testados em “western blot” utilizando proteínas recombinantes, porém não chegaram a ser aplicados em testes de fluxo lateral.

Para este estudo, foram selecionadas as regiões referentes aos peptídeos de LDH de *P. vivax*, *P. falciparum* e uma região em comum para as duas espécies - Pan específica - foram escolhidas (Figura 22). Também foram sintetizadas as sequências peptídicas propostas por Hurdayal e colaboradores (2010) (Figura 23).

Todas as sequências sintetizadas no laboratório coordenado pelo Dr. Ricardo Andréz Machado de Ávila (UNESC) para este estudo podem ser encontradas sumarizadas abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de peptídeos selecionados para síntese no Departamento de Bioquímica (UNESC)

Especificidade de Epítotos	Selecionados por Hurdayal et al., 2010	Selecionados neste Estudo	Nomenclatura neste Estudo
<i>Plasmodium vivax</i>	KITDEEVEGIFDC		P1
Pan específico (<i>P. vivax</i> + <i>P. Falciparum</i>)	APGKSDKEWNRDDL		P2
<i>Plasmodium falciparum</i>	LISDAELEAIFDC		P3

<i>Plasmodium falciparum</i>	GGTPVVGANGVEQ	P4
Pan específico (<i>P. vivax</i> + <i>P. Falciparum</i>)	DDLLPLNNKIMIEIG	P5
<i>Plasmodium vivax</i>	GGTPLVIGGTGVEQ	P6



Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

```
1 MTPKPKIVLV GSGMIGGVMA TLIVQKNLGD VVDFVVKNM POGKALDTSN SNVMAYSNCK
61 VTGSNSYDDL KGADVVIV TAGFTKAPGK SDKEWNRDD LPLNKKIMIE IGGHIKNLCP
121 NAFIIVVTNP VDVVMQLLFE HS GVPKKNK IIGLGGVLDL SRLKYYISQK LNVCPDQVNA
181 LIVGAHGKMK VLLKRYITVG GIPLQEFINN KKIT DEEV EGIFDRTVNT ALEIVNLLAS
241 PYVAPAAAIIE EMAESYLKDI KKVLCVSTLL EGQYGHSNIF GGTPLV IG GTGVEQVIEL
301 QLNAAEKTGF DEAVAETKRM KALI
```

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.064 Recalculate

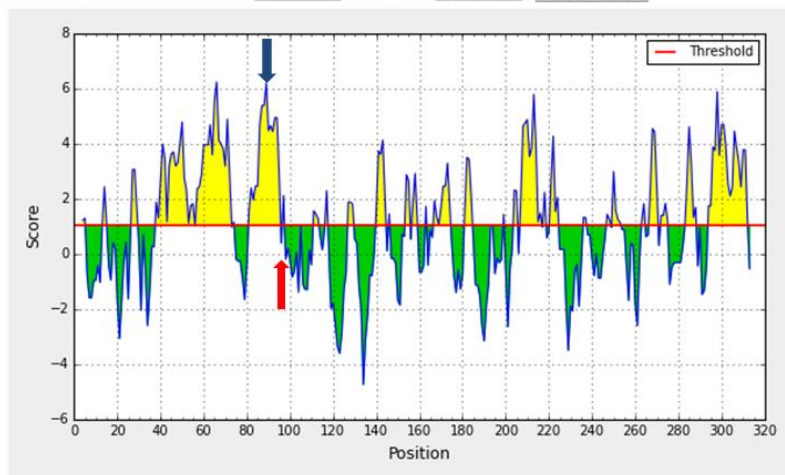


Figura 17: Análise de epítipo Pan específico (*P. falciparum* + *P. vivax*) quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em vermelho está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdayal et al., (2010), em marrom o local onde as sequencias se sobrepõem. A seta vermelha indica a região 96-110 (PDB: 1CEQ_A), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico negativo indicando predição de acessibilidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdayal et al., (2010).



Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

```
1 MTPKPKIVLV GSGMIGGVMA TLIVQKNLGD VVDFVVKNM POGKALDTSN SNVMAYSNCK
61 VTGSNSYDDL KGADVVIV TAGFTKAPGK SDKEWNRDD LPLNKKIMIE IGGHIKNLCP
121 NAFIIVVTNP VDVVMQLLFE HS GVPKKNK IIGLGGVLDL SRLKYYISQK LNVCPDQVNA
181 LIVGAHGKMK VLLKRYITVG GIPLQEFINN KKIT DEEV EGIFDRTVNT ALEIVNLLAS
241 PYVAPAAAIIE EMAESYLKDI KKVLCVSTLL EGQYGHSNIF GGTPLV IG GTGVEQVIEL
301 QLNAAEKTGF DEAVAETKRM KALI
```

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate

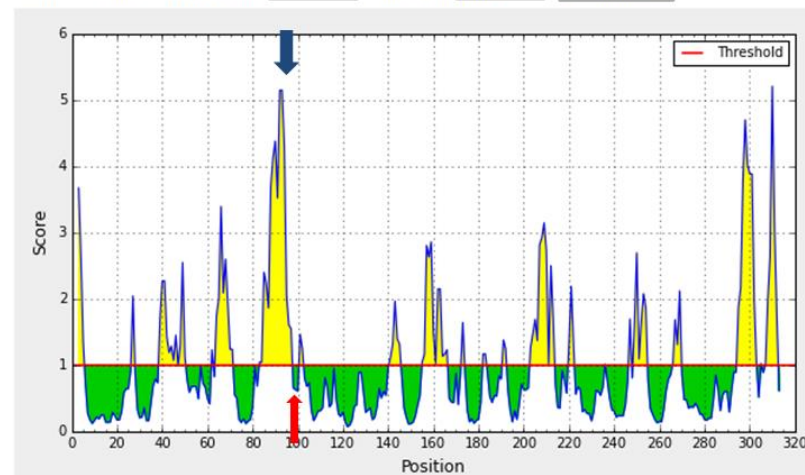


Figura 16: Análise de epítipo Pan específico (*P. falciparum* + *P. vivax*) quanto sua hidrofiliçidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em vermelho está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdayal et al., (2010), em marrom o local onde as sequencias se sobrepõem. A seta vermelha indica a região 96-110 (PDB: 1CEQ_A), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico indicando uma predição de boa hidrofiliçidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdayal et al., (2010).



Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

```
1 MAPKAKIV LVGSGMIGGV MATLIVQKNL GDVFLDIVK NMPHGKALDT SHTNMAYSN
61 CKVSGSNTYD DL AGADVV IVTAGFTKAP GKSDKEWNRD DLLPLNKKIM IEIGGHKKN
121 CPNAFIIIVT NPVDVMVQLL HQHS GVPK NKIIGLGGVL DTSRLKYYIS QKLNVCPRDV
181 NAHIVGAHGN KMVLLKRYIT VGGIPLQEFI NNLKIS DA ELEAIFDRTV NTALEIVNLH
241 ASPYVAPAAA IIEMAESYLK DLKVKLICST LLEGQYGHSD IFGGTPVV LGANGVEQVI
301 ELQLNSEEKA KFDEAIAETK RMKALA
```

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.058 Recalculate

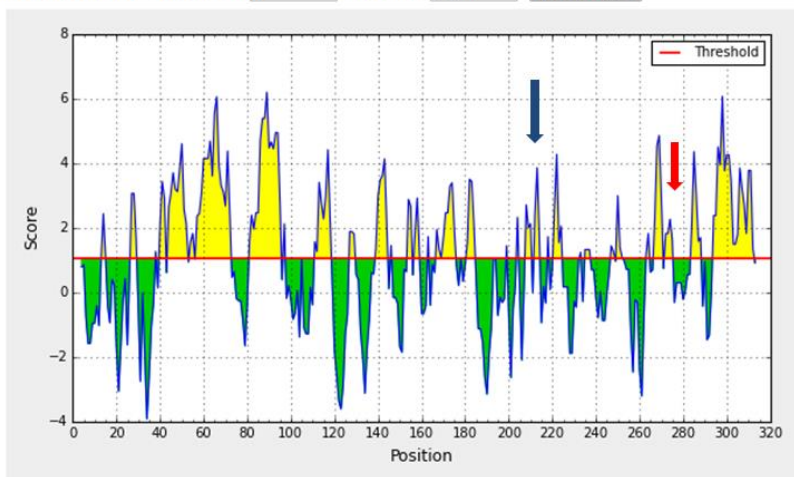


Figura 19: Análise de epítipo *P. falciparum* específico quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em verde está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdayal et al., (2010). A seta vermelha indica a região 275-288 (PDB: 1CEQ_A), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico positivo para predição de acessibilidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdayal et al., (2010).

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

```
1 MAPKAKIV LVGSGMIGGV MATLIVQKNL GDVFLDIVK NMPHGKALDT SHTNMAYSN
61 CKVSGSNTYD DL AGADVV IVTAGFTKAP GKSDKEWNRD DLLPLNKKIM IEIGGHKKN
121 CPNAFIIIVT NPVDVMVQLL HQHS GVPK NKIIGLGGVL DTSRLKYYIS QKLNVCPRDV
181 NAHIVGAHGN KMVLLKRYIT VGGIPLQEFI NNLKIS DA ELEAIFDRTV NTALEIVNLH
241 ASPYVAPAAA IIEMAESYLK DLKVKLICST LLEGQYGHSD IFGGTPVV LGANGVEQVI
301 ELQLNSEEKA KFDEAIAETK RMKALA
```

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate

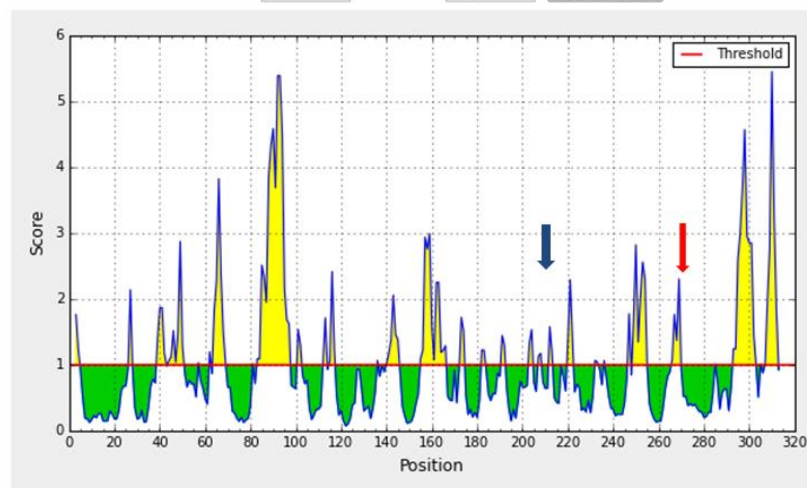


Figura 18: Análise de epítipo *P. falciparum* específico quanto sua hidrofiliidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em verde está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdayal et al., (2010). A seta vermelha indica a região 275-288 (PDB: 1CEQ_A), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico positivo para predição de hidrofiliidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdayal et al., (2010).



Parker Hydrophilicity Prediction Results

Input Sequences

```
1 MTPKPKIV LVGSGHIGGV MATLIVQKNL GDVVMFDVVK NMPQ GKALDT SHSNVMAYSN
61 CKVTGSNSYD DL KGADVV IVTAGFTKAP GKSDKEWNRD DLLPLNNKIM IEIGGHKKNL
121 CPNAFIIVVT NPVDVMVQLL FEHS GVPK NKIIGLGGVL DTSRLKYYIS QKLNVCPRDV
181 NALIVGAHGN KMWLLKRYIT VGGIPLQEFI NKKKIT DE EVEGIFDRTV NTALEIVNLL
241 ASPYVAPAAA IEMAESYLK DIKKVLVCSST LLEGQYGHSN IFGGTPLV IGGTGVEQVI
301 ELQLNAEEKT KFDEAVAETK RNMKALI
```

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.064 Recalculate

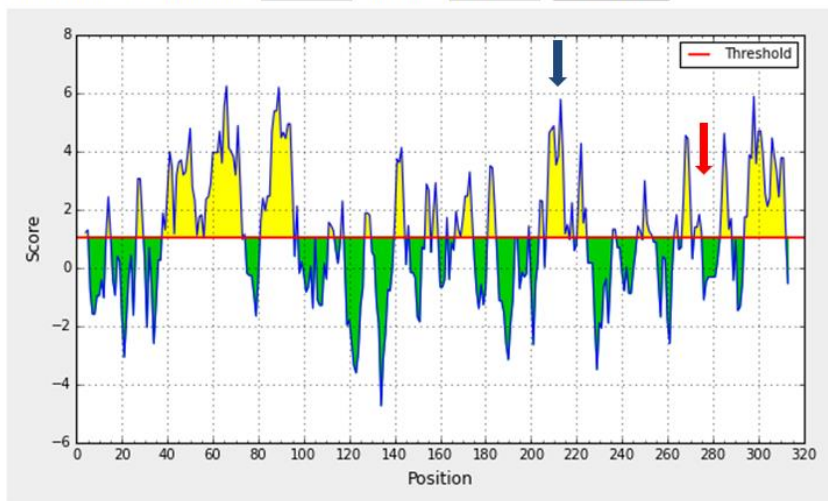


Figura 21: Análise de epítipo *P. vivax* específico quanto sua acessibilidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em laranja está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdal et al., (2010). A seta vermelha indica a região 274-288 (GenBank: AFZ62592.1), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico positivo para predição de acessibilidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdal et al., (2010).

Emini Surface Accessibility Prediction Results

Input Sequences

```
1 MTPKPKIV LVGSGHIGGV MATLIVQKNL GDVVMFDVVK NMPQ GKALDT SHSNVMAYSN
61 CKVTGSNSYD DL KGADVV IVTAGFTKAP GKSDKEWNRD DLLPLNNKIM IEIGGHKKNL
121 CPNAFIIVVT NPVDVMVQLL FEHS GVPK NKIIGLGGVL DTSRLKYYIS QKLNVCPRDV
181 NALIVGAHGN KMWLLKRYIT VGGIPLQEFI NKKKIT DE EVEGIFDRTV NTALEIVNLL
241 ASPYVAPAAA IEMAESYLK DIKKVLVCSST LLEGQYGHSN IFGGTPLV IGGTGVEQVI
301 ELQLNAEEKT KFDEAVAETK RNMKALI
```

Center position: 3 Window size: 6 Threshold: 1.000 Recalculate

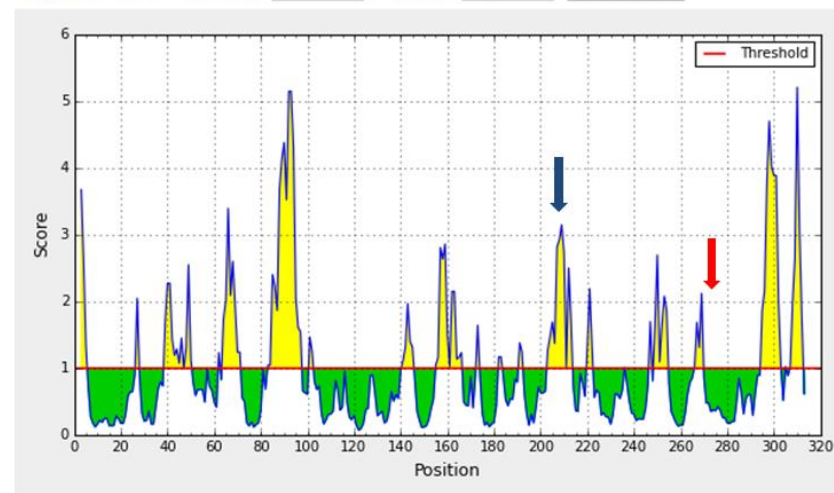


Figura 20: Análise de epítipo *P. vivax* específico quanto sua hidrofiliidade, feita pelo programa IEDB. Marcada em laranja está sequência selecionada para síntese, em azul a sequência de Hurdal et al., (2010). A seta vermelha indica a região 274-288 (GenBank: AFZ62592.1), que compreende os aminoácidos selecionados, que mostra um pico positivo para predição de hidrofiliidade. A seta azul indica a região correspondente a sequência de Hurdal et al., (2010).


```

LDH-Humano  MATLKEKLIAPVAEEATVPNNKITVVGVGQVGMACAISILGKSLADELALVDVLEDKLK
PflDH       -----MAPKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD-VVLFDIVKNMMPH
PvLDH       -----MTPKPKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD-VVMFDVVKMMPQ
              .*: **:*** * * . * * :*:**.* :.:*.: : :

```

```

LDH-Humano  GEMMDLQHGSFL-QTPKIVADKDYSVTANSKIVVVTAGVRQEGESRLNL-----VQRN
PflDH       GKALDTSHTNMVAYSNCVKVSGSNTYDDLADGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDLLPLN
PvLDH       GKALDTSHTNMVAYSNCVKVSGSNTYDDLADGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDLLPLN
              *: * . * . : : . * : : : * . : : : * : : : * : : : * : : *

```

```

LDH-Humano  VNVFKFIIPQIVKYSKPCIIIVSNPVDILTYVTNKLSGLPKHRVIGSGCNLDSARFRYL
PflDH       NKIMIEIGGHIKKNCNPAFIIVVTNPVDVMVQLLHQHSGVKPKNKIIGLGGVLDTSRLKYY
PvLDH       NKIMIEIGGHIKKNCNPAFIIVVTNPVDVMVQLLFEHSGVKPKNKIIGLGGVLDTSRLKYY
              : : * * : * . : . : * : : : * : : : * : : : * : : : *

```

```

LDH-Humano  MAEKLGIHPSSCHGWILGEHGSSVAWVSGVNVAGVSLQELNPEMGTDNDSENKVEVHKM
PflDH       ISQKLNVCPRDVNAHIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNKLISD--AELEAIFDR
PvLDH       ISQKLNVCPRDVNALIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNKITD--EEVEGIFDR
              : : * : * . . . * : * : * . * : . : * : * : * : : : : :

```

```

LDH-Humano  WESAYEVIKLGKGTNNAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTMVKGMYGIENEVFLSLPC
PflDH       TVNTALEIVNLHASPYPVAPAAAIEMAESYLKDKKVLICSTLLEGGYGHS-DIFGGTPV
PvLDH       TVNTALEIVNLHASPYPVAPAAAIEMAESYLKDKKVLICSTLLEGGYGHS-NIFGGTPL
              . : * * : * : * . * . : : : * * : : : : * : : * * . : * *

```

```

LDH-Humano  ILNARGLTSVINQKLDDEVAQLKKSADTLWDIQDKLDL-
PflDH       VLGANGVEQVIELQLNSEEKAKFDEAIAE----TKRMKALA
PvLDH       VIGGTGVEQVIELQLNAEEKTKFDEAVAE----TKRMKALI
              : : . * : * : * : * : * : : : : * : * *

```

Figura 22: Alinhamento das proteínas LDH humanos (de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*) feito através do Clustal Ômega. Marcadas em amarelo, rosa e verde estão as sequências de aminoácidos selecionadas para produção de peptídeos Pan específico (*PfLDH*+*PvLDH*) (P5), *P. falciparum* específico (P4) e *P. vivax* específico (P6), respectivamente. Números de acesso: LDH humana: GeneBank ID: CAE 11711.1, *PfLDH*: PDB: 1CEQ_A 0141 e *PvLDH*: GenBank: AFZ62592.1.

```

LDH-Humano  MATLKEKLIAPVAEEATVPNNKITVVGVGQVGMACAISILGKSLADELALVDVLEDKLK
PflDH       -----MAPKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD-VVLFDIVKNMMPH
PvLDH       -----MTPKPKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGD-VVMFDVVKMMPQ
              .*: **:*** * * . * * :*:**.* :.:*.: : :

```

```

LDH-Humano  GEMMDLQHGSFL-QTPKIVADKDYSVTANSKIVVVTAGVRQEGESRLNL-----VQRN
PflDH       GKALDTSHTNMVAYSNCVKVSGSNTYDDLADGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDLLPLN
PvLDH       GKALDTSHTNMVAYSNCVKVSGSNTYDDLADGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDLLPLN
              *: * . * . : : . * : : : * . : : : * : : : * : : *

```

```

LDH-Humano  VNVFKFIIPQIVKYSKPCIIIVSNPVDILTYVTNKLSGLPKHRVIGSGCNLDSARFRYL
PflDH       NKIMIEIGGHIKKNCNPAFIIVVTNPVDVMVQLLHQHSGVKPKNKIIGLGGVLDTSRLKYY
PvLDH       NKIMIEIGGHIKKNCNPAFIIVVTNPVDVMVQLLFEHSGVKPKNKIIGLGGVLDTSRLKYY
              : : * * : * . : . : * : : : * : : : * : : : * : : : *

```

```

LDH-Humano  MAEKLGIHPSSCHGWILGEHGSSVAWVSGVNVAGVSLQELNPEMGTDNDSENKVEVHKM
PflDH       ISQKLNVCPRDVNAHIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNKLISD--AELEAIFDR
PvLDH       ISQKLNVCPRDVNALIVGAHGNKMVLLKRYITVGGIPLQEFINNKITD--EEVEGIFDR
              : : * : * . . . * : * : * . * : . : * : * : * : : : : :

```

```

LDH-Humano  WESAYEVIKLGKGTNNAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTMVKGMYGIENEVFLSLPC
PflDH       TVNTALEIVNLHASPYPVAPAAAIEMAESYLKDKKVLICSTLLEGGYGHS-DIFGGTPV
PvLDH       TVNTALEIVNLHASPYPVAPAAAIEMAESYLKDKKVLICSTLLEGGYGHS-NIFGGTPL
              . : * * : * : * . * . : : : * * : : : : * : : * * . : * *

```

```

LDH-Humano  ILNARGLTSVINQKLDDEVAQLKKSADTLWDIQDKLDL-
PflDH       VLGANGVEQVIELQLNSEEKAKFDEAIAE----TKRMKALA
PvLDH       VIGGTGVEQVIELQLNAEEKTKFDEAVAE----TKRMKALI
              : : . * : * : * : * : * : : : : * : * *

```

Figura 23: Alinhamento das proteínas LDH humana (de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*) feito através do Clustal Ômega. Marcadas em roxo, azul e laranja estão as sequências de aminoácidos selecionadas por Hurdayal et al. (2010) para produção de peptídeos Pan específico (*PfLDH*+*PvLDH*) (P2), *P. falciparum* específico (P3) e *P. vivax* específico (P1), respectivamente. Números de acesso: LDH humana: GeneBank ID CAA32033, *PfLDH*: PlasmoDB ID: PF13-0141 e *PvLDH*: PlasmoDB PVX-116630.

Uma vez que a localização de superfície dos antígenos é necessária para aumentar as chances de interação dos anticorpos obtidos com a proteína nativa (HURDAYAL et al., 2010), foram acessadas o posicionamento espacial das sequências selecionadas diretamente na estrutura 3D das proteínas *Pv*LDH e *Pf*LDH depositadas no “Protein data bank” - PDB (sob o código de acesso 2a94 e 5hs4, respectivamente), confirmando a disponibilidade das sequências nas regiões mais superficiais da proteína (Figura 24).

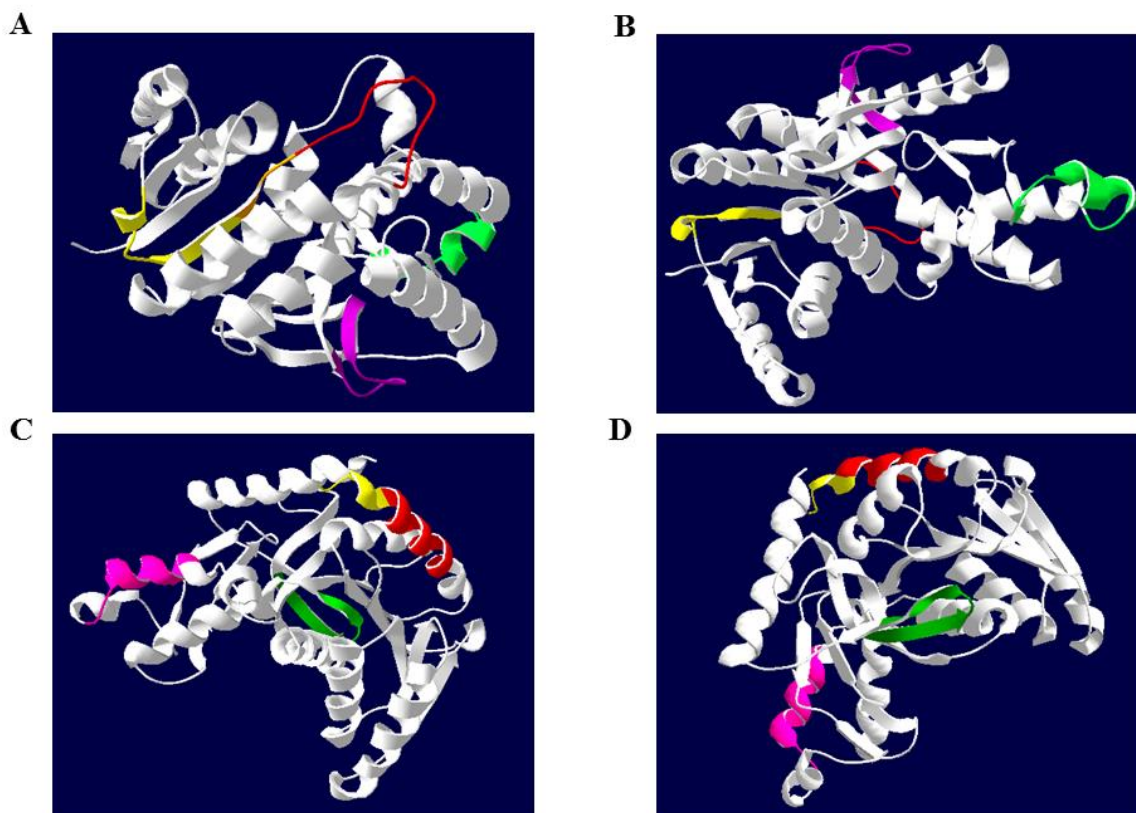


Figura 24: Estruturas em 3D de subunidades de *p*LDH, visualizadas através do programa PDB Viewer. A e B correspondem a estrutura 3D de uma das subunidades da LDH de *P. falciparum* (*Pf*LDH) em dois pontos de vista diferentes. A coloração amarela corresponde ao pan-específico (P2) e roxo *Pf*LDH específico (P3) utilizados por Hurdayal et al. (2010); vermelho pan-específico (P5) e verde *Pf*LDH específico (P4) selecionados neste estudo. Marcada em laranja, estão os quatro aminoácidos nos quais as duas sequências se sobrepõe (96-99) C e D correspondem a estrutura 3D de uma subunidade da LDH de *P. vivax* (*Pv*LDH) em dois pontos de vista diferentes. A coloração amarela corresponde ao pan-específico (P2) e roxo *Pv*LDH (P1) específico utilizados por Hurdayal et al. (2010); vermelho pan-específico (P5) e verde *Pv*LDH específico (P6) selecionados neste estudo.

4.3 AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Para avaliação da resposta de produção de anticorpos específicos dos camundongos contra os peptídeos propostos, foram realizados ELISAs indiretos para quantificação da DO. Os resultados estão dispostos na Figura 25.

As imunizações para os peptídeos P3, P4, P5 e P6 (Tabela 1) não atingiram a DO superior ao *cut-off* estabelecido (DO 0.8) após as 7 imunizações (Figuras 25 C-F). Somente os peptídeos PvLDH (Figura 25A) específico e pLDH (Figura 25B) desenvolvidos por Hurdayal e colaboradores (2010) apresentaram respostas superiores a DO 1.0.

O *cut-off* apresentou valores elevados devido ao alto reconhecimento dos anticorpos gerados pelos soros negativos, sugerindo uma possível reatividade cruzada com o carreador KLH.

Apesar das várias vantagens do KLH em relação a outros carreadores - devido a sua alta imunogenicidade e distância evolutiva com os animais mais utilizados em pesquisas para obtenção de anticorpos policlonais - relatadas em outros trabalhos (HARRIS; MARKL, 1999; LATEEF et al., 2007), neste estudo não atuou como um bom carreador para imunização com peptídeos sintéticos. Esta baixa obtenção de específicos pode ser devido uma série de fatores, como modificações nos peptídeos e na sua antigenicidade causadas pelo processo de acoplamento e instabilidade das moléculas conjugadas (BRIAND; MULLER; VAN REGENMORTEL, 1985; GOMEZ-SANCHEZ et al., 2014).

Uma alternativa para diminuir a reatividade inespecífica seria utilizar como moléculas carreadoras que não geram anticorpos, tais como os nanotubos de carbono (PANTAROTTO et al., 2003; SILVESTRE et al., 2014; TLILI et al., 2010). Tendo em vista o potencial dessas moléculas como carreador, em etapas posteriores a esse trabalho, nanotubos de carbonos solubilizados por uma técnica desenvolvida em estudos anteriores realizados por nossa equipe serão empregados para imunização em animais visando obtenção de maiores títulos de anticorpos específicos.

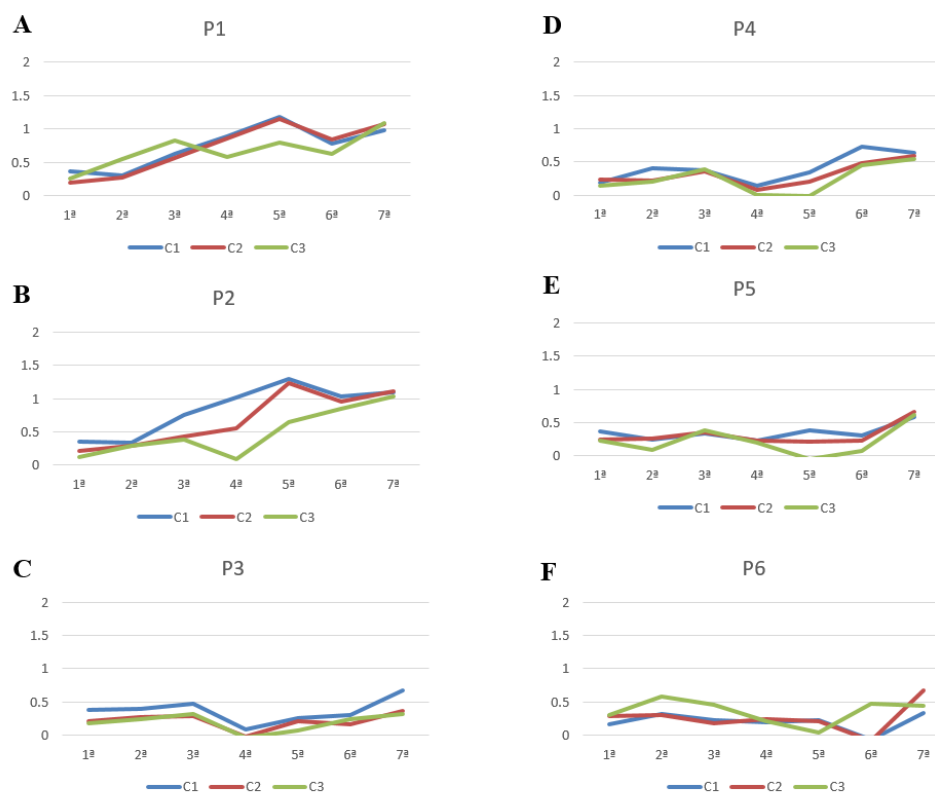


Figura 25: Gráfico de ELISA de soros de camundongos contra os peptídeos sintéticos. A-C) Resposta do grupo de camundongos imunizados com o peptídeos P1, P2 e P3, sendo *PvLDH*, *pLDH*, *PfLDH* de Hurdal et al., 2010, respectivamente. D-E) Resposta do grupo de camundongos imunizados com o peptídeos P4, P5 e P6, sendo *PfLDH*, *pLDH*, *PvLDH* deste estudo, respectivamente.

Após as imunizações, somente os anti-peptídeos P1 e P2 foram purificados e quantificados pelo reagente de Bradford (Sigma Aldrich), ficando com em concentração final de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A coluna de proteína *G-sepharose* foi eficiente em purificar os anticorpos em estudo, como visualizado na Figura 26. A baixa concentração e volume de anticorpos produzidos é resultante do fato de que o modelo animal utilizado para obtenção desses anticorpos, camundongos, são animais de pequeno porte. O uso desse modelo não apresenta a escalabilidade necessária para obtenção de ferramentas de diagnóstico que possam compor um TDR nacional. Problemática que pode ser sanada com a aplicação da tecnologia IgY, utilizando anticorpos produzidos em galinhas.

A tecnologia IgY, oferece uma alternativa mais ética em comparação à experimentação animal em mamíferos, dispensando a sangria dos animais a cada imunização e possuem maior custo benefício produzindo uma quantidade de anticorpos específicos muito superior à obtida com animais de menor porte com camundongos ou coelhos (ERHARD; SCHMIDT; ZINSMEISTER, 2000; LI et al., 2015).

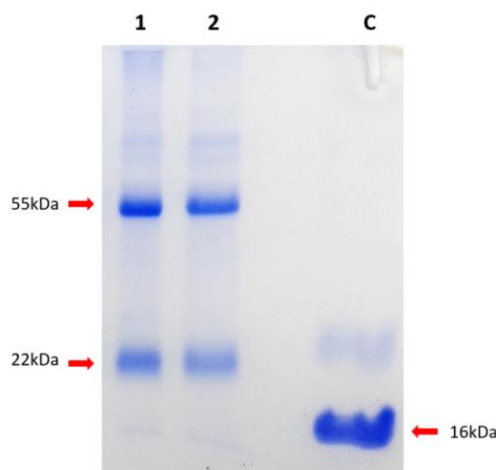


Figura 26: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% contendo a purificação das amostras em estudo. 1 – anti-peptídeo P1; 2- Anti-peptídeo P2; C – Controle da eletroforese.

4.4 RECONHECIMENTO DOS ANTI-PEPTÍDEOS CONTRA A PROTEÍNA LDH NATIVA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliar o reconhecimento dos anti-peptídeos P1 e P2 pela proteína nativa, foram realizadas imunofluorescência indireta com hemácias parasitadas com diferentes estágios do *P. vivax*. Primeiramente foram realizadas marcações de hemácias parasitadas por trofozoítos com soro negativo de camundongos (27 A-B), onde é possível observar uma fluorescência leve, resultado do reconhecimento inespecífico do KLH aos peptídeos sintéticos. E marcação com brometo de etídio e DAPI (Figura 27 C-D), para avaliar a integridade das células e observar o padrão de marcação de hemácias parasitadas, sendo que esses corantes são capazes de aderir ao DNA do parasita e fluorescer nos comprimentos de onda de 300 nm a 360 nm no caso do brometo de etídio e 348 nm a 461 nm no caso do DAPI.

Nos estágios de trofozoíto, os anticorpos anti-peptídeo P1 e P2, marcados com o anticorpo fluorescente IgG Mouse Alexa Fluor 488™ (Thermofisher Scientific), foram capazes de reconhecer a proteína nativa (Figura 28 A-D). Esses resultados eram esperados, visto a especificidade dos anti-peptídeos P1 e P2 (respectivamente *PvLDH* e *pLDH*), tendo a potencial de se ligar à proteína nativa *PvLDH*, corroborando com os resultados obtidos por Hurdayal e colaboradores (2010).

Nos estágio de merozoíto os anticorpos anti-peptídeo P1 e P2 também foram capazes de reconhecer a proteína nativa (Figura 29 A-D), como esperado. As marcações foram observadas na objetiva de 40X, mesmo na emissão de luz branca intermediária, é possível observar fluorescência leve nas hemácias parasitadas marcadas (Figura 29A e 29C). A fluorescência se torna nítida ao observar na luz fluorescente (Figura 29B e 29D). A marcação com DAPI e brometo de etídeo (Figura 29 E e F) mostrou o padrão das hemácias parasitadas, provenientes na mesma amostra, porém coradas em outro poço.

Não foi possível realizar a marcação das hemácias parasitadas incubadas com os anti-peptídeos P1 e P2 com DAPI ou brometo de etídeo, devido às limitações estruturais, pois o microscópio utilizado não é capaz de separar com precisão os comprimentos de onda anteriormente citados, quando sobrepostos.

Como perspectivas, temos a avaliação por imunofluorescência do reconhecimento dos anti-peptídeos P1 e P2 à proteína *PfLDH* objetivando verificar a especificidade dos dois epítomos, o que não pode ser realizado neste estudo, devido dificuldades de conseguir amostras de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* na região.

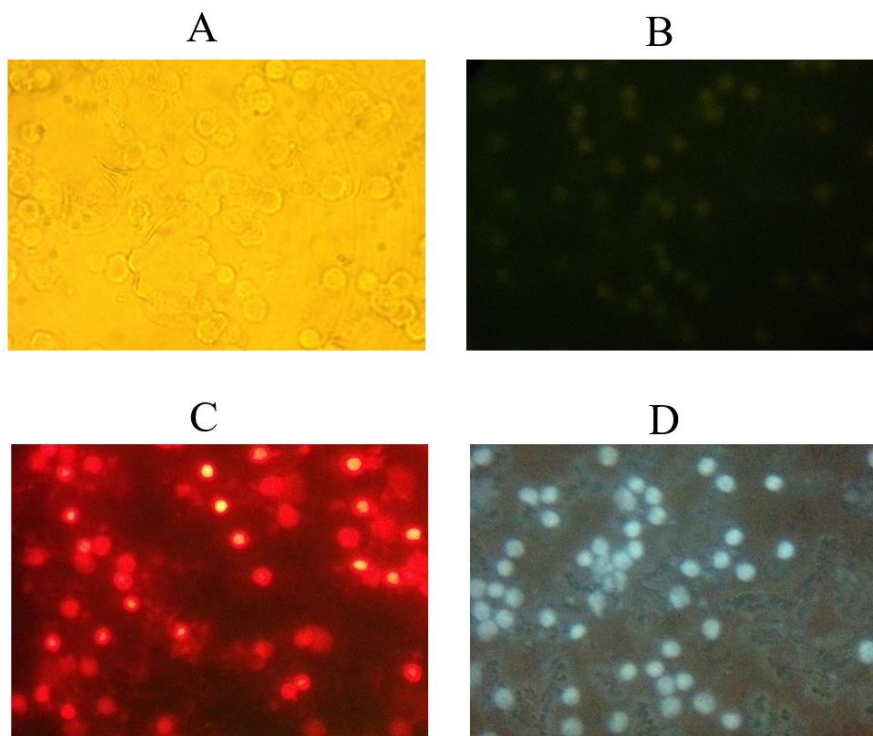


Figura 27: Controle da imunofluorescência visualizado em objetiva de 60X. **Cultura de hemácias parasitadas com trofozoíto de *P. vivax*.** A) Campo com luz branca; B) Campo de luz fluorescente mostrando trofozoíto incubado com soro negativo de camundongo; C) Campo de luz fluorescente mostrando trofozoíto corados com brometo; D) Campo de luz fluorescente mostrando trofozoíto corados com DAPI.

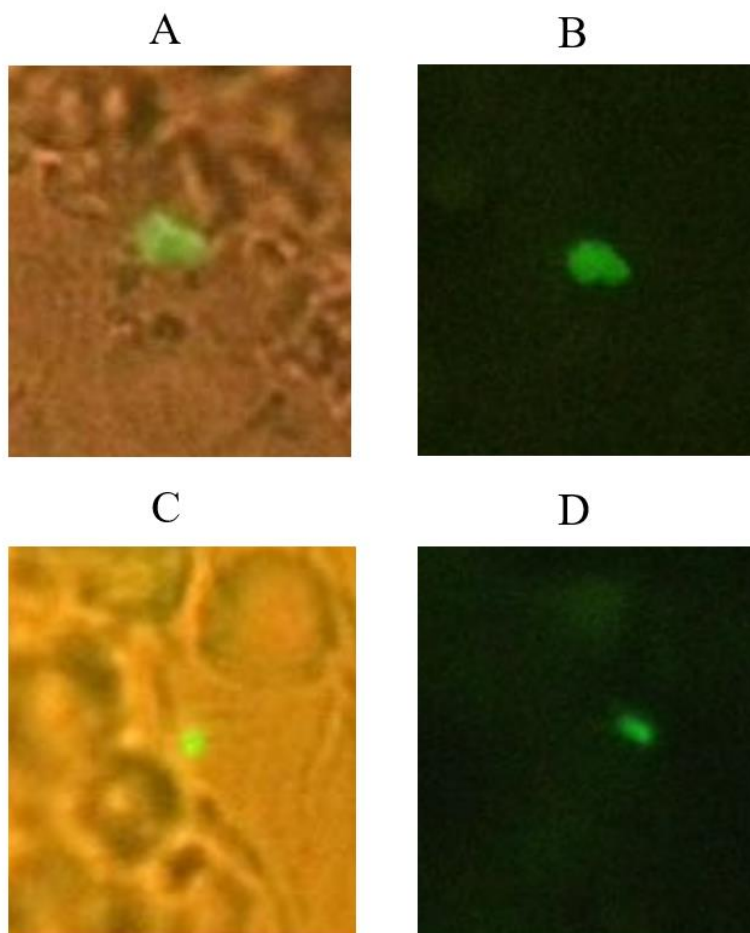


Figura 28: Imunofluorescência de trofozoíto com os anti-peptídeos P1 e P2 visualizado em objetiva de 60X. Cultura de hemácias parasitadas com trofozoíto de *P. vivax*. A) Campo com luz branca mostrando trofozoíto incubado com anti-peptídeo P1; B) Campo fluorescente mostrando trofozoíto incubado com anti-peptídeo P1; C) Campo com luz branca mostrando trofozoíto incubado com anti-peptídeo P2; D) Campo fluorescente mostrando trofozoíto incubado com anti-peptídeo P2.

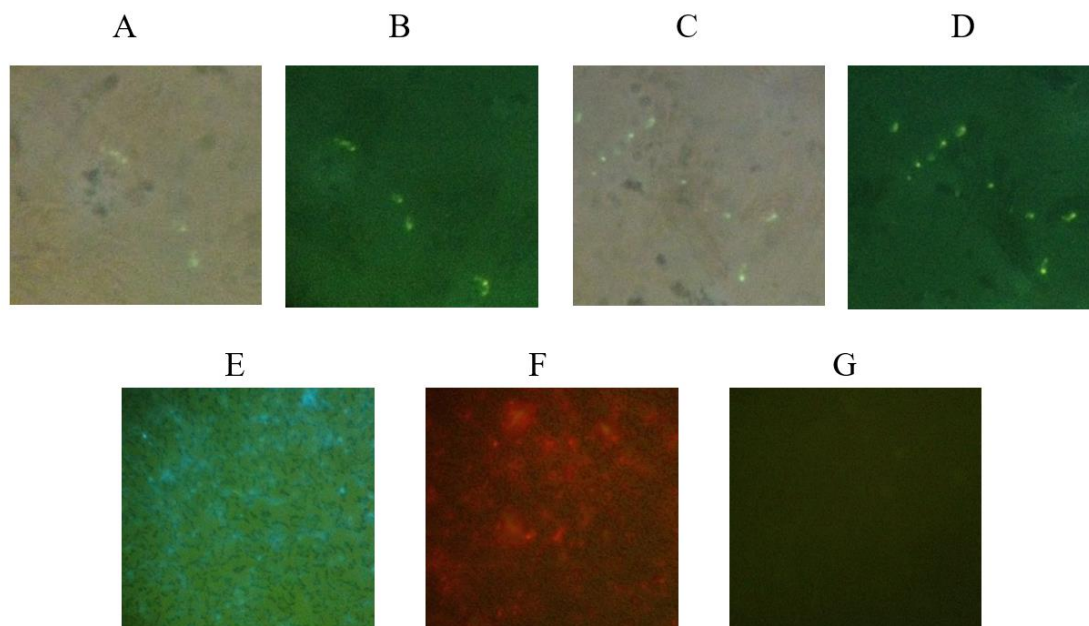


Figura 29: Imunofluorescência de merozoíto com os anti-peptídeos P1 e P2 e controles visualizado em objetiva de 40X. Cultura de hemácias parasitadas com trofozoíto de *P. vivax*. A) Campo com luz branca mostrando merozoíto incubado com anti-peptídeo P1; B) Campo fluorescente mostrando merozoíto incubado com anti-peptídeo P1; C) Campo com luz branca mostrando merozoíto incubado com anti-peptídeo P2; D) Campo fluorescente mostrando merozoíto incubado com anti-peptídeo P2; E) campo de luz fluorescente mostrando merozoítos corados com DAPI; F) Campo de luz fluorescente mostrando merozoítos corados com brometo de etídeo; G) Campo de luz fluorescente mostrando merozoítos incubado com soro negativo de camundongo.

5. CONCLUSÃO

- As seqüências sintetizadas deste estudo mostraram seguir um padrão equivalente ao mostrado nas análises *in silico*, onde apenas os peptídeos P1 e P2 (*PvLDH* e *pLDH* de Hurdal), que mostraram os picos mais positivos para hidrofobicidade e acessibilidade e disposição espacial mais exposta na estrutura da proteína *pLDH* 3D, despertaram uma resposta específica de anticorpos;
- O KLH não se mostrou um bom carreador para imunização dos peptídeos obtidos neste estudo, gerando altos títulos de anticorpos inespecíficos contra os peptídeos;
- Os anti-peptídeos P1 e P2 apresentaram reconhecimento à proteína *pLDH* nativa em ensaio de imunofluorescência, equivalente às suas especificidades dos epítomos selecionados;
- Alguns fatores limitantes deverão ser contornados nas etapas seguintes - que serão realizadas em um projeto de doutorado - para alcançar os objetivos delineados inicialmente, como a melhora na obtenção de anticorpos pela troca do carreador utilizado em imunizações e infraestrutura para análise de resultados;
- Posteriormente, as ferramentas desenvolvidas neste trabalho serão aplicadas em metodologias com maior escalabilidade para avaliação de potencial como marcadores de diagnóstico específicos de malária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, K. et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-falciparum or Plasmodium vivax malaria in endemic countries. In: ABBA, K. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. v. 12.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**. v. 12. n.2. p. 220-4. 2006.

ALI, M. S. M. et al. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. **Clinical laboratory science**, v. 18, n. 2, p. 69–73, 2005.

ASHLEY, E. et al. Malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 3–4, p. 159–173, 2006.

AVILA, P.E. et al. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p 293-296, 2002.

BANICA, F. G. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications. 1ª Ed. United Kingdom. **John Wiley & Sons**, Ltd., 576 p, 2012.

BARBOSA, S. et al. Epidemiology of disappearing Plasmodium vivax malaria: a case study in rural Amazonia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3109, ago. 2014.

BERWAL R; GOPALAN, N; CHANDEL, K; PRAKASH, S; SEKHAR, K. Amplification of LDH gene from indian strains of Plasmodium vivax. **J Vector Borne Dis**. v.43. n. 3, p. 109-14.

BEZERRA, F. B. Avaliação da capacidade funcional de anticorpos específicos aos domínios do MSP1 através de ensaios de fagocitose de merozoítos de *P. vivax*. 2016. 158f. **Dissertação** (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

BHARTI, P. K. et al. The usefulness of a new rapid diagnostic test, the First Response Malaria Combo (pLDH/HRP2) card test, for malaria diagnosis in the forested belt of central India. **Malaria journal**, v. 7, p. 126, 11 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Malária**. 2017. Disponível em < <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-227>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Normas e Manuais Técnicos – 2 ed.- Brasília, 2009.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resumo Epidemiológico Nacional em 2016**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>> Acesso em Fevereiro de 2018.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia**. Brasília, 2011.
- BRIAND, J.P; MULLER, S; VAN REGENMORTEL, M.H. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. **J Immunol Methods**. v. 78, n. 1, p. 59-69. 1985
- BRUCE, M. C. et al. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 191, 6 abr. 1990.
- COSTA, A. D. P. et al. Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 571–574, 2010.
- COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595–612, 1 out. 2002.
- D'ACREMONT, V. et al. Beyond malaria--causes of fever in outpatient Tanzanian children. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 9, p. 809–817, 2014.
- DE OLIVEIRA, M.; DE CASTRO GOMES, A.; TOSCANO, C. M. Cost effectiveness of OptiMal® rapid diagnostic test for malaria in remote areas of the Amazon Region, Brazil. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 277, 2010.
- DE SOUZA, J. B; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 3, p. 291–300, mar. 2002.
- DRAME, P. M. et al. Human Antibody Responses to the Anopheles Salivary gSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15596, 14 dez. 2010.
- DZAKAH, E. E. et al. *Plasmodium vivax* aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 199, 2013.
- ERHARD, M.; SCHMIDT, P.; ZINSMEISTER, P. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poultry science**, v. 79, p. 1264–1270, 2000.
- FARID, Z.; KILPATRICK, M. E.; CHIODINI, P. L. Parasites diseases of the liver. **Diseases of the Liver**, p.1338-1355, 1993.
- FERNANDO, D. et al. Society Meeting Cognitive performance at school entry of children living in malaria-endemic areas of Sri Lanka. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 161–165, 2003.

FRIGUET, B. et al. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Immunol Methods**, vol. 77, n. 2, p. 305-319, 1985.

GALLUP, J. L.; SACHS, J. D. The economic burden of malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 1-2 Suppl, p. 85-96, 2012.

GBOTOSHO, G. O. et. al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of *Plasmodium falciparum* in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 3, p. 496-501, Sep. 2010.

GILLES, H. M. The malaria parasite. **Essential Malariology**, p. 12-34, 2004.

GONÇALES, N. S. L.; GONÇALES JR, F. L. Diagnóstico laboratorial. in: **II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C**, p. 25-27, 2004.

GOTIJO, C. M. F. et. al. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 3, p. 367-373, 1995.

HANCOCK, D.C; O'REILLY, N.J. Synthetic peptides as antigens for antibody production. **Methods Mol Biol**. v. 295, p.13-26. 2005.

HÄNSCHEID, T. Diagnosis of malaria: A review of alternatives to conventional microscopy. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 21, n. 4, p. 235-245, 1999.

HÄNSCHEID, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 6, p. 497-504, jun. 2003.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 726, 1988.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): A biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597-623, 1999.

HOUZE, S. et al. PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 211, 2009.

HURDAYAL, R. et. al. Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases. **Peptides**, vol. 31, n. 4, p. 525-532, 2010.

HVIID, L. Clinical disease, immunity and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in populations living in endemic areas. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 1, n. 4, p. 1-10, 11 jun. 1998.

IDRO, R. et al. Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neurocognitive Outcome. **Pediatric Research**, v. 68, n. 4, p. 267-274, out. 2010.

IQBAL, J. et al. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* monoinfection.

- Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4237–41, set. 2004.
- JAIN, P. et al. Potential Biomarkers and Their Applications for Rapid and Reliable Detection of Malaria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–20, 2014.
- KIMURA, M. et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, n. 2, p. 91–95, 1997.
- KOITA, O. A. et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 194–198, 2012.
- KRETTLI, A. U. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.46, p. 446-454, 1994.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoites and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 1-11, 1985.
- KUMAR, N. et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian Plasmodium falciparum population and false negative malaria rapid diagnostic test. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 119–121, 2013.
- LATEEF, S. S. et al. An improved protocol for coupling synthetic to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 18, n. 3, p. 173–176, 2007.
- LEE, S. et al. A highly sensitive aptasensor towards Plasmodium lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 291–296, 2012.
- LI, X. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 40, 2015.
- LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M. DA; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 235–244, 2002.
- LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. e3998, 22 maio 2012.
- LUBELL, Y; et al. The impact of response to the results of diagnostic tests for malaria: cost-benefit analysis. **BMJ**. V. 26, n. 336, p. 202-5. 2008.
- MACHADO DE AVILA, R. A. et al. Mimotopes of mutalysin-II from Lachesis muta snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640–6, ago. 2011.
- MANGOLD et al. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005.

MBABAZI, P. et al. Accuracy of two malaria rapid diagnostic tests (RDTs) for initial diagnosis and treatment monitoring in a high transmission setting in Uganda. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 530–536, 2015.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 32, n. 14, p. 221–96, jul. 1969.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 7 fev. 2002.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2002.

MOORE, S. A.; SURGEY, E. G. E.; CARDWGAN, A. M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 737-743, 2002.

MURPHY, S. C. et al. Malaria diagnostics in clinical trials. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 5, p. 824–39, nov. 2013.

OGUNNIYI, A. et al. Cost-Effectiveness and Validity Assessment of Cyscope Microscope, Quantitative Buffy Coat Microscope, and Rapid Diagnostic Kit for Malaria Diagnosis among Clinic Attendees in Ibadan, Nigeria. **Malar Res Treat**. v. 52, n. 42, p. 7. 2016.

PANTAROTTO, D. et al. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol*. v. 10, n. 10, p. 961-6. 2003.

PENHALBEL, R. S. R. et al. Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 194-195, 2005.

PIPER, R. et al. Immunocapture diagnostic assays for malaria using Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 1, p. 109–18, jan. 1999.

POINSIGNON, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. **PloS one**, v. 3, n. 6, p. e2472, 25 jun. 2008.

PREUSS, J.; JORTZIK, E.; BECKER, K. **Glucose-6-phosphate metabolism in Plasmodium falciparum** *IUBMB Life*, 2012.

PROUX, S. et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 323, 2011.

SARAVANAN, S.P. S; BABU, K. K. S. Mechanically Alloyed Carbon Nanotubes (CNT) Reinforced Nanocrystalline AA 4032: Synthesis and Characterization. **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**. Vol. 9, No.11, p.1027-1035, 2010.

SEED, C. R.; KITCHEN, A.; DAVIS, T. M. E. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. **Transfusion Medicine**

Reviews, v. 19, n. 2, p. 229-240, 2005.

SILVESTRE, B. T. et al. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2160-6. 2014.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of plasmodium knowlesi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 165-18. 2013.

SIROMA, T. K.; FERRANI, E. C.; RIGO, R. S. Plasmodium vivax: causa de malária grave. **Rev Soc Bras Clin Med**. v. 14, n. 3, p. 166-71. 2016.

SOUSA, L. P. et al. A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of Plasmodium vivax developed from two lactate dehydrogenase protein segments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 49, 30 dez. 2014.

SKWARCZYNSKI, M, TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**. v. 7, n.2. p. 842-854. 2016.

TANG, Y. W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clin.Chem.**, v. 43, n. 11, p. 2021–2038, 1997.

TANGPUKDEE, N. et al. Malaria Diagnosis: A Brief Review. **Korean J Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93–102, 2009.

TLILI, C. et al. Single-walled carbon nanotube chemoresistive label-free immunosensor for salivary stress biomarkers. **Analyst**. v. 135, n.10, p.2637-42. 2010.

VENTURA, S. R. M. A. Anemia da Malária por Plasmodium vivax : Estudo clínico e laboratorial em crianças e adolescentes. Instituto Oswaldo Cruz: FIOCRUZ. Doutorado em Medicina Tropical, 2010.

VITOR-SILVA, S. et al. Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 8, p. 230, 2009.

VORASAN, N. et al. Long-term impact of childhood malaria infection on school performance among school children in a malaria endemic area along the Thai-Myanmar border. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, 2015.

WALLQVIST, A. et al. Metabolic host responses to malarial infection during the intraerythrocytic developmental cycle. **BMC systems biology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2016.

WASSMER, S. C. et al. Investigating the pathogenesis of severe malaria: A multidisciplinary and cross-geographical approach. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 42–56, 2015.

WEISS, G. E. et al. The plasmodium falciparum-specific human memory b cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–13, 2010.

WELLEMS, T. E.; MILLER, L. H. Two Worlds of Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 16, p. 1496–1498, 16 out. 2003.

WIWANITKIT, V. Plasmodium and Host Lactate Dehydrogenase Molecular Function and Biological Pathways: Implication for Antimalarial Drug Discovery. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 69, n. 4, p. 280–283, abr. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1 (2008)**. Geneva, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6 (2014-2015)**. Geneva, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva, 2017.

YOON, J. Y. Introduction to biosensors: From electric circuits to immunosensors. New York. 1^a Ed. **Springer**, 2013. 262 p.

7. ANEXO 1

7.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

Número do Protocolo: 003/2015	Data de Entrada: 04/02/2015
Pesquisador Responsável: LUCAS BARBOSA OLIVEIRA	
Título do Projeto: Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra proteína LDH de Plasmodium Vivax.	
Instituição Responsável: INPA- FIOCRUZ	

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

Organismo/ Grupo Animal	Linhagem/ espécie e	Idade	Peso (g)	n° animais/ grupo	n° grupos	n° total de animais	Sexo		
							M	F	M+F
Camundongo	BALB/c	8 semanas		10	6	60			X
Camundongo	BALB/c	8 semanas		10	6	60			X
Camundongo	BALB/c	8 semanas		10	6	60			x
							TOTAL:		180

USO DE FÁRMACOS

10.2. USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS

13.1. Anestésicos

Agente químico*	quetamina
Dose (UI ou mg/kg)	82 mg/kg
Via de administração	intraperitoneal
Frequência	1(uma) vez, 15 dias após a 3ª imunização
Finalidade	Anestesia para realizar a punção cardíaca



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

13.2. Outros fármacos

<i>Agente químico*</i>	Tiopental (Thiopentax 2,5%)
<i>Dose (UI ou mg/kg)</i>	a 0,7ml/150gr.
<i>Via de administração</i>	Intraperitoneal
<i>Frequência</i>	1(uma) vez, 15 dias após a 3ª imunização
<i>Finalidade</i>	Relaxante para facilitar a sangria pela punção cardíaca

Número do Protocolo: 003/2015	Data de Entrada: 04/02/2015
Pesquisador Responsável: LUCAS BARBOSA OLIVEIRA	
Título do Projeto: Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra proteína LDH de Plasmodium Vivax.	
Instituição Responsável: INPA- FIOCRUZ	

RECOMENDAÇÃO FINAL

INDICAÇÃO: APROVADO

DATA DE LIBERAÇÃO DO PARECER: 10.06.2015.

Atenciosamente,

George Henrique Rebelo
 Presidente CEUA-INPA
 PO n. 079/2015

7.2 ARTIGO DE REVISÃO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios¹

Juliane Corrêa Glória²; Maria Edilene Martins de Almeida³; Késsia Caroline Souza Alves²; Felipe Araújo⁴; Ricardo Andrez Machado de Ávila⁵, Paulo Afonso Nogueira⁶ e Luís André Morais Mariúba⁷

Resumo

A malária continua sendo um sério problema de saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. Uma das principais maneiras de controle desta enfermidade está ligada ao seu diagnóstico correto logo nos estágios iniciais, o que o método diagnóstico por microscopia, ainda considerado “padrão ouro”, muitas vezes não é capaz de proporcionar. Com isso, temos demonstrado a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas atualmente disponíveis, além de uma adequação às necessidades dos países mais afetados pela malária. Sendo assim, a presente revisão teve como objetivo informar sobre os principais métodos de diagnósticos disponíveis e sobre os desafios do desenvolvimento da metodologia ideal para detecção de infecções maláricas.

Palavras-chave: Microscopia, LAMP, TDRs.

Abstract

Malaria remains a serious public health problem widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world. One of the main ways of controlling it's the early diagnostic, which microscopic diagnostic method, still considered a "gold standard", is often not able to provide. It demonstrates the need to improve currently available techniques, as well as an adaptation to regional conditions of malaria endemic countries. Therefore, the present review

¹ Parte da Revisão da dissertação de mestrado do primeiro autor em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM – Brasil.

² Mestrandas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005. Email: juliane.correa.biotec@gmail.com/kessiafenty@gmail.com

³ Doutoranda do Programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – IOC Fiocruz. E-mail: edilene_martins19@hotmail.com

⁴ Biomédico bolsista de apoio técnico do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: felipearaujobio@gmail.com

⁵ Professor e Pesquisador da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Email: r_andrez@yahoo.com.br

⁶ Pesquisador do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: paulo.nogueira@fiocruz.br

⁷ Tecnologista no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: andre.mariuba@fiocruz.br (autor para correspondência)

aimed to describe the main diagnostic methods available and challenges in the developing an ideal assay for malaria detection.

Keywords: Microscopy, LAMP, TDRs.

1. Introdução

A malária é uma infecção aguda, sistêmica, não contagiosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.* Considera-se que tenha surgido na África há milhões de anos e tenha se espalhado para regiões tropicais e subtropicais do mundo através de migrações, exploradores, missionários e escravos (COX, 2002), sendo endêmica para essas áreas.

De todas as espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, apenas as espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie*, *P. ovale*, *P. knowlesi* são capazes de infectar humanos. Esta última foi mais recentemente descoberta em seres humanos, inicialmente encontrada apenas em primatas (SINGH et al., 2003), e ocorre somente em algumas áreas florestais do sudeste da Ásia (SINGH; DANESHVAR, 2013).

Os principais vetores responsáveis pela transmissão da doença são fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, através do repasto sanguíneo. Os humanos infectados, mesmo os que não apresentam sintomas clínicos (assintomáticos), são capazes de abrigar

formas sexuais dos parasitas, sendo assim reservatórios para infecção de mosquitos. A malária também pode ser transmitida através de transfusões sanguíneas ou do compartilhamento de seringas contaminadas, embora esses casos ocorram com muito menos frequência (KITCHEN; CHIODINI, 2006).

O sintoma mais característico da malária é a febre de 40 °C ou mais, em intervalos geralmente bem definidos de 48 horas ou 72 horas (variando de acordo com a espécie infectante), podendo passar a ser intermitente após os primeiros eventos.

Outros sintomas comuns à infecção por malária incluem: cefaleia, calafrios, sudorese, náuseas, vômitos e mialgia. A gravidade das manifestações clínicas varia de acordo com uma série de fatores como, espécie do parasita causador da doença, níveis de parasitemia, imunidade da pessoa infectada, incluso tratando-se de um indivíduo susceptível, como as grávidas, lactantes e crianças e exposições prévias da pessoa infectada (WEISS et al., 2010).

O diagnóstico precoce desta doença é uma das formas mais importantes de controle, uma vez que possibilita do tratamento antes de uma maior progressão de transmissão. No entanto, os sintomas causados pela malária são muitas vezes indistinguíveis de sintomas causados por doenças como hepatite viral, dengue e leptospirose, entre outras, o que dificulta seu diagnóstico (COSTA et al., 2010).

Para contornar essa problemática, vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos para detectar o parasita da malária ou seus subprodutos, cada um possuindo suas vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, variando em desempenho, custo e praticidade.

2. Metodologia

A revisão da literatura sobre os principais métodos de diagnóstico e suas atualizações foi feita por meio de busca de publicações de pesquisas sobre diagnósticos para Malária disponíveis em banco de dados eletrônicos: *Periódicos CAPES*, *Lilacs*, *Scopus* e *Science Direct*. O período destas publicações foi de 2002 a 2017, cujas palavras-chave foram: *Malaria diagnostic*, *Malaria detection*, *malaria*

diagnosis, *Rapid Diagnostic Test for Malaria*, *Malaria Molecular Diagnostic*, *Malaria Parasitological diagnostic* e *malaria serological diagnostic*.

3. Diagnóstico de Malária

Por mais de 100 anos, a microscopia se mantém como o teste de diagnóstico considerado como padrão ouro para detecção de malária (MURPHY et al., 2013). No entanto, há vários métodos que são utilizados em estudos da infecção por malária, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência, testes imunocromatográficos rápidos, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), entre outros.

3.1 Diagnóstico parasitológico

O teste microscópico possui características desejáveis ao diagnóstico de malária, tais como custo baixo, especificidade e sensibilidade alta. Por esses motivos, se mantém como padrão-ouro para detecção de malária.

Este diagnóstico é realizado através da técnica do esfregaço delgado ou espesso (gota espessa) (BRASIL, 2010). A Gota espessa é mais utilizada, pois o sangue concentrado facilita a visualização de parasitas (BRASIL, 2009). Esta técnica se baseia na coleta

de sangue periférico de pacientes com suspeitas de infecção malárica para preparo de lâminas coradas com Giemsa (ou outros corantes específicos) de 20 a 30 minutos e posterior visualização em microscópio óptico, possibilitando a diferenciação de espécies de parasitas encontrados e também uma contagem de parasitas por campo, sendo assim, qualitativo e quantitativo (BRASIL, 2009).

Este exame permite a detecção de até 5-10 parasitas/ μ l, no entanto, esse limite é dependente do nível de experiência do responsável pela interpretação do teste. Em campo, essa capacidade passa a ser de cerca de 100 parasitas por μ l de sangue. O tempo de aplicação total deste exame é de cerca de 60 minutos (BRASIL, 2009).

Apesar das vantagens apresentadas, faz-se necessário levar em consideração que muitos vieses estão envolvidos na interpretação dos resultados, tais como: preparo inadequado das lâminas, lise das hemácias e consequentes mudanças na morfologia dos parasitas e, com isso, erros na identificação das espécies, o que poderia levar a administração de antimaláricos inadequados para as infecções (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011).

Apesar das novas abordagens, como a busca por corantes alternativos para

diminuir o tempo de execução da técnica (MULAY et al., 2017) e da tentativa de melhorar o desempenho da microscopia em campo com o auxílio de câmeras e softwares (BRESLAUER et al., 2009), este método de diagnóstico ainda exige uma infraestrutura adequada, profissionais muito bem qualificados para execução e interpretação dos exames (MANGOLD et al., 2005).

3.2 Diagnóstico Sorológico

Os diagnósticos sorológicos se baseiam na interação entre antígenos do parasita na fase sanguínea assexuada presentes no soro dos pacientes com malária com anticorpos produzidos contra estes, utilizando técnicas como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ou imunofluorescência (TANGPUKDEE et al., 2009).

Em geral, os EIA (ensaios imunoenzimáticos) possuem alta sensibilidade e especificidade, por se tratarem de testes baseados na ligação antígeno-anticorpo, que são ligações específicas (LIPMAN et al., 2005). Na técnica ELISA indireto, microplacas que possuem poços, chamados “well”, onde são aderidos antígenos. Os soros dos pacientes são adicionados em cada poço e, durante a incubação, ocorre

ligação entre o antígeno aderido à placa e o anticorpo presente no soro adicionado. Em seguida, adiciona-se um segundo anticorpo que se ligará às imunoglobulinas da espécie que estão sendo testadas, e este está conjugado à enzima peroxidase, a qual, em contato com a solução cromatogênica adequada como, por exemplo, o tetrametilbenzidina (TBM) com o substrato da enzima, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) provoca uma reação colorimétrica, possibilitando a mensuração da quantidade de anticorpos presentes no soro dos pacientes. Este ensaio, pelo fato de se basear na busca de anticorpos contra antígenos, e não na busca de antígenos, geralmente é mais empregado em estudos para avaliar a resposta imune humoral de pacientes (DRAME et al., 2010; POINSIGNON et al., 2008).

O ELISA sanduíche se baseia, além das etapas já descritas, mais uma etapa inicial a qual consiste na sensibilização da placa com anticorpos para captura de antígenos alvo (GONÇALES; GONÇALES, JR, 2004), as reações posteriores acontecem como o descrito acima.

Os biomarcadores de infecção mais empregados são as Aldolases de *Plasmodium*, Proteína Rica em Histidina-2 (HRP-2) de *Plasmodium*

falciparum e a Lactato Desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH).

As aldolases são as principais enzimas da via glicolítica do *Plasmodium*, liberadas no sangue dos pacientes infectados e são encontradas no citoplasma dos parasitas (DZAKAH et al., 2013).

As proteínas HRP (Histidine-rich proteins), são proteínas nas quais o aminoácido histidina representa mais de 70% da composição da cadeia polipeptídica. A HRP-2 de *Plasmodium* é exclusiva do *P. falciparum*, e se encontra presente no soro, e em outros fluidos de indivíduos infectados com este parasita (JAIN et al., 2014).

A proteína *PfHRP-2*, embora amplamente utilizada em testes de diagnóstico rápido possui o viés de permanecer no organismos por um período de tempo mesmo após a cura do paciente, podendo levar a falsos positivos que acarretam na administração desnecessária de antimaláricos (HOUBE et al., 2009; IQBAL et al., 2004), além disso, estudos recentes têm demonstrado que pode haver a deleção do gene de HRP2 em algumas cepas de *P. falciparum*, acarretando em falsos negativos para os testes de diagnóstico que usam esse antígeno como marcador (KOITA et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

A LDH de plasmódio (pLDH) faz parte da via glicolítica do metabolismo do parasita, é produzida tanto em todas as etapas do ciclo de vida deste (MOODY, 2002). Como a via glicolítica é a principal fonte de energia para o desenvolvimento do parasita, o consumo de glicose das hemácias infectadas pelo parasita é muito aumentado, chegando a ser entre 50 a 100 vezes maior do que as hemácias saudáveis (PREUSS; JORTZIK; BECKER, 2012; WALLQVIST et al., 2016).

3.3 Testes de Diagnóstico Rápido (TDRs)

Os testes de diagnóstico rápido (TDR) para malária consistem em anticorpos contra antígenos específicos do plasmódio imobilizados em membranas de nitrocelulose e ligados a partículas de ouro, nas quais migra a fase líquida de sangue de pessoas com suspeita de infecção malárica. Estes testes possuem uma fase fixa, na qual há um anticorpo de captura aderido à membrana de nitrocelulose e com isso, a migração do antígeno presente na fase móvel resulta na ligação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização de uma linha colorida (MOODY, 2002). A viabilidade do teste

é verificada por meio de um anticorpo anti-camundongo (MOODY, 2002).

A OMS estabeleceu uma série de diretrizes para a produção de testes de diagnóstico rápido (TDR) para aplicações *point-of-care*. Essas diretrizes basicamente recomendam que os testes tenham facilidade de acesso àqueles que necessitam, tenham uma boa sensibilidade e especificidade, que sejam fáceis de usar, rápidos e independentes de equipamentos (WHO, 2011).

Quanto à sensibilidade e especificidade destes testes, a OMS determina devam ter uma sensibilidade, pelo menos, equivalente à da microscopia em condições de campo, que é equivalente ao nível de detecção de aproximadamente 100 parasitas/ μ l. Para essa parasitemia, os testes devem ser capazes de detectar os antígenos em 100% das vezes, com uma especificidade de 90%. Além disso, os testes devem ser específicos para os antígenos indicativos de parasitas vivos circulantes, não podendo ser reativos a produtos de parasitas inviáveis, como resquícios de proteínas ou ácidos nucleicos. Idealmente, também devem oferecer a verificação de eficácia de tratamentos ou resistência às drogas antimaláricas (WHO, 2011).

Atualmente, existem vários testes de diagnóstico rápido disponíveis no mercado. Os testes existentes geralmente são para detecção de *P. falciparum*, de *P. falciparum* + Pan reativo (que é capaz de detectar - *Plasmodium falciparum* e outras espécies de plasmódio que infectam humanos), para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, *P. vivax* e Pan reativo, teste apenas com anticorpo Pan reativo ou somente para detecção de *Plasmodium vivax* (WHO, 2011).

3.4. Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares vêm sendo amplamente empregadas para diagnóstico de doenças infecciosas (EMMADI et al., 2011). A PCR como método de detecção de malária foi inicialmente descrita por Waters & McCutchan, em 1989 e consistem na amplificação de sequências específicas da região codificadora da subunidade menor de RNA ribossomal (18S rRNA) de plasmódio, pela utilização de *primers* (sequências iniciadoras), responsáveis por se anelar em regiões específicas do DNA, e da enzima DNA polimerase (Taq DNA polimerase), que realiza a síntese por meio de ciclagem de temperaturas específicas para desnaturação e extensão do DNA, resultando na aquisição de milhares de

cópias da sequência alvo (LORENZ, 2012).

Apesar de todas as vantagens relacionadas a esta tecnologia, seu uso continua sendo restrito ao ambiente laboratorial, em decorrência ao alto custo dos reagentes e equipamentos utilizados, necessidade de profissionais qualificados para a execução e o cuidado para evitar contaminações.

3.4.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real, permite uma análise mais sensível e específica que as já apresentadas, (PERANDIN et al., 2004; MANGOLD et al., 2005) sendo, até o presente momento, o único método de diagnóstico para malária, rotineiramente empregado, capaz de detectar infecções assintomáticas, além de ser capaz de diferenciar entre as espécies de plasmódio existentes (MURPHY et al., 2012). Por esses motivos, é a mais indicada para *screening* em bancos de sangue e para confirmação de casos suspeitos de malária que apresentam resultados negativos nas demais formas de diagnóstico (ALI et al., 2005;)

3.4.2 LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Um novo método de diagnóstico molecular vem sendo utilizado para detecção de infecções maláricas, sendo este LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) (HAN et al., 2007; SINGH et al., 2013;) este método consiste na amplificação do DNA sem a variação de temperatura necessária para os métodos convencionais de PCR. Por ser mais simples, com sua análise podendo ser feita por meio de visualização de turbidez ou fluorescência e não necessitar de muitos equipamentos, tem o potencial de ser utilizado em condições de campo (POLLEY et al., 2013), além de apresentar altos índices de sensibilidade (PATEL et al., 2013), o que é essencial para o diagnóstico da malária.

3.5 Biossensores

Os sensores eletroquímicos, os quais são dispositivos que detectam variações ao receberem estímulos de natureza física ou química, respondendo com um sinal elétrico que pode ser canalizado, amplificado e modificado através de dispositivos eletrônicos (YOON, 2013) também se apresentam como uma alternativa para o aumento da capacidade de detecção da malária, uma vez que possível ser aplicado em campo.

Algumas pesquisas buscam o desenvolvimento de biossensores para detecção de malária a partir de aptâmeros e anticorpos como elementos de detecção. Lee e colaboradores (2012) descreveu o desenvolvimento de aptassensores para malária, baseados na detecção da proteína *pLDH* empregando um sistema de reconhecimento composto de um aptâmero modificado como ligações tiol sobre um eletrodo de ouro, sendo a leitura do sinal realizada em uma plataforma de espectroscopia eletroquímica de impedância (EIS). O limite de detecção reportado para os aptassensores foi de 108.5 fM e 120.1 fM para LDH de *P. vivax* e LDH do *P. falciparum*, respectivamente.

A capacidade de detectar baixas concentrações do antígeno possibilitaria também utilizar amostras de coleta menos invasiva, como as de saliva, visto que como demonstrado por Gbotosho et al. (2010), os antígenos maláricos estão presentes deste tipo de fluido, porém em baixas concentrações

4. Considerações Finais

Considerando a distribuição geográfica da malária, um método de diagnóstico *point-of-care* seria o ideal às necessidades da população mais acometida por esta doença.

Levando-se em conta também que a transmissão da doença também pode ser continuada por meio de indivíduos que estão infectados, porém não apresentam sintomas (assintomáticos), seria de suma importância que a sensibilidade do teste fosse alta, além da sua confiabilidade em relação à distinção das espécies infectantes, para evitar a administração errônea de antimaláricos, e para, também, evitar a resistência dos parasitas a estes.

Portanto, mesmo com a grande variedade de métodos de diagnóstico, ainda é um desafio obter um método que tenha todas as características desejáveis de necessárias aos órgãos de saúde governamentais para distribuição para população em áreas de risco.

O grande desafio dos próximos anos será o de encontrar uma maneira de combinar o baixo custo da microscopia, a praticidade dos TDRs e a alta sensibilidade e especificidade do diagnóstico molecular.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas - FAPEAM pelas bolsas concedidas e suporte financeiro geral. Ao Instituto

Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia pela estrutura física, em particular ao grupo de pesquisa Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia (DCDIA). À Universidade Federal do Amazonas por fornecer a minha formação acadêmica.

Divulgação

Este artigo de revisão é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico.

Referências

ALI, M. S. M. et al. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. **Clinical laboratory science**, v. 18, n. 2, p. 69–73, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2498–2498, 2010. doi: 10.1590/S0102-311X2006001100027.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Normas e Manuais Técnicos – 2 ed.- Brasília, 2009.

BRESLAUER, D. N. et al. Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6320, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0006320.

COSTA, A. D. P. et al. Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 571–574, 2010.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595–612, 1 out. 2002. doi: 10.1128/CMR.15.4.595-612.2002

DRAME, P. M. et al. Human Antibody Responses to the Anopheles Salivary gSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15596, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0015596.

DZAKAH, E. E. et al. Plasmodium vivax aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 199, 2013. doi: 10.1186/1475-2875-12-199.

EMMADI, R. et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: A review of FDA-approved and cleared assays. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 583-604, 2011. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.05.011.

GBOTOSHO, G. O. et al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of *Plasmodium falciparum* in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 3, p. 496-501, 2010. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0166

GONÇALES, N. S. L.; GONÇALES JR, F. L. Diagnóstico laboratorial. in: **II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia**

da Hepatite C, p. 25-27, 2004.

HAN, E.-T. et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2521–8, 2007. doi: 10.1128/JCM.02117-06

HÄNSCHEID, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 6, p. 497–504, jun. 2003. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00640.x

HOUZE, S. et al. PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 211, 2009. doi: 10.1186/1475-2875-8-211

IQBAL, J. et al. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of Plasmodium falciparum mono-infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4237–41, 2004. doi: 10.1128/JCM.42.9.4237-4241.2004

JAIN, P. et al. Potential Biomarkers and Their Applications for Rapid and Reliable Detection of Malaria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–20, 2014. doi: 10.1155/2014/852645

KITCHEN, A. D.; CHIODINI, P. L. Malaria and blood transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 90, n. 2, p. 77-84, 2006. doi: 10.1111/j.1423-0410.2006.00733.x.

KOITA, O. A. et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the hrp2 gene. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 194–198, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0665

- KUMAR, N. et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian Plasmodium falciparum population and false negative malaria rapid diagnostic test. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 119–121, 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.09.015
- LEE, S. et al. A highly sensitive aptasensor towards Plasmodium lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 291–296, 2012. doi: 10.1016/j.bios.2012.03.003
- LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–268, 2005. doi: 10.1093/ilar.46.3.258
- LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 3998, 2012. doi: 10.3791/3998
- MANGOLD et al. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.5.2435
- MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2002. doi: 10.1128/CMR.15.1.66-78.2002
- MULAY, H. D. et al. New Methylene Blue Stain for Malaria Detection on Thin Smears. **Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University**, v. 6, n. 1, p. 76–81, 2017.
- MURPHY, S. C. et al. Malaria diagnostics in clinical trials. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 5, p. 824–39, 2013. doi: 10.4269/ajtmh.12-0675
- MURPHY, S. C. et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage Plasmodium falciparum infections in malaria human challenge trials. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 383–394, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0658
- PATEL, J. C. et al. Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of Plasmodium vivax. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54986, 22 jan. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054986
- PERANDIN, F. et al. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for Routine Clinical Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1214–1219, 2004. doi: 10.1128/JCM.42.3.1214-1219.2004
- POINSIGNON, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. **PloS one**, v. 3, n. 6, p. e2472, 25 jun. 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0002472
- POLLEY, S. D. et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 4, p. 637–644, 2013. doi: 10.1093/infdis/jit183
- PREUSS, J.; JORTZIK, E.; BECKER, K. Glucose-6-phosphate metabolism in Plasmodium falciparum. **IUBMB Life**, v. 64, n. 7, p. 603–11, 2012. doi: 10.1002/iub.1047.

PROUX, S. et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 323, 2011. doi: 10.1186/1475-2875-10-323

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 165–184, 2013. doi: 10.1128/CMR.00079-12

SINGH, R, et al. Rapid detection of Plasmodium vivax in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Journal of Infection**, v. 67 n. 3 p. 245-7, 2013 doi: 10.1016/j.jinf.2013.04.016

SINGH, S. K. et al. Definition of structural elements in Plasmodium vivax and P. knowlesi Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **The Biochemical journal**, v. 374, n. 1, p. 193–8, 2003. doi: 10.1042/BJ20030622

WALLQVIST, A. et al. Metabolic host responses to malarial infection during the intraerythrocytic developmental cycle. **BMC systems biology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2016. doi: 10.1186/s12918-016-0291-2

WEISS, G. E. et al. The plasmodium falciparum-specific human memory b cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–13, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1000912

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva, 2011.

YOON, J. Y. Introduction to biosensors: From electric circuits to immunosensors. New York. 1^a Ed. **Springer**, 2013. 262 p. doi: 10.1007/978-1-4419-6022-1

7.3 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO



Scientia Amazonia, v. 7, n.1, 53-59, 2018

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

Nanotubos de carbono: conceitos gerais e aplicação em biosensores¹

Stefane Pereira Reis², Juliane Corrêa Glória³, Maria Edilene Martins de Almeida⁴, Felipe Araujo⁵, Késsia Caroline Souza Alves³, Keila Dayane do Espírito Santo Pereira³, Lizandro Manzato⁶, Luís André Morais Mariúba⁷

Submetido 28/09/2017 – Aceito 30/09/2017 – Publicado on-line 03/01/2018

RESUMO

Desde que foram descobertos, os nanotubos de carbono têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido às suas propriedades físicas, químicas e eletrônicas que possibilitam sua aplicação nas mais diversas áreas de conhecimento, incluindo aplicações biomédicas. Este trabalho buscou levantar conceitos básicos sobre estas nanopartículas, a problemática envolvendo seu uso e sua aplicação em sistemas de detecção rápida de biomoléculas.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanotubos de carbono, biosensores

Carbon nanotubes: general concepts and application in biosensors. Carbon nanotubes have attracted many researchers because of their physical, chemical and electronic properties that allow their application in the most diverse areas of knowledge, including biomedical applications. This study aimed to raise basic concepts of these nanoparticles, the problematic involving its use and application in rapid analyte detection systems.

Keywords: nanotechnology, carbon nanotubes, biosensors

**Anaplasma marginale: aspectos gerais, diagnóstico e controle¹**

Keila Dayane do Espírito Santo Pereira²; Maria Edilene Martins de Almeida³, Késsia Caroline Souza Alves⁴, Juliane Corrêa Glória⁵, Alex Cangussu⁶, Luís André Moraes Mariúba⁷, Paulo Afonso Nogueira⁸.

Submetido 10/01/2018 – Aceito 12/01/2018 – Publicado on-line 04/01/2018

Resumo

Anaplasmosose é uma doença que acomete animais ruminantes, especificamente bovinos, gerando prejuízos econômicos no Brasil. Dentre os sinais clínicos apresentados, o de maior ênfase é a febre que caracteriza altos picos de parasitemia assim como a anemia que pode levar o animal a óbito. As formas de combate à doença se baseiam em medidas profiláticas, e os produtos comerciais disponíveis no mercado não são eficientes. Os frequentes avanços da ciência podem levar a novos caminhos para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra Anaplasmosose, capaz de induzir a resposta imune protetora. Com base nas terapêuticas atuais, este estudo traz um levantamento de novas propostas e estratégias de vacinas eficazes para resposta imune humoral contra Anaplasmosose utilizando proteínas de superfície (MSPs), vacinas de tecnologia de DNA recombinante (TDR) baseadas em seleção de epítomos de células B.

Palavras-Chave: *Anaplasma marginale*, Bovinos, MSPs, vacinas recombinantes.

