



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

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

NOVAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS E
MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

MANAUS

2022

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

**NOVAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS E
MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologias para a saúde.

Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba

Coorientador: Dr. Walter Ricardo Brito

MANAUS

2022

Ficha Catalográfica

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

G568n Glória, Juliane Corrêa
Novas abordagens para o desenvolvimento de insumos e métodos para o diagnóstico de malária / Juliane Corrêa Glória . 2022
163 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luis André Morais Mariúba
Coorientador: Walter Ricardo Brito
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanotubos de carbono. 2. Malária. 3. Imunoensaios. 4. Anticorpos policlonais. 5. MIP - Molecular Imprinted Polymer. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JULIANE CORRÊA GLÓRIA

**NOVAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS E
MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologias para a saúde.

APROVADA EM: 24/06/2022

Orientador: Dr. Luís André Morais Mariúba

Coorientador: Dr. Walter Ricardo Brito

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Luciana Pereira de Sousa Vieira, Membro
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz – Rio de Janeiro

Prof. Dra. Aya Sadahiro, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Yonny Romaguera Barcelay, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Adolfo José da Mota, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

*Ao meu pai **Obem Corrêa** (avô). Era maravilhoso ver seu o olhar orgulhoso a cada conquista minha. Esta é pro senhor, papai. Eu sinto sua falta e amo-lhe eternamente.*

*Aos meus pais, **Célia Corrêa e Ezeclério Glória Jr**, por me apoiarem a cada passo. Eu amo vocês.*

*Ao meu orientador, Dr. **Luis André Mariúba**, por toda confiança, incentivo e paciência durante todos esses anos. Eu não poderia ter pedido um orientador melhor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois Ele me concedeu toda a força que eu necessitava para transpor os desafios que enfrentei durante essa jornada.

Eu tenho muito a agradecer ao meu orientador **Dr. Luis André Mariúba**, pois ele acreditou em mim e me incentivou todas as vezes que minha confiança falhava (e foram muitas vezes). Obrigada pela paciência, compreensão e pela orientação excelente. Tudo que eu sei hoje, eu devo a você, e caso não seja o suficiente é inteiramente minha culpa. Muito obrigada.

Ao meu co-orientador, **Dr. Walter Brito**, por toda confiança que dedicou a mim ao me conceder a oportunidade de realizar o doutorado sanduíche. Essa experiência contribuiu muito para o meu amadurecimento científico e pessoal. Obrigada pela parceria que vem sendo cada vez mais frutífera.

À **Dra. Felismina Moreira** pela imensa paciência e por todo apoio que me concedeu durante a minha estada no Biomark-ISEP, principalmente pelo fato da área de pesquisa ser totalmente nova para mim. Eu não teria conseguido sem o seu apoio. Muito obrigada.

À dra. **Maria Goreti Sales** pela parceria e pelas valorosas contribuições ao nosso trabalho.

Aos meus pais **Célia e Ezeclério Jr.**, irmãs **Ana Célia e Bruna** e aos demais familiares, obrigada por relevarem minhas ausências, por todo o apoio e amor que dedicam a mim. Eu precisei bastante nesses anos de pós graduação. Agradeço especialmente à minha sobrinha **Ana Sofia**, por ser a luz da minha vida.

Às minhas amigas de infância **Rafaela Reis, Larissa León e Luige Karoline**, pela paciência e apoio ao manterem a amizade em meio a distância e/ou falta de tempo. Muito obrigada.

Agradeço à **Adélia Figueiredo** por ser minha parceira nesses últimos anos, a sua amizade é um dos melhores presentes desse doutorado. Você me inspirou a continuar a minha luta ao não desistir da sua, você é um raio de Sol. E também ao seu marido, **Raoni Franco**, muito obrigada por todo auxílio durante esses anos.

Ao **Yury Chaves** pela dedicação, esforço e paciência que concedeu ao nosso trabalho durante todo o meu doutorado. Poucos fariam tudo o que você fez de maneira tão gentil. Muito obrigada.

Agradeço aos membros do Biomark-ISEP e Biomark-Coimbra: **Yuselis, Bárbara, Eduarda, Akmaral, Margarida, Guida, Nádia, Mariana S., Mariana C., Raquel, Carolina, Beatriz, Liliana, Ana Isabel, Gabriela, Rafaela, Letícia, Nayara, João, Ana Rita, Inês, Rui, Samuel, Helga, Silvia e Sara** pelo apoio e acolhida.

Gostaria de agradecer especialmente à **Daniela Oliveira** por ter estado junto comigo em todas as etapas de execução do projeto do doutorado sanduíche, por ter tido a paciência de se dedicar a me ensinar sobre um assunto que eu sabia bem pouco a respeito e auxiliar em todas as análises. Você é maravilhosa.

À **Ariamna Gandarilla** por todo auxílio com as noções de eletroquímica e também pela amizade. Você é uma pessoa e cientista incrível.

Aos meus amigos **Maria Edilene Martins, João Victor Verçosa, Fernanda Batalha e Paula Taquita** pela amizade, torcida e apoio. Eu amo vocês.

Aos demais amigos e colegas de trabalho: **Ruth Moura, Polyane Poly, Diene Lima, Túllio Romão, Walter Neves, Eliz Farias, Késsia Caroline, Caio Coutinho, Danielle Farias, Jeniffer Clorives, Diogo Castro, Wellington Mota, Clarice Virgínia, Maria Eduarda, Maria Júlia, Dandara Brandão e Thayana Cruz.**

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

Ao **Dr. Ricardo Andréz 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.

À empresa **EZscience** por todo suporte para experimentação animal com as galinhas poedeiras e manuseio dos ovos.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD – FIOCRUZ Amazônia)** pelo suporte estrutural e seus técnicos e funcionários, por todo auxílio.

À coordenação **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)**, **Nubiane, Jackeline, Dra. Rosany Piccolotto** e **Dr. Edmar Vaz de Andrade**. Obrigada pela ajuda em questões burocráticas. Aos professores do mesmo programa, por proporcionar nossa formação acadêmica.

Aos membros da banca de minha aula de qualificação, **Dra. Maria Carolina Scheffer, Dra. Elizângela Farias** e **Dr. Renan Siqueira** pelas correções e sugestões valiosas.

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

Ao **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, **Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)** e à **Fundação de apoio à FIOCRUZ (FIOTEC)** pelo apoio financeiro ao longo da execução do projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse meu sonho, o meu muito obrigada, de coração.

*“A esperança é a coisa com penas
Que empoleirada na alma,
Canta a melodia sem palavras,
E nunca para,
E mais doce na ventania é ouvida,
E dolorida deve ser a tempestade
Que poderia abater o passarinho
Que manteve tantos aquecidos.
Eu a ouvi na terra mais gelada,
E no mar mais desconhecido;
No entanto, nunca, nos extremos,
Ela pediu uma migalha de mim.”*

Emily Dickinson

RESUMO

A malária permanece como a doença parasitária de maior importância médica no mundo. O Brasil está entre os países que apresentam os maiores números de casos na região das Américas, apresentando infecções majoritariamente causadas pelas espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Uma vez que o diagnóstico acurado antes da progressão da doença é uma das melhores formas de controle da malária, é necessário um esforço para fornecer diagnósticos que alcancem toda a população em risco. O mercado de diagnóstico para malária demonstra uma necessidade cada vez maior de aumentar as suas capacidades, de maneira a atender satisfatoriamente a população mundial. Há também demanda para a criação de novas tecnologias, que possam fornecer as características ideais para detecção sensível, específica e confiável da malária. Visando essas problemáticas, nossa equipe vem buscando desenvolver novos insumos e métodos para o diagnóstico de malária. No capítulo I desta tese, apresentamos um artigo de revisão o qual destaca as vantagens e utilização de anticorpos obtidos de galinhas (IgY) na produção de testes diagnóstico para doenças infecciosas. No capítulo II, apresentamos o artigo original publicado em 2020 que aborda o desenvolvimento de um método de solubilização de nanotubos de carbono, aplicáveis à imunização de peptídeos sintéticos para geração de anticorpos específicos. Nesse passo, no capítulo III, utilizamos os nanotubos de carbono solubilizados em imunizações de galinhas contra peptídeos referentes à lactato desidrogenase de plasmódio (pLDH) e à proteína glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH), os quais foram avaliados por meio de citometria de fluxo, na qual os anticorpos anti-pLDH apresentaram reatividade específica às amostras de pacientes infectados. Por último, no capítulo IV, buscando um método alternativo para detecção de biomarcadores maláricos que dispensem o uso de anticorpos, foi desenvolvido um novo biossensor eletroquímico que utiliza um polímero molecularmente impresso (MIP) capaz de se ligar seletivamente à “proteína 2” rica em histidina (HRP2) de plasmódio. As técnicas abordadas nesta tese podem contribuir para a produção de ferramentas comerciais com produção ética, reduzindo ou excluindo a necessidade de causar dor e/ou desconforto a animais para a obtenção de insumos diagnóstico, e economicamente vantajosa para o mercado de diagnóstico da malária, visto sua escalabilidade e baixo custo.

Palavras-chave: nanotubos de carbono; malária; imunoenaios; anticorpos policlonais; MIP; biossensor.

ABSTRACT

Malaria remains the most medically important parasitic disease in the world. Brazil is among the countries with the highest number of cases in the Americas, with infections mostly caused by the species *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Since accurate diagnosis before disease progression is one of the best ways to control malaria, an effort is needed to provide diagnoses that reach the entire population at risk. The malaria diagnostics market demonstrates an increasing need to increase its capabilities, to satisfactorily serve the world's population. There is also a demand for the creation of new technologies that can provide the ideal characteristics for sensitive, specific, and reliable detection of malaria. Aiming at these problems, our team has been seeking to develop new inputs and methods for the diagnosis of malaria. In chapter I of this thesis, we present a review article that highlights the advantages and use of antibodies obtained from chickens (IgY) in the production of diagnostic tests for infectious diseases. Chapter II discusses the development of a method for solubilizing carbon nanotubes, applicable to the immunization of haptens to generate specific antibodies. Therefore, in Chapter III, we used these carrier molecules in chicken immunizations against peptides related to plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) and plasmodium glutamate dehydrogenase protein (pGDH), which were evaluated by flow cytometry, in which the anti-pLDH antibodies showed specific reactivity to samples from infected patients. Finally, in chapter IV, seeking an alternative method for the detection of malarial biomarkers that do not require the use of antibodies, a new electrochemical biosensor was developed that uses a molecularly imprinted polymer (MIP) capable of selectively binding to "protein 2" rich in histidine (HRP2) from plasmodium. The techniques addressed in this thesis can contribute to the production of commercial tools with ethical production, reducing or excluding the need to cause pain and/or discomfort to animals for the production of diagnostic inputs, and economically advantageous for the malaria diagnostic market since its scalability and low cost.

Keywords: carbon nanotubes; malaria; immunoassays; polyclonal antibodies; MIP; biosensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Países com casos autóctones em 2000 e seu status em 2020	19
Figura 2. Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2020, por município.	20
Figura 3. Casos de malária notificados no Brasil, 1959-2020*	21
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp. em hospedeiro humano.	22
Figura 5. Diagnóstico de malária por microscopia.....	30
Figura 6. Princípios básicos do ELISA	32
Figura 7. Ensaio imunocromatográfico para diagnóstico de malária.....	33
Figura 8. Princípios de aplicação da citometria de fluxo baseada em esferas.....	34
Figura 9. Processo geral de impressão molecular.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Ceusius
μL	Microlitros
mL	Mililitros
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramas
μg	Microgramas
ng	Nanogramas
pg	Picogramas
kDa	Kilodalton
mm	Milímetros
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HRP2	<i>Histidine-rich protein II</i>
KLH	<i>Keyhole lympet hemocianin</i>
LDH	Lactato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
MTI	Mosquiteiros tratados com inseticidas
TDR	Teste de diagnóstico rápido
ACT	<i>Artemisin-based combination therapy</i>
CSP	Proteína circunsporozoíta
LAMP	<i>Loop-Mediated isothermal amplification</i>
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>
FITR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
SEM	<i>Scanning electron microscope</i>
MIT	<i>Molecular imprinting technology</i>
MIP	<i>Molecular imprinted polymer</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>
IgY	Imunoglobulinas do tipo “Y”

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.2.1 Malária no Brasil.....	19
1.3 CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium</i> sp.....	22
1.4 VACINA PARA MALÁRIA	24
1.5 TRATAMENTO DE MALÁRIA	25
1.6 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA	26
1.6.1 Biomarcadores para infecção malárica	26
1.6.1.1 Hemozoína	26
1.6.1.2 Aldolases	27
1.6.1.3 Proteína 2 rica em histidina (HRP2)	27
1.6.1.4 Glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH)	28
1.6.1.5 Lactato Desidrogenase de Plasmódio (pLDH).....	29
1.6.2 Diagnóstico por Microscopia	30
1.6.3 Diagnóstico Molecular	31
1.6.4 Diagnóstico Sorológico.....	31
1.6.5 Testes em fluxo lateral	33
1.6.6 Citometria de Fluxo	34
1.6.7 Biossensores.....	35
1.6.7.1 Tecnologia de impressão molecular para desenvolvimento de anticorpos plásticos.....	36
1.6.7.2 Aplicação dos MIPs em sensores eletroquímicos	38
2. OBJETIVOS.....	40
CAPÍTULO I.....	42
CAPÍTULO II.....	62

CAPÍTULO III	80
CAPÍTULO IV	102
3. DISCUSSÃO GERAL.....	123
4. CONCLUSÃO.....	128
5. REFERÊNCIAS	130
6. APÊNDICE	147
7. ANEXOS	152

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecto-parasitária com endemicidade em regiões tropicais e subtropicais do mundo e que continua apresentando altos índices de morbidade e mortalidade (WHO, 2021a). Apesar dos recentes avanços feitos para o combate desta doença, ela permanece como a infecção parasitária de maior preocupação à saúde humana, sendo reportado 59 casos a cada 1000 pessoas vivendo em área de risco para sua transmissão (WHO, 2021a).

As espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são as maiores causadoras de malária no mundo, a primeira sendo também a responsável pelo maior número de óbitos, principalmente no continente africano (WHO, 2019). Estas também são as espécies prevalentes no Brasil, a *P. vivax* representando 84,2% dos casos e a *P. falciparum*, 15,8% dos casos em 2020 (BRASIL, 2021).

A Organização Mundial da Saúde ao longo dos anos vem criando programas de estratégias que têm como meta o controle e subsequente eliminação da malária no mundo. Tais programas consideram o diagnóstico precoce correto da doença como uma das principais medidas de controle e prevenção da transmissão da doença (WHO, 2019). O mercado de diagnóstico para malária demonstra uma necessidade cada vez maior de aumentar as suas capacidades, de maneira a atender satisfatoriamente a população mundial. Para tanto, é preciso descentralizar a produção de insumos, atualmente concentrada na América do Norte (WITTENAUER; NOWAK; LUTER, 2022).

Há também demanda para a criação de novas tecnologias, que possam fornecer as características ideais para detecção sensível, específica e confiável da malária. Visando essas problemáticas, nossa equipe vem buscando desenvolver novos insumos e métodos para o diagnóstico de malária. Tais estudos focaram nos antígenos HRP2 (proteína 2 rica em histidina) e pLDH (lactato desidrogenase de plasmódio) para desenvolver anticorpos para detecção desses marcadores de infecção malárica. No entanto, tem havido uma dificuldade em encontrar uma abordagem que forneça anticorpos que reconheçam os antígenos especificamente e apresentem altos títulos de anticorpos específicos (GLÓRIA, 2018; MARIÚBA, 2010; SOUSA et al., 2014).

Por esse motivo, passamos a empregar a tecnologia IgY, a qual consiste na imunização de galinhas e extração de anticorpos IgY da gema dos ovos, uma vez que é uma alternativa mais ética e com melhor custo benefício. Sendo assim, utilizamos peptídeos sintéticos referentes à proteína pLDH, cujas sequências foram obtidas em estudo realizado por

Hurdayal et al. (2010), e de glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH) em imunizações de galinhas visando obtenção de anticorpos IgY para contra marcadores de infecção malárica. Objetivando a obtenção de anticorpos específicos, utilizamos nanotubos de carbono solubilizados por um método desenvolvido por nossa equipe (GLÓRIA et al., 2020) como carreadores nas imunizações. As análises de reconhecimento dos anticorpos à proteína nativa foram feitas por meio de citometria de fluxo utilizando amostras de pacientes.

Utilizamos também a tecnologia de impressão molecular (*Molecular Imprinting Technology*-MIT) para desenvolver outro método inédito para diagnóstico de malária, utilizando um polímero molecularmente impresso (*Molecular Imprinted Polymer*-MIP) para detecção do marcador de infecção de *P. falciparum*, HRP2. Tecnologia essa que dispensa o uso de animais para obtenção de ferramentas de detecção.

Com isso, apresentamos nesse documento, a criação de novas ferramentas que visam trazer soluções éticas e economicamente vantajosas para o mercado de diagnóstico da malária, diminuindo ou excluindo a necessidade de causar dor e/ou desconforto a animais e apresentando alto rendimento. Sendo assim, esperamos contribuir para mudanças positivas na área de diagnóstico de doenças no geral.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que se apresenta de maneira aguda e não contagiosa. De todas as espécies apenas *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e, mais recentemente, *Plasmodium cynomolgi* e *Plasmodium simium*, são capazes de infectar humanos. *P. knowlesi* e *P. cynomolgi*, apesar de inicialmente serem apenas encontrados em primatas, há relatos de serem responsáveis por infecções naturalmente adquiridas em humanos (IMWONG et al., 2019; SINGH; DANESHVAR, 2013; TA et al., 2014). Entre 2015 e 2016 houve um surto de malária causada por *Plasmodium simium* (espécie infectante a primatas) no Rio de Janeiro, o qual foi rapidamente controlada e não foram mais reportados casos semelhantes (BRASIL et al., 2017).

Os vetores da malária são as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, que transmitem o parasito durante seu repasto sanguíneo. Os indivíduos infectados, mesmo que não apresentem sintomas (assintomáticos), podem abrigar formas sexuais dos parasitos, tornando-se reservatórios para infecção de mosquitos. E, embora ocorra com menos frequência, a malária também pode ser transmitida por transfusões sanguíneas ou pelo compartilhamento de seringas contaminadas (SEED; KITCHEN; DAVIS, 2005).

A febre alta é o principal sintoma da malária, tais episódios febris se apresentam em intervalos de 48 ou 72 horas podendo, eventualmente, se tornar intermitentes. Os parasitos *P. vivax* e *P. ovale*, causam a febre terçã (intervalos de 48 horas) benigna. Já dos parasitos *P. falciparum* causam a terçã maligna (chamada assim por ser a infecção malárica mais debilitante). O parasito *P. malariae* é o causador da febre quartã (intervalos de 72 horas) (SIROMA; FERRANI; RIGO, 2016). Outros sintomas da infecção malárica incluem: cefaleia, calafrios, sudorese, náuseas, vômitos e mialgia (WEISS et al., 2010).

A espécie *P. falciparum* possui afinidade com hemácias em qualquer estágio de maturação, portanto os níveis de parasitemia são mais altos em infecções causadas por esta espécie, e os sintomas, mais agudos (DE SOUZA; RILEY, 2002; GILLES, 2004; PETER; MANUEL; SHETTY, 2011). Um agravante maior ainda é capacidade do *P. falciparum* de fazer sequestração de parasito, podendo causar lesão nos tecidos cerebrais, chamada de malária cerebral (IDRO et al., 2010; WASSMER et al., 2015).

Por outro lado, *P. vivax* e *P. ovale* possuem preferência por 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. Entretanto, é possível constatar uma elevação na intensidade dos sintomas decorrentes da malária causada por *P. vivax*, tais como anemia grave e plaquetopenia, causando maior morbidade e mortalidade (VENTURA, 2010). *P. malariae*, pelo fato de preferir infectar em hemácias maduras, causa a infecção mais branda (DE SOUZA; RILEY, 2002).

De maneira geral, as similaridades dos sintomas causados pela malária com os sintomas causados por outras doenças como, por exemplo, a dengue, hepatite viral e leptospirose, entre outras, dificulta seu diagnóstico (COSTA et al., 2010).

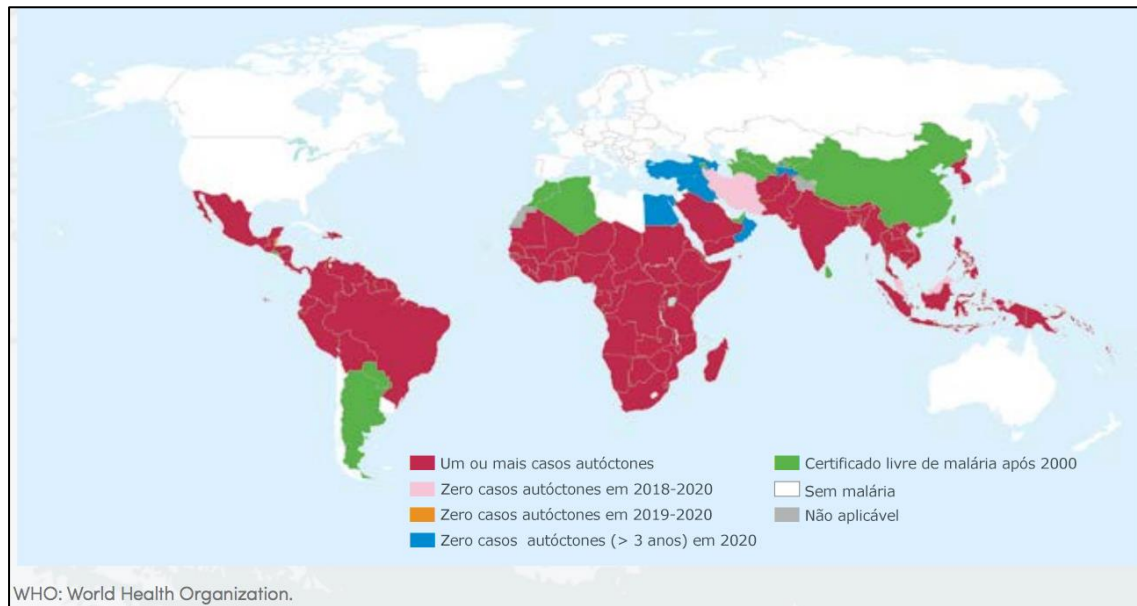
1.2 EPIDEMIOLOGIA

Em 2020 foram registrados 241 milhões de casos de malária, e aproximadamente 627 mil destes casos levaram a óbito, apresentando um aumento de 12% em relação a 2019 (WHO, 2021a). Um total de 26 países endêmicos foram responsáveis por 96% dos casos reportados, e 6 países (Nigéria, Uganda, República Democrática do Congo, Moçambique, Angola e Burkina Faso), representaram 55% do total de casos (WHO, 2021a) (FIGURA 1).

O parasito *P. falciparum* é mais prevalente na região africana, sendo responsável pela maioria dos casos e mortes reportados. *P. vivax* é o segundo mais prevalente e o mais amplamente distribuído, o qual apresentou um decréscimo na porcentagem de casos, indo de 8% dos casos em 2000, para 2% em 2020 (WHO, 2021a).

De modo geral, de 2010 a 2018 o número de casos de malária diminuiu gradativamente, apresentando uma queda de 23 milhões dentro desse intervalo de tempo (WHO, 2021a). No entanto, além da queda ter sido menos expressiva a partir de 2016, devido ao fato das medidas de prevenção estarem sendo aplicadas com menos rigor em alguns dos países endêmicos e da instabilidade política e econômica em alguns desses países, como no caso da República da Venezuela (WHO, 2019), as restrições estabelecidas durante a pandemia da COVID-19 causou o interrompimento temporário nos serviços de combate e prevenção à malária, levando a um aumento significativo no número de casos e óbitos (WHO, 2021a).

Figura 1. Países com casos autóctones em 2000 e seu status em 2020. Considera-se países sem casos autóctones por pelo menos 3 anos eliminaram malária.



Fonte: Adaptado de WHO, 2021a.

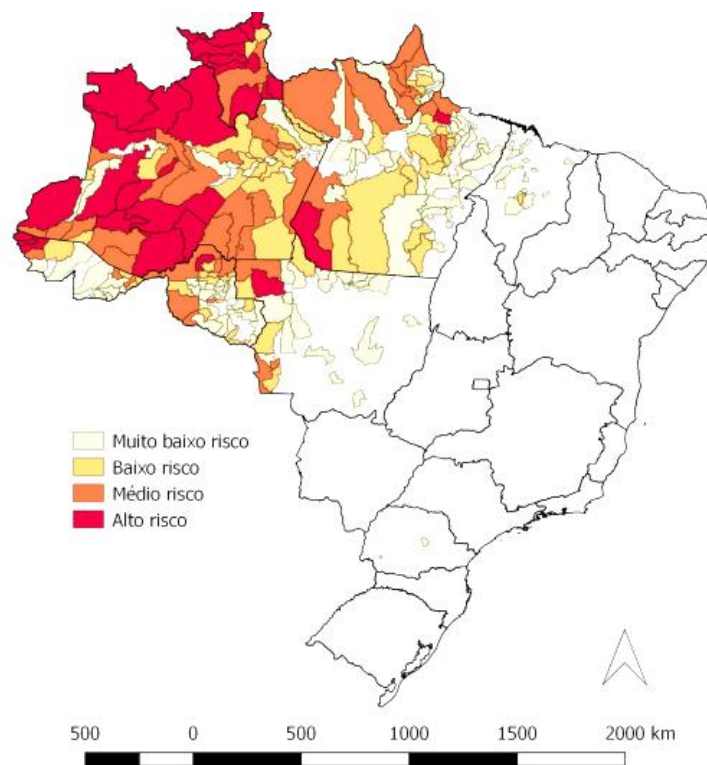
A malária, em adição ao dano que causa à saúde da população, causa um grande impacto econômico nos países nos quais é endêmico. Na África, aproximadamente 2% do seu produto interno bruto (PIB) é comprometido devido à infecção de pessoas em idade produtiva (GALLUP; SACHS, 2012). Estima-se que a malária esteja custando à África cerca de 12 bilhões de dólares por ano e, portanto o combate a essa doença é essencial para economia do continente (GALLUP; SACHS, 2012).

Deve-se, além dos problemas econômicos, considerar os impactos na integridade física e mental das pessoas acometidas pela malária, mesmo em casos de malária não grave - tanto pelo *P. falciparum* quanto pelo *P. vivax* - pois essa questão contribui com o empobrecimento dos países afetados por esta doença (FERNANDO et al., 2003). Ademais, há estudos que mostram efeitos negativos da malária no desempenho escolar das crianças que são infectadas pelo parasito, e em funções cognitivas de crianças e idosos (PESSOA et al., 2022; TAPAJÓS et al., 2019; VITOR-SILVA et al., 2009; VORASAN et al., 2015).

1.2.1 Malária no Brasil

A malária é a infecção parasitária mais prevalente no Brasil, sendo na Amazônia legal onde se concentram as áreas de maior risco (FIGURA 2) (BRASIL, 2021), e o *Plasmodium vivax*, a espécie que é maior causadora de infecções. Em 2020, foram registrados aproximadamente 141 mil casos, apresentando uma redução de 10,5% em relação a 2019, sendo que 24 levaram a óbito (BRASIL, 2021). O *P. vivax* foi responsável por 84,2% dos casos, seguido das infecções por *P. falciparum* com, 15,8% (BRASIL, 2021).

Figura 2. Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2020, por município.



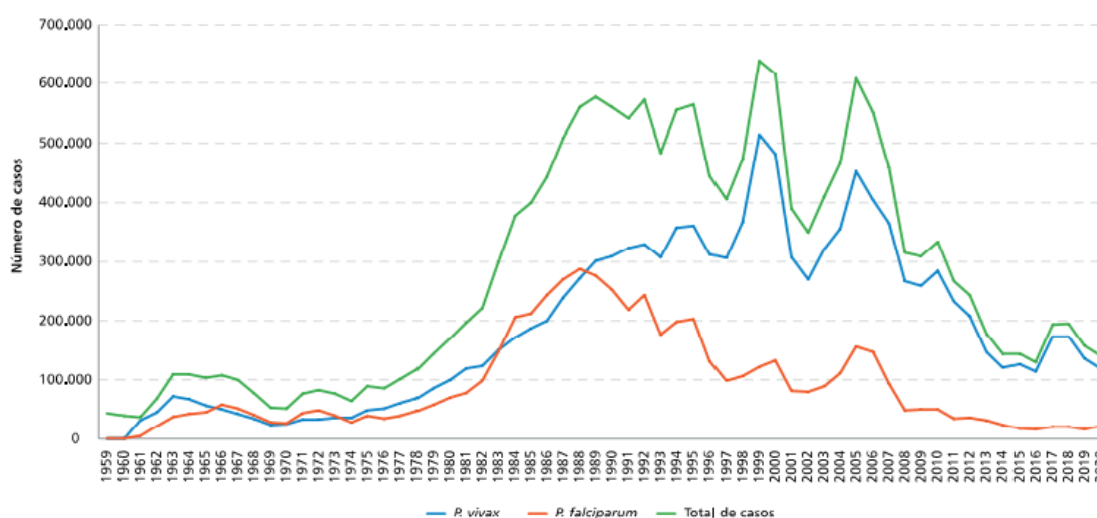
Fonte: BRASIL, 2021.

O principal vetor da malária no Brasil é o *Anopheles darlingi*, e a região amazônica possui as características favoráveis ao desenvolvimento deste vetor, sendo caracterizada pelo clima tropical úmido, chuvas abundantes, temperatura elevada e as vias hidrográficas (PENHALBEL et al., 2005), sendo por esse motivo, a região com o maior número de casos no país. A incidência de malária na região Amazônica oscila ao longo do ano, acompanhando as características climáticas de cada período, uma vez que a transmissão aumenta em temporadas chuvosas (BRASIL, 2009).

Devido uma ação iniciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no século XX a malária teve uma queda expressiva em números de casos no Brasil, quase sendo extinta de algumas regiões antes consideradas como endêmicas. Entretanto, os números de casos voltaram a subir entre as décadas de 1960 e 1970. Crescimento atribuído, principalmente, ao desmatamento da Região Amazônica para ampliação da área urbana para o garimpo (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002). As periferias urbanas também contribuíram para o aumento dos casos, uma vez que possuíam condições precárias de saneamento básico, situação causada principalmente pelo êxodo rural, propiciando condições adequadas à transmissão da malária (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002).

Em 2016 a OMS indicou ações para prevenção e tratamento da malária, dentre as quais se destacam: aplicação de inseticidas e eliminação de larvas; administração de antimaláricos em vulneráveis como crianças e mulheres grávidas; o uso de mosquiteiros tratados com inseticida (MTI); rapidez na confirmação das suspeitas de infecção por meio de diagnóstico por microscopia e/ou teste de diagnóstico rápido (TDR); tratamento com as drogas adequado a espécie de parasito causador da infecção em tempo hábil. Com esses esforços empregados pelo Ministério da saúde, é possível observar que houve uma diminuição expressiva no número de notificações ao longo dos anos, apesar de algumas oscilações (FIGURA 3).

Figura 3. Casos de malária notificados no Brasil, 1959-2020*.



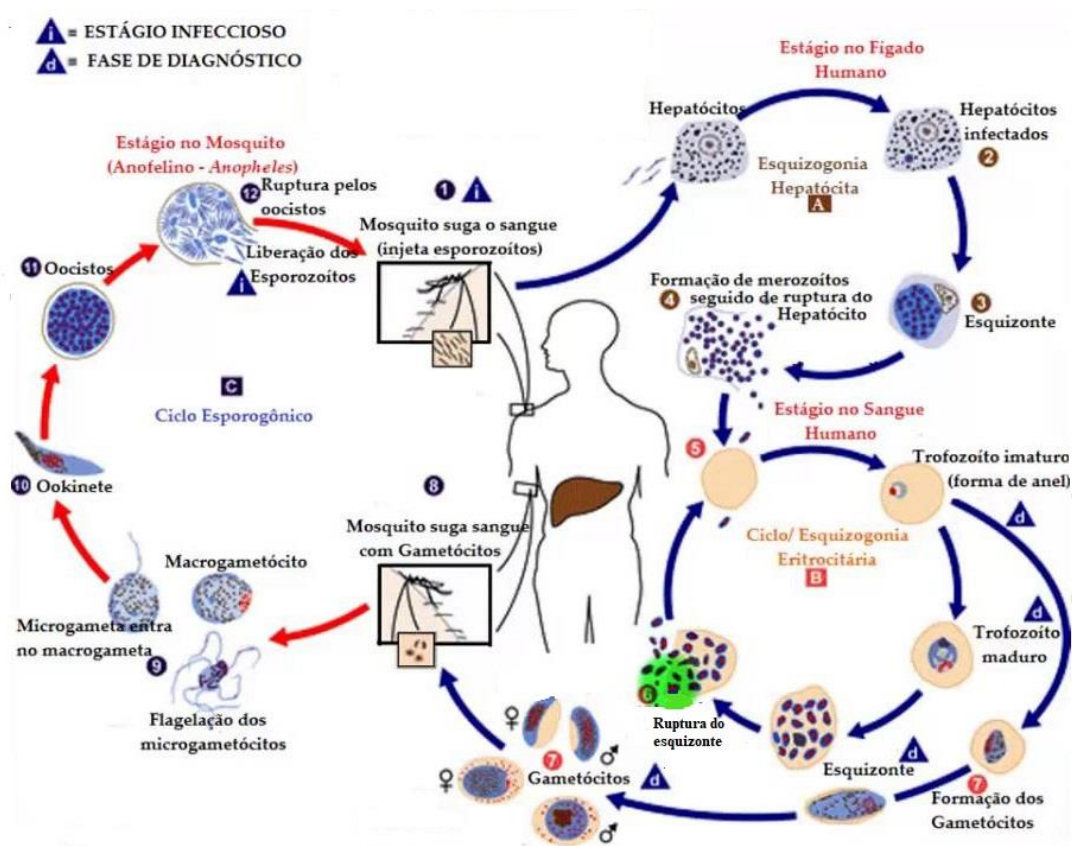
Fonte: BRASIL, 2021.

Em 2022 o Ministério da Saúde lançou o Plano de Eliminação da Malária, cuja meta é atingir menos de 68 mil casos autóctones até 2025 e a completa eliminação da doença em 2035 (BRASIL, 2022). Tais objetivos podem ser considerados ambiciosos, porém o Brasil possui a capacidade e condições estruturais e econômicas de alcançar tais metas, caso implemente as medidas de maneira satisfatória.

1.3 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium* sp.

Os parasitos do gênero *Plasmodium* necessitam de um hospedeiro definitivo invertebrado (onde ocorre sua reprodução sexuada), neste caso, fêmeas de mosquito do gênero *Anopheles*, e um hospedeiro intermediário vertebrado (onde acontece a reprodução assexuada) (BARBOSA et al., 2014) (FIGURA 4).

Figura 4. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. em hospedeiro humano.



Fonte: http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm

Adaptado por França et al., 2008.

Como ilustrado na figura 4, no início do ciclo, durante o repasto sanguíneo as fêmeas de *Anopheles* inoculam abaixo do tecido cutâneo formas dos parasitos chamadas de esporozoítos, os quais permanecem na derme até conseguirem se introduzir na corrente sanguínea (AMINO et al., 2006). Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos chegam até o fígado, infectando os hepatócitos e dando início à chamada fase pré-eritrocítica (MILLER et al., 2002). Neste período, os esporozoítos passam por um processo de maturação, formando os esquizontes.

Os plasmódios da espécie *P. vivax* e *P. ovale* apresentam esquizontes que têm a capacidade de ficarem latentes no fígado por vários meses ou até mesmo por anos. Estas formas resistentes são chamadas de hipnozoítos, que podem voltar à forma de esquizontes teciduais e causar recaídas (ASHLEY et al., 2006). Terminada a fase pré-eritrocítica, os esquizontes rompem os hepatócitos, liberando formas do parasito chamadas de merozoítos na corrente sanguínea, que então invadem as hemácias (KROTOSKI, 1985; FARID; KILLPATRICK; CHIODINI, 1993) (FIGURA 4).

O ciclo eritrocítico então se inicia, onde merozoítos se dividem originando os trofozoítos, que possuem forma de anel e utilizam a hemoglobina como fonte de energia para seu metabolismo, formando novamente esquizontes de maturação. Com a posterior ruptura do esquizonte, novos merozoítos são liberados na corrente sanguínea os quais invadirão as hemácias, reiniciando o ciclo eritrocítico. Nesta fase, com a replicação de parasitos e a liberação de proteínas destes, os sintomas clínicos da doença se manifestam (D'ACREMONT et al., 2014; HVIID, 1998).

Durante o ciclo eritrocítico, alguns trofozoítos se diferenciam em macrogametócitos e microgametócitos, que são respectivamente, formas sexuadas feminina e masculina dos parasitos (gametócitos), os quais infectam o vetor durante um novo repasto sanguíneo, dando início à fase sexuada do ciclo de vida do plasmódio (DE SOUZA; RILEY, 2002; BRUCE et al., 1990).

Uma vez dentro dos vetores, as hemácias contendo os gametas feminino e masculino se rompem e, após a maturação, ocorre a fecundação, dando origem ao oocineto. Este viaja pelas células epiteliais do mosquito, transforma-se em oocisto, ancora-se ao intestino médio do mosquito, passando por transformações estruturais e originando esporozoítos (BRUCE et al., 1990; MOORE et al., 2002). Eventualmente o oocisto se rompe e os esporozoítos liberados migram até as glândulas salivares do mosquito, que se torna capaz de transmitir o parasito aos vertebrados (BRUCE et al., 1990; MOORE et al., 2002).

1.4 VACINA PARA MALÁRIA

O desenvolvimento de vacinas contra malária encontra-se em andamento desde a década de 1960, e apresenta grandes desafios devido algumas problemáticas, como por exemplo, o alto polimorfismo do parasito e, com isso, dificuldade em despertar uma resposta imune protetora e duradora, dado à capacidade do parasito em escapar da resposta imune (LÊ et al., 2018; MOHAMED et al., 2019; ZEESHAN et al., 2012). Desde então, uma variedade de vacinas contra diferentes estágios do ciclo do parasito no hospedeiro humano esteve ou continua em desenvolvimento (CLYDE et al., 1975; CAWLFIELD et al., 2019; HOFFMAN et al., 2010; MORDMÜLLER et al., 2017; MUELLER et al., 2005; RST,S CLINICALS TRIALS PARTNERSHIP, 2015).

Apesar deste esforço da comunidade científica, apenas em 2021 é que a primeira vacina contra malária foi recomendada pela OMS, a qual se chama Mosquirix™ (RST,S CLINICALS TRIALS PARTNERSHIP 2021). Esta vacina tem como alvo a fase pré-eritrocítica do *P. falciparum*, na fase de esporozoíto do parasito, e impede a invasão dessas formas infectantes no fígado, e consiste em uma proteína recombinante que tem como alvo a proteína circunsporozoíta (CSP) a qual foi co-expressa com o antígeno de superfície da hepatite B, tanto livre quanto fusionado, e formulada com o adjuvante AS01 (COHEN et al. 2010; GORDON et al. 1996; RST,S CLINICALS TRIALS PARTNERSHIP, 2015).

Após resultados obtidos fase 4 dos testes clínicos da Mosquirix™, os quais foram conduzidos em diferentes países da África que são endêmicos para a malária, a vacina passou a ser recomendada como medida de prevenção em países de alta e média endemicidade a crianças a partir de 5 meses idade. A vacina foi capaz de diminuir o risco de malária grave em 29%, após a administração de 4 doses (RST,S CLINICALS TRIALS PARTNERSHIP, 2021).

Apesar da eficácia geral obtida de aproximadamente 50% poder ser considerada baixa, ainda assim apresenta um grande avanço contra uma doença que mata uma criança a cada 2 minutos (WHO, 2019). A iniciativa da OMS em diminuir os coeficientes de incidência e mortalidade em 90% até 2030 se mostraram infrutíferas, no entanto, a implementação dessa vacina pode fazer com que essas metas se tornem mais próximas de serem atingidas (RST,S CLINICALS TRIALS PARTNERSHIP, 2021).

1.5 TRATAMENTO DE MALÁRIA

O tratamento da malária deve sempre ser feito de forma mais rápida e eficaz possível, de maneira a evitar o agravamento da doença, quebrar a cadeia de transmissão e também limitar a resistência dos parasitos aos antimaláricos (WHO, 2015). A OMS recomenda que, após o diagnóstico correto da doença, o antimalárico adequado a espécie seja administrado em até 48 horas (WHO, 2021Ab).

Os medicamentos antimaláricos começaram a ser produzidos na década de 40, podendo ser provenientes de compostos sintéticos ou naturais. Estes fármacos podem ser quinolínicos (cloroquina, piperaquina, amodiaquina, quinica e mefloquina), antagonistas de folato (sulfadoxina, sulfodiazina, pirimetanina e dapsona) e artemisina e derivados (GOLDEN et al., 2015; FERNÁNDEZ-VILLA; AGUILAR; ROJO, 2019; PINHEIRO et al., 2018). A indicação destes medicamentos muda de acordo com as condições de cada paciente, possuindo administração distinta para casos leves e graves, grávidas, adultos ou crianças, para quem sofre com epilepsia, depressão, entre outras condições (SCHANTZ-DUNN, 2009; WHO, 2015).

Um dos problemas em relação ao tratamento dos antimaláricos se dá pela baixa aderência dos pacientes ao tratamento, uma vez que a grande maioria desses fármacos apresenta efeitos colaterais desagradáveis como dor de cabeça, náuseas, diarreia, desconforto estomacal, etc (ALBRIGHT; BINNS; KATZ, 2002; LUZZI; PETO, 1993). Com essa problemática, tratamentos de dose única são propostos, tais quais o da mefloquina, tafenoquina ou sulfadoxina-pitimetamina (CHU; WHITE, 2021; LACERDA et al., 2019; MAGILL et al., 2004), sendo necessário garantir que essa dose única seja bem absorvida pelo organismo e assim, elimine completamente a infecção (WHITE; NOSTEN, 2021).

A maioria dos casos não graves de malária são tratados com uma combinação de artemisina com outro fármaco antimalárico, a chamada ACT (*artemisin-based combination therapy*). No entanto, a resistência a antimaláricos, principalmente a artemisina, vem crescendo nos continentes endêmicos (ASHLEY et al., 2014; LO et al., 2017; WHITE, 2004), nas espécies de *P. falciparum*, *P. vivax* (FOGH; JEPSEN; EFFERSON, 1979; PHILLIPS; KEYSTONE; KAIN, 1996).

Com isso, torna-se importante o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam eficazes na eliminação parasitária, uma vez que a diminuição na eficácia de tratamento deve acarretar uma maior mortalidade, pois a malária severa é praticamente mortal sem tratamento (WHO, 2021b).

Um dos mais novos tratamentos desenvolvidos para malária consiste no fármaco DSM265, que se mostra eficaz para infecções de *P. vivax* e *P. falciparum*, atua nos estágios sanguíneo e hepático, com o potencial de administrado em dose única (LLANOS-CUENTAS et al. 2018). Outros fármacos recentemente desenvolvidos incluem arterolane, cipargamin e a KAF156, que possuem o potencial de substituir os tratamentos onde há resistência (TOURE et al., 2015; WHITE et al., 2016).

1.6 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

O diagnóstico, bem como o tratamento de pacientes com malária, são as principais medidas de prevenção, pois impedem que as infecções progridam para casos mais graves e que os indivíduos infectados sirvam de reservatório de parasitos, perpetuando a transmissão da doença (WHO, 2011).

Em 2017, a OMS recomendou que todos os casos suspeitos de malária sejam confirmados por microscopia ou testes de diagnóstico rápido (TDR) antes que o tratamento seja administrado, pois assim é garantida a administração do antimalárico correto à espécie de *Plasmodium*, diminuindo possíveis erros no tratamento e também evitando possíveis resistências dos parasitos aos medicamentos (WHO, 2017).

A microscopia continua sendo a metodologia mais utilizada para verificação de infecções maláricas (MURPHY et al., 2013). Entretanto, vários métodos de detecção podem ser utilizados, diagnósticos moleculares, testes sorológicos, testes imunocromatográficos de fluxo, bissensores e outros.

1.6.1 Biomarcadores para infecção malárica

1.6.1.1 Hemozoína

O parasito da malária, e algumas outras espécies de parasitos, produzem durante o ciclo de vida nos eritrócitos microcristais chamados hemozoína (OLIVIER; SHIO; KASSA, 2010). Este são formados quando o parasita digere a hemoglobina das hemácias, gerando aminoácidos e uma porção heme (ferriprotoporfina XI), as quais são polimerizadas para formar a hemozoína (OLIVIER; SHIO; KASSA, 2010).

Rifaie-Graham et al. (2019) desenvolveram um método para detecção de malária onde as hemozoínas são detectadas utilizando espectroscopia de UV-visível. O teste possui alta sensibilidade e limite de detecção de 0.85 ng mL^{-1} , porém não é possível diferenciar as espécies causadoras de malária ou outras doenças (RIFAIE-GRAHAM et al., 2019).

1.6.1.2 Aldolases

O plasmódio produz diversas enzimas essenciais para seu metabolismo, dentre elas as aldolases. Estas são responsáveis pela reação reversível de catálise da clivagem de frutose - 1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfatada (SRIVASTAVA et al., 1990).

Tais enzimas são marcadoras de infecção para malária, sendo uma isoenzima tetramérica com subunidades de aproximadamente 40 kDa, conservada entre as espécies, logo servindo de marcador pan-específico para plasmódio (DZAKAH et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 1990; JAIN et al 2014; DOBELI et al., 1990).

1.6.1.3 Proteína 2 rica em histidina (HRP2)

A proteína 2 rica em histidina (HRP2) é um marcador de infecção de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, e possui essa denominação pelo fato de ser de 73% composta pelo aminoácido histidina (JAIN et al., 2014).

É uma proteína muito utilizada em testes de imunodiagnósticos, sendo a mais utilizada em testes de diagnóstico rápido. No entanto, a deleção do gene de HRP2 vem emergindo em vários países o que diminui drasticamente a sua eficácia em diagnóstico (GOÉS et al., 2021; PROSSER et al., 2021; KAAYA et al., 2022).

Apesar de a HRP2 ter uma maior sensibilidade em testes de diagnóstico, quando comparado com outros de infecção malárica, outra desvantagem em relação ao seu uso se dá pelo fato de ainda poder ser encontrada na corrente sanguínea do paciente, mesmo após a cura deste, podendo levar a resultados falsos-positivos (IQBAL et al., 2004; PLUCINSKI et al., 2018).

1.6.1.4 Glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH)

A glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH), é uma proteína essencial para obtenção de energia via ciclo de Krebs durante o ciclo eritrocítico, onde atua convertendo, por meio de oxidação, o glutamato em alfa-cetoglutarato, utilizando NADH e liberando NADPH (SHERMANN et al., 1971). É uma proteína solúvel de aproximadamente 50-60 kDA (DOMINGUEZ et al., 1996; RODRIGUÉZ-ACOSTA et al., 1998).

A pGDH é um antígeno resistente ao calor, que é utilizado como marcador de infecção malárica. Foi primeiramente isolada de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* (RODRIGUÉZ-ACOSTA et al., 1998), no entanto, por ser uma proteína metabólica, está presente nas diferentes espécies de plasmódio.

Apesar do plasmódio apresentar um metabolismo semelhante ao seu hospedeiro, a GDH de plasmódio possui muitas características divergentes, dentre as quais podemos destacar a especificidade de cofatores, substratos, perfil eletroforético, afinidade e imunogenicidade (KORI; VALECHA; ANKIVAR, 2020; LOMNICZI et al., 2006; SHERMANN et al., 1971). Além disso, a proteína GDH não está presente nos eritrócitos dos hospedeiros (WAGNER et al., 1998).

Apesar de Aparicio et al. (2010) terem relacionado a GDH como alvo para desenvolvimento de antimaláricos, Storm et al. (2011) mostrou que, dependendo do tipo da GDH a ser utilizada, a proteína pode não afetar o crescimento parasitário de maneira satisfatória. Outros estudos já empregam a GDH ao diagnóstico de malária, dos quais podemos destacar o estudo desenvolvido por Singh et al., (2019), que utilizou um biossensor baseado em aptâmeros para detecção de GDH de *P. falciparum*. O teste desenvolvido apresentou alta sensibilidade, porém ainda se faz necessária a validação em campo.

Ahmad et. al., (2019) realizaram um estudo de diversidade genética e homologia com isolados de *P. falciparum* de oito regiões diferentes da Índia, e este estudo concluiu que a GDH é conservada entre os isolados das regiões. Isto indica que a GDH é um bom marcador de infecção para o desenvolvimento de novos testes, apresentando-se como uma nova alternativa aos testes baseados na detecção de HRP2, em regiões onde a deleção deste gene é um problema.

Uma vez que a GDH ainda não é um marcador comumente utilizado para o diagnóstico de malária, mais estudos são necessários para que passe a ser utilizado no mercado, principalmente em testes de diagnóstico rápido.

1.6.1.5 Lactato Desidrogenase de Plasmódio (pLDH)

Durante o ciclo eritrocítico, o parasito faz uso da respiração anaeróbica para geração de ATP a partir da glucose, e o NAD^+ é recuperado por meio da conversão de piruvato a lactato, esta reação é realizada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), a qual é a última enzima da via glicolítica. Uma vez que a mitocôndria contribui minimamente para a geração de ATP, as enzimas da via glicolítica são super expressas (FRY; WEBB; PUDNEY, 1990).

A LDH plasmodial consiste em uma proteína tetramérica, onde cada monômero apresenta dois domínios de dobraduras (DUNN et al., 1996) e, por ser uma proteína essencial ao metabolismo do parasito, é um bom marcador de infecção. Este marcador, dependendo da sequência escolhida como alvo ao desenvolvimento de ferramentas de detecção, pode ser específico a espécies de plasmódio ou pan-específica (capaz de detectar mais de uma espécie do parasita por vez) (KELUSKAR et al., 2014; TALMAN et al., 2007).

A pLDH não é encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro após a cura da doença, sendo por isso, um marcador de infecção ativa, diferentemente da proteína HRP2, que ainda apresenta níveis detectáveis após a cura do paciente (MARKWALTER et al., 2018; PLUCINSKI et al., 2019). Além disso, a proteína LDH de *Plasmodium falciparum* apresenta níveis de LDH correlacionáveis com os níveis de parasitemia (MARKLER; HINRICHS, 1993). Estudos indicam que as sequências de LDH em cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são bem conservadas, apresentando algumas mutações que não são capazes de alterar a estrutura da proteína, sendo assim, apresentando mais essa vantagem ao ser utilizada como alvo para o diagnóstico de malária (LEE et al., 2020; SIMPALIPAN; PATTARADILOKRAT; HARNYUTTANAKORN, 2018).

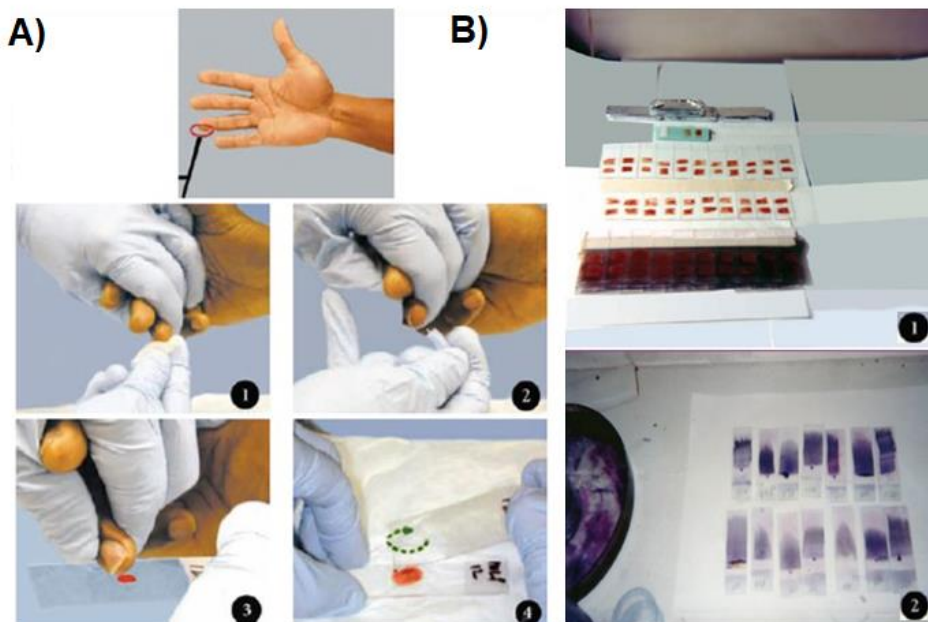
A LDH de plasmódio é largamente empregada como molécula alvo em diversas metodologias de diagnóstico, sendo esses baseados na interação antígeno-anticorpo, podendo ser ELISA, imunoenaios de microfluídica, testes em fluxo lateral, citometria de fluxo ((LEE et al., 2020; SOUSA et al., 2014; VEBIYANTI; MURHANDARWATI; JOKORANTO, 2015), e mais recentemente, também vêm sendo utilizada para detecção por meio de biossensores (HEMBEN; ASHLEY; TOTHILL, 2018; MU; YU; WELLEMS, 2021).

Este marcador de infecção apresenta diversas vantagens em relação ao seu uso, no entanto, apesar do nível de especificidade apresentado em testes, ele ainda mostra níveis de sensibilidade inferior quando comparada com a detecção por HRP2, por exemplo, principalmente no que tange testes rápidos (HOUZÉ et al., 2009; KYABAYINZE et al., 2016).

1.6.2 Diagnóstico por Microscopia

A microscopia continua sendo o padrão-ouro para detecção de malária visto sua vantagem em diferenciação e quantificação das espécies, ser pouco oneroso e com alta sensibilidade. Logo, esta metodologia é utilizada como referência para os demais métodos para diagnóstico (BATWALA; MAGNUSSEN; NUWAHA, 2011; MUKADI et al., 2016; RIGLAR et al., 2011). Esta é realizada através de um esfregaço delgado ou gota espessa em lâmina (FIGURA 5), sendo a última a mais utilizada na rotina laboratorial visto a facilidade na visualização de parasito (BRASIL, 2009). Para isto, o sangue periférico é retirado do paciente, a lâmina preparada com uso de corantes (sendo Giemsa o mais comumente utilizado) e analisada no microscópio óptico por um técnico (BRASIL, 2009). Dependendo da experiência do técnico responsável pela análise, a microscopia pode detectar entre 5 a 10 parasitos/ μL , subindo para 100 parasitos/ μL em campo. Em média, 60 minutos são necessários para a realização deste exame (BRASIL, 2009).

Figura 5. Diagnóstico de malária por microscopia. A) Punção digital e preparação de lâminas; B) 1: Gota espessa; e 2: Esfregaço sanguíneo.



Fonte: Brasil, 2009.

Apesar de apresentar as vantagens destacadas, esta técnica apresenta diversos vieses que podem prejudicar o correto desenvolvimento do ensaio, tais como o mal preparo das lâminas, erros no reconhecimento da espécie, hemólise, dentre outros (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011). Logo, há a necessidade de técnicos bem treinados para a realização deste exame, juntamente com uma infraestrutura e equipamentos adequados (MANGOLD et al., 2005).

1.6.3 Diagnóstico Molecular

A detecção molecular de plasmódio é descrita na literatura desde 1989, quando Waters e McCutchan amplificaram a subunidade menor de RNA ribossomal (18S rRNA) do parasita. Diversos estudos foram publicados com o mesmo fim nas últimas décadas, como de Cunha et al. (2009), usando como alvo genes mitocondriais de *P. vivax* e *P. falciparum*. Métodos ultra sensíveis também são utilizados, como PCR em tempo real, principalmente em casos onde a infecção é indetectável pelos métodos tradicionais, como em pacientes assintomáticos ou em amostras para bancos de sangue (ALI et al., 2005; ALMEIDA-DE-OLIVEIRA et al., 2019).

Outras metodologias moleculares também vêm ganhando destaque, como a *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), a qual permite a amplificação do DNA alvo sem precisar de um termociclador e em concentrações sub-microscópicas (KATRAK et al, 2017; POLLEY et al., 2010). Esta nova abordagem busca contornar a necessidade de uma infraestrutura complexa para a realização de ensaios moleculares, contudo não permite a determinação da parasitemia e pode apresentar resultados falso-positivos (COOK et al., 2015; HOPKINS et al., 2013; TANNER; ZHANG; EVANS, 2012).

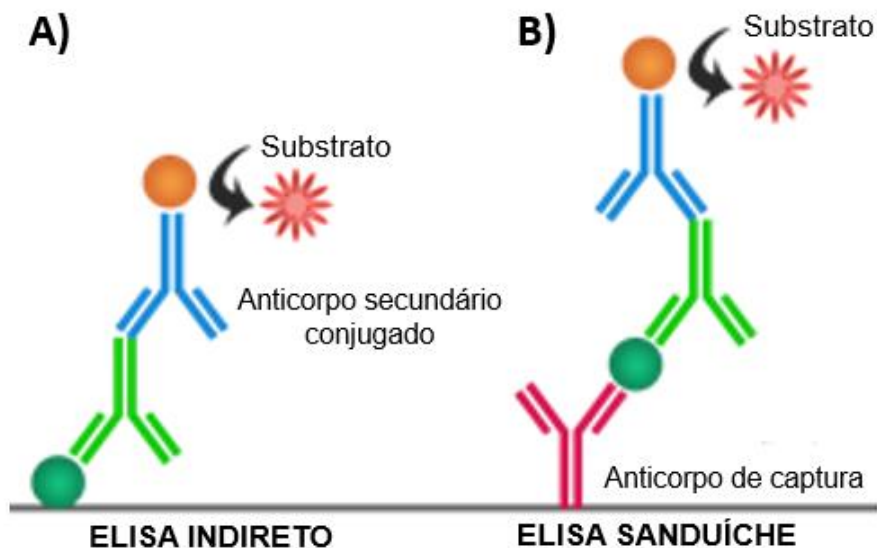
1.6.4 Diagnóstico Sorológico

Estes ensaios buscam detectar antígenos marcadores de infecção utilizando metodologias clássicas como *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Não são utilizadas na rotina em áreas endêmicas, porém, podem ser uma alternativa para laboratórios fora destas áreas ou para contra-prova em resultados negativos para microscopia, mas com quadro sintomático presente no paciente (MATHISON; PRITT, 2017; WILKINS; NUTMAN, 2015).

Diversas estruturas de imunoenaios ELISA são descritas na literatura, sendo os mais comumente utilizados o indireto e o sanduíche. No primeiro, busca-se detectar anticorpos presentes no soro do paciente que sejam reativos para o antígeno analisado. Para tanto, este é fixado em um poço em uma placa de 96 poços apropriada para a realização deste ensaio. Em seguida, o soro do paciente é colocado em contato sendo posteriormente a placa submetida a sucessivas lavagens e incubação com anticorpos secundários capazes de reconhecer o anticorpo do paciente e ligado à uma enzima. A revelação desta reação é realizada utilizando uma substância que reage com a enzima alterando assim a coloração do poço, o que permite mensurar a quantidade de reação utilizando um espectrofotômetro. Estudos de soropidemiologia utilizam esta metodologia para análise de amostras de pacientes contra diferentes antígenos, como para candidatos vacinais, por exemplo (DRAME et al., 2010; POINSIGNON et al., 2008) (FIGURA 6A).

O ELISA sanduíche é utilizado para busca de antígenos do parasita em amostras sanguíneas. Para isto, anticorpos específicos contra estas proteínas são fixados nas placas de 96 poços, seguida da incubação da amostra, anticorpo primário reativo ao antígeno alvo e finalmente anticorpo secundário para revelação do ensaio (GONÇALES; GONÇALES JR, 2004) (FIGURA 6B).

Figura 6. Princípios básicos do ELISA. A) ELISA indireto; B) ELISA sanduíche.



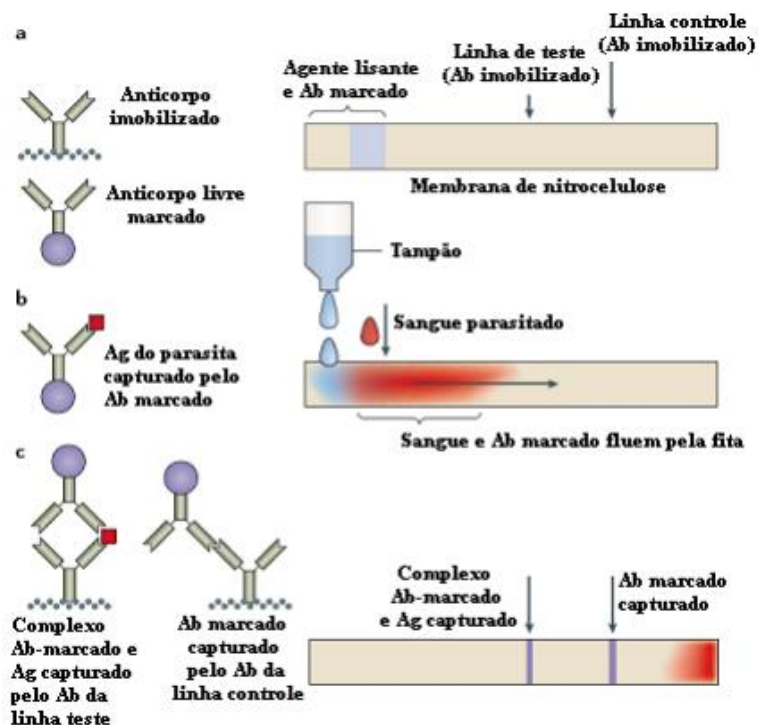
Fonte: Adaptado de GONÇALES;GONÇALES JR, 2009.

1.6.5 Testes em fluxo lateral

Os testes em fluxo lateral ou testes para diagnóstico rápido (TDR) se mostram muito úteis em regiões onde o acesso à microscopia de qualidade é dificultado, podendo oferecer resultados precisos de maneira prática e rápida. Onde a microscopia exige tempo, alta qualidade de material, alto nível de qualificação dos profissionais, e infraestrutura (principalmente energia elétrica), os TDR são alternativas relativamente simples de usar e fornecem resultado em menos de 30 minutos (MOODY, 2002; WHO, 2000).

Para realização de um teste imunocromatográfico, uma membrana de nitrocelulose é impregnada em linhas específicas com anticorpos capazes de reconhecer o antígeno marcador de infecção da doença. Ao mesmo tempo, uma segunda membrana é colocada em uma das extremidades da fita a qual contém nanopartículas de ouro coloidal ou de polímero conjugado a um segundo anticorpo reconhecedor do antígeno alvo (Figura 7A). Após a amostra ser adicionada ao sistema, esta entra em contato com o anticorpo ligado ao ouro coloidal, fluindo por capilaridade no sistema, onde, caso o antígeno-alvo esteja presente, formará um “sanduíche” com o anticorpo presente na linha teste da membrana (Figura 7B e 7C).

Figura 7. Ensaio imunocromatográfico para diagnóstico de malária. A) Preparação do dispositivo com tira de nitrocelulose, princípio de operação (B) de um chip de tira de fluxo lateral e (C) resultados esperados de uma tira de fluxo lateral.

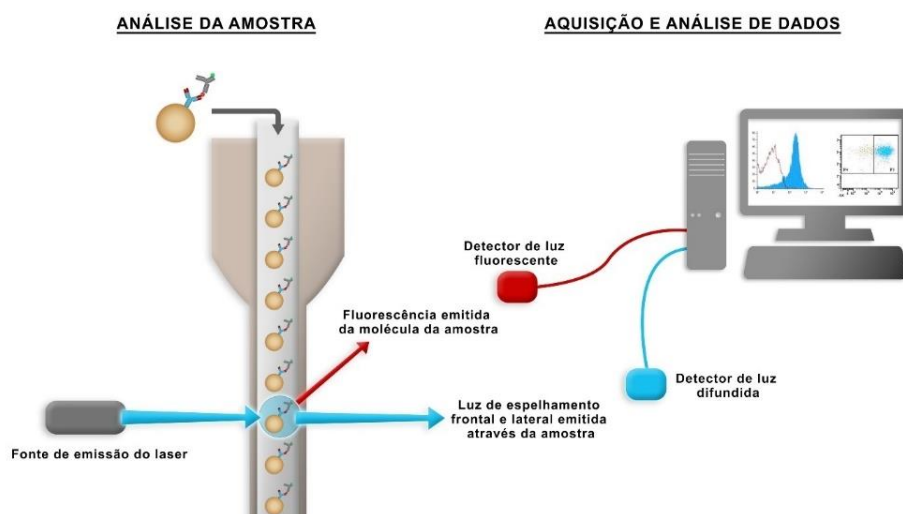


Costa et al. (2019) compararam os resultados de microscopia com os TDRs utilizados pelo sistema público brasileiro no Amazonas (Immuno-Rapid Malaria *Pf/Pv* RDT, fornecido pela Wama Diagnóstica), e concluíram que estes possuem 98.9% de sensibilidade e 100% de especificidade, assegurando assim, a qualidade dos testes. No entanto, tal estudo se limitou a população de Manaus e municípios adjacentes, não descartando a necessidade das notificações às autoridades de controle de qualidade dos testes. Vale destacar que este método diagnóstico, em outros estudos apresentaram baixa sensibilidade e especificidade quando comparado à outras técnicas, não sendo possível sua utilização para detecção, por exemplo, de pacientes assintomáticos e triagem em bancos de sangue (MALTHA; GILLET; JACOBS, 2013).

1.6.6 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de grande alta performance que inicialmente foi desenvolvida para realizar análises multiparamétricas de células de maneira individual, e que permite a detecção e análise de um grande número destas em um curto período de tempo (MCKINNON, 2018). Ela se baseia na utilização de laser emissores de luz que são capazes de gerar de sinais que são captados pelo equipamento, gerando sinais pela dispersão de luz e fluorescência (ADAN et al., 2016; FULWYLER, 1965). Tais sinais são convertidos em sinais elétricos e lidos pelo equipamento, podendo fornecer informações como tamanho, complexidade e fluorescência das partículas analisadas (GRAY et al., 1975; MCKINNON, 2018) (Figura 8).

Figura 8. Princípios de aplicação da citometria de fluxo baseada em esferas.



Fonte: FIGUEIREDO, 2022.

A citometria vêm evoluindo e independe da utilização de células para suas análises, podendo ser utilizadas diferentes tipos de partículas, a depender do propósito dos ensaios a serem realizados (HEWITT et al., 2017; JACHIMOWICZ et al., 2019; VIGNALI, 2000). Tal ferramenta possui aplicações nas mais diversas áreas da ciência tais como a biologia molecular, imunologia, bacteriologia, virologia, biologia do câncer, etc (MCKINNON, 2018). Na área da imunologia, em particular, permitiu o avanço de conhecimento sobre os sistemas imunológicos de maneira sem precedentes, de modo a fornecer informações valiosas em um único ensaio de maneira rápida e confiável. (MCKINNON, 2018)

Por ser capaz de analisar muitas moléculas em um curto período de tempo, a citometria de fluxo resulta em uma metodologia quantitativa de alta performance, e ensaios para detecção de doenças são desenvolvidos frequentemente (SALZER; SACK; FUCHS, 2019). No caso da malária, trabalhos recentes vêm concentrados seus esforços em produzir ensaios com grande poder de detecção, utilizando microesferas acopladas em anticorpos para detecção de marcadores de infecção, em ensaios do tipo sanduíche (JANG et al., 2019; PLUCINSKI et al., 2018; ROGIER et al., 2017).

Com a produção de ensaios para detecção de malária utilizando citometria de fluxo, podemos tornar possível o diagnóstico em larga escala de indivíduos assintomáticos, o que diminuiria os níveis de transmissão em áreas endêmicas e também poderia auxiliar no monitoramento da malária em bancos de sangue.

1.6.7 Biossensores

Diversas pesquisas têm sido dedicadas ao desenvolvimento de novos métodos para detecção de doenças de maneira rápida, prática e passível de realização em campo. Dentre as alternativas, os sensores eletroquímicos tem ganhado destaque nas últimas décadas, visto os resultados promissores e a existência de testes comerciais que utilizam esta metodologia, como os testes para análise de glicemia. Tais sensores são baseados na detecção da transferência de carga entre os eletrodos, havendo estudos que aplicaram estes para a detecção de anticorpos, compostos, ácidos nucleicos, atividade enzimática, antígenos, dentre outros (JANATA, 2009; WANG et al., 2008; YOON, 2013).

Os sensores químicos possuem um detector e um transdutor. O detector se caracteriza por elementos de reconhecimento, os quais vão se ligar especificamente com a

molécula alvo e o transdutor é o leitor do sinal gerado pela interação do detector com o analito, sendo capaz de quantificar os sinais (BĂNICĂ, 2012).

Os biossensores têm sido o objetivo de estudos que almejam novas metodologias para o diagnóstico de malária. Singh et al. (2018) desenvolveram um biossensor baseado em um aptâmero que se liga especificamente à glutamato desidrogenase de *P. falciparum* (*PfGDH*), com o limite de detecção de 0.77 pM.

Recentemente um método também baseado em aptâmetros que teve como alvo a lactato desidrogenase de *P. falciparum* (*PfLDH*) foi desenvolvido, o qual foi baseado em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e teve alta sensibilidade, com um limite de detecção de 0.84 pM (FIGUEROA-MIRANDA et al., 2018). Estas características dos biossensores trazem um potencial uso para amostras menos invasivas, tais como detecção de biomarcadores em saliva (GBOTOSHO et al., 2010). Contudo, vale destacar que esta metodologia ainda está em estudo para malária, estando seu uso comercial ainda não disponível.

1.6.7.1 Tecnologia de impressão molecular para desenvolvimento de anticorpos plásticos

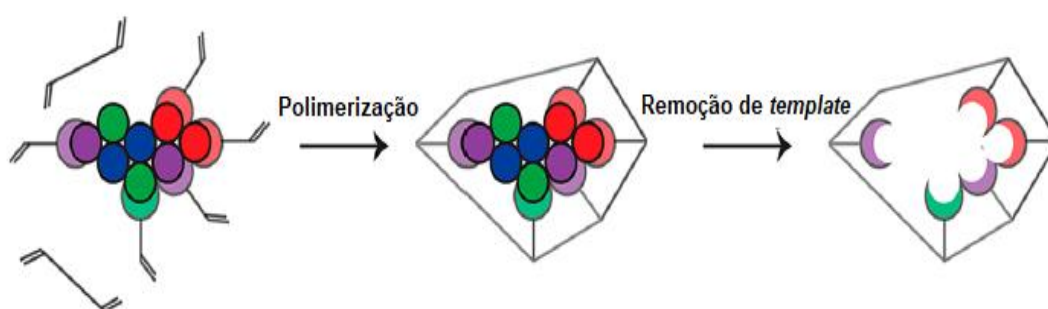
É crescente a necessidade de criação de novas tecnologias que mimetizem e/ou substituam interações biológicas, como ligações de enzima e substrato e antígeno-anticorpo. A tecnologia de impressão molecular (*Molecular Imprinting Technology*-MIT) vem se mostrando uma alternativa promissora, pois é capaz de reconhecer moléculas biológicas e químicas tais como aminoácidos e proteínas, conhecidos neste caso como anticorpos plásticos (BOSSI et al., 2007; CIEPLAK; KUTNER, 2016; SCORRANO et al., 2011), poluentes (PICHON; CHAPUIS-HUGON, 2008; TAMAYO; CASILLAS; MARTIN-STEBAN, 2005) e fármacos (PUOCI et al., 2007).

Tal tecnologia pode ser aplicada em áreas, como *delivery* de fármacos (PUOCI; IEMMA; PICCI, 2008), separação e purificação (HAGINAKA, 2008; SELLERGREEN, 2001), anticorpos biológicos, sistemas receptores (BOSSI et al, 2007; LONGO; VASAPOLLO, 2008) e sensores químicos (PILETSKY; TURNER; LAITENBERGER, 2006).

A criação de um polímero molecularmente impresso (*Molecular Imprinted Polymer*-MIP) se dá pela interação entre uma molécula *template* e um monômero funcional que, por meio do processo de polimerização do monômero, formará uma matriz polimérica (FIGURA 9). A molécula é removida dessa matriz, deixando uma estrutura tridimensional com sítios de

reconhecimento complementares em formato, tamanho e funcionalidade química à molécula *template*. Interações intermoleculares como ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, e interações iônicas entre a molécula *template* e os grupos funcionais presentes na matriz polimérica direcionam o reconhecimento e, como resultado, os MIPs interagem seletivamente com a molécula alvo.

Figura 9. Processo geral de impressão molecular. A molécula *template* interage com monômeros ou polímeros para formar uma cavidade ao redor da molécula *template*, e este é subsequentemente removido, deixando para trás a cavidade molecularmente impressa vazia para religar a molécula alvo.



Fonte: Adaptado de CULVER; PEPPAS, 2017.

Existem várias abordagens para a produção de MIPs para detecção eletroquímica, podendo ser uma polimerização de radical livre, que pode ser classificada em multi-etapas, suspensão, emulsão, em *bulk*, etc (CHEN et al., 2016; CHOI et al., 2019; MATTIASSON, 2015), e as eletropolimerizações, que são processos simples nos quais uma camada de polímero condutor juntamente com a molécula *template* é formada na superfície de eletrodo que, após a remoção do *template*, será avaliado o perfil eletroquímico (MELLO; HÜMMELGEN, 2001). Existem vantagens relacionadas à formação de MIPs por meio de eletropolimerização, como o maior controle da espessura e uniformidade da camada polimérica, a facilidade e boa reprodutibilidade da técnica (MENEGUZZI et al., 1999; STILWELL; PARK, 1989). A avaliação da espessura dos MIPs pode ser avaliada pelo aumento da resistência a transferência de carga, utilizando por exemplo, a técnica de espectroscopia de impedância elétrica (EIS) (ZOUAOUI et al., 2022).

Além da alta seletividade com a molécula utilizada como *template* durante o processo de polimerização, os MIPs apresentam várias vantagens em relação ao seu uso, tais como a resistência em pressões e temperaturas elevadas, robustez física, são inertes em contato com ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos (MOSBACH; RAMSTRÖM,

1996; YE; MOSBACH, 2008). Somando-se a isso, temos o fato de poderem ser muito menos dispendiosos e possuírem um tempo de armazenamento muito maior que as moléculas biológicas, sendo capazes de manter a sua capacidade de reconhecimento por muito tempo em temperatura ambiente (ALBERTINI et al., 2012; HAAGE et al., 2021).

Devido à natureza insolúvel dos MIPs, estes são notoriamente difíceis de caracterizar. No entanto, algumas técnicas analíticas são capazes de avaliar as características químicas e morfológicas, tais como ressonância magnética nuclear (NMR) em fase sólida (ANNAMMA et al., 2011), espectroscopia de transformada de Fourier no infravermelho (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy - FTIR), que são capazes de fornecer informações sobre a composição química do polímero (DEL SOLE et al., 2007), como a incorporação de grupos funcionais na matriz polimérica.

As características morfológicas podem ser avaliadas por meio de técnicas de microscopia, como a microscopia de luz que já foi utilizada para verificar a integridade natural de beads poliméricas (CACHO et al., 2004), e a microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) para capturar imagens de macroporos (DEL SOLE et al., 2007). A caracterização de MIPs se mostra essencial para avaliação de reconhecimento molecular, bem como a seletividade e capacidade de ligação.

1.6.7.2 Aplicação dos MIPs em sensores eletroquímicos

Devido à alta capacidade de ligação seletiva com a molécula *template*, os MIPs são capazes de imitar interações biológicas, tais como antígeno-anticorpo, enzima e substrato e hormônios (BOSSI et al., 2007; MOSBACH; RAMSTRÖM, 1996).

Existem vários estudos que utilizam MIPs para detecção de moléculas por meio de leituras eletroquímicas, os quais obtiveram limites de detecção (*Limit of detection* – LOD) muito baixos, tal como o trabalho de Zhang et al. (2017) que desenvolveu MIPs para detecção de imidacloprida e obteve uma LOD de 0,10 μM . Outros estudos recentes empregaram MIPs para detecção de outros agrotóxicos (BOULANOUAR et al., 2018; HAYAT et al., 2022), hormônios (EL-AKAAD et al., 2020; GUĆ; SCHROEDER, 2020), marcadores de câncer (HAN et al., 2019; WANG et al., 2016), entre outros.

Uma vez que proteínas são moléculas maiores e mais complexas em comparação à outras moléculas químicas, a produção de MIPs que têm proteínas como molécula *template* é

mais difícil, o que também se deve a maior flexibilidade dessas moléculas (BOSSI et al., 2007; XU et al., 2017).

Cui et al. (2020) realizou um levantamento bibliográfico sobre a utilização de MIPs para detecção de doenças. Os autores reportam que apesar de haver um número considerável de estudos que almejaram a produção de MIPs para detecção de marcadores de doenças não infecciosas, ainda é uma tecnologia emergente do diagnóstico de doenças infecciosas. Neste segmento, os trabalhos existentes estão voltados principalmente para detecção de doenças causadas por bactérias e vírus. Durante o levantamento bibliográfico realizado para produção desta tese não foram encontrados trabalhos objetivando o uso de MIPs para detecção de antígenos marcadores de infecção para malária.