



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Diagnóstico e tratamento da infeção malária:
desenvolvimento de uma nova plataforma de diagnóstico e
de um novo composto antimalárico**

Mónica Eduarda Franco Ferreira

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS COM ESPECIALIZAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM
MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Fevereiro 2019



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Diagnóstico e tratamento da infeção malária:
desenvolvimento de uma nova plataforma de diagnóstico e
de um novo composto antimalárico**

Autora: Mónica Eduarda Franco Ferreira

Orientadora: Inv^a Doutora Ana Paula Arez

Coorientador: Professor Miguel Viveiros

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Apoio Financeiro de Programa GHTM-UID/Multi/04413/2013, da Fundação para a Ciência e
Tecnologia/Ministério da Educação e Ciência (FCT)



Para os meus pais.



Agradecimentos

Na realização da presente dissertação, contei com o apoio de múltiplas pessoas às quais estou profundamente grata. Correndo o risco de injustamente não mencionar alguém, quero deixar expresso os meus agradecimentos:

À minha orientadora, Doutora Ana Paula Arez, pela orientação prestada, pela sua paciência, disponibilidade e compreensão, pelo seu grande incentivo e apoio que demonstrou ao longo deste percurso.

Ao meu coorientador, Professor Miguel Viveiros, pelo seu apoio e por me ter cativado para as ciências biomédicas com a sua motivação.

A um diverso número de investigadores e colegas, pela sua disponibilidade e apoio, que se disponibilizaram a ajudar-me em várias fases desta dissertação: à Doutora Márcia Medeiros, pela sua disponibilidade e apoio na otimização de diversas técnicas, assim como pela simpatia, boa energia e incentivo; à Doutora Fátima Nogueira, pelo seu apoio e contribuição no presente trabalho, assim como energia contagiante; à Doutora Patrícia Salgueiro, ao Mestre Gonçalo Seixas e ao Prof. João Pinto pelo apoio e disponibilidade em relação ao QIAxcel, e pela preocupação e interesse em geral pelo meu trabalho; à Doutora Mónica Nunes pela sua disponibilidade, simpatia e apoio em relação à técnica LAMP; à Doutora Diana Machado pelo seu apoio e disponibilidade em relação ao dispositivo LFD; à Mestre Ana Catarina Alves, por todo o apoio, motivação, simpatia e amizade que me transmitiu ao longo deste percurso.

A todos os meus colegas do grupo da Malária, de entre eles o Rafael Oliveira, o Hélio Rocha, a Vera Camões, a Jessy Silva, a Lis Coelho e a Inês Morais, assim como colegas de mestrado, Patrícia Borges e Raquel Quitéria, que sempre me ajudaram direta ou indiretamente, que contribuíram de alguma forma para o presente estudo, pela sua amizade, apoio e motivação nos momentos mais difíceis, assim como na celebração das pequenas conquistas, o meu muito obrigado.

A toda a equipa do grupo de Malária da Università degli Studi di Torino, Doutora Evelin Schwarzer, Doutor Carlo Zuddas, Mestre Rosalba La Grotta, Doutora Elena Valente e Doutora Daniela Ulliers, pelo apoio na realização do estágio do programa ERASMUS+, pela enorme simpatia, companheirismo e paciência.



A todos os meus amigos, que sempre me motivaram e deram força nos momentos mais complicados. A todos aqueles que se disponibilizaram a ajudar, pela vossa motivação e compreensão, em especial à Margarida, Maria, Adriana, Tiago, Mariana, Ana Lúcia e Cristiana por todo o apoio. E a todos os outros que, apesar de não terem o seu nome referido aqui, saberão que este agradecimento é também dirigido a si, pela vossa verdadeira amizade, muito obrigado.

À minha incrível família, que de tudo fizeram, e fazem, para o meu sucesso. Aos meus pais, os meus modelos de vida e a minha inspiração, muito obrigado por todos os sacrifícios a que se propuseram para a minha educação, obrigada pelo seu apoio incondicional, por todo o carinho e amor, não só durante a dissertação, mas ao longo de toda a minha vida, pela sua incrível paciência nos meus momentos de crise e por me motivarem sempre a superar-me e a não desistir dos meus objetivos! Aos meus queridos avós, que são tão incrivelmente especiais para mim, que sempre me motivaram e apoiaram neste e em todos os percursos da minha vida, pelo seu carinho e por acreditarem sempre em mim, muitíssimo obrigada. Ao meu mano, Guilherme, por ser uma pessoa extraordinária, pela sua bondade e amizade, que, mesmo obrigando-me a trabalhar sempre ao som da guitarra, sou muito agradecida por tê-lo na minha vida.

Ao Ricardo, o meu namorado, por ter caminhado ao meu lado ao longo de todo este percurso, por nunca me deixar cair, por todas as horas de sono perdida para me fazer companhia. Pela enorme paciência e motivação que me transmitiu, por me apoiar e incentivar sempre a seguir os meus sonhos mesmo quando eu hesito, pelo enorme carinho e amor, por ser sempre o meu porto de abrigo. O meu profundo obrigado.

Por último, dedicar esta dissertação à memória do meu querido amigo, que deixou uma marca na minha vida, Gabriel Martins, que faleceu poucos dias antes da entrega da mesma. "Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós." - Antoine de Saint-Exupéry

O presente trabalho foi financiado por verbas do Programa GHTM-UID/Multi/04413/2013, da Fundação para a Ciência e Tecnologia/Ministério da Educação e Ciência (FCT), Portugal.



Resumo

A malária, causada em humanos por cinco *Plasmodium* spp., provocou cerca de 219 milhões de casos de infecções, mais de 435 mil mortes e a morte de uma criança (com menos de 5 anos) a cada dois minutos no ano de 2017 (WHO, 2018a). Atualmente está a ocorrer uma estagnação do progresso global no combate à malária que somente será contrariada com a inovação no seu controle, através de três aspetos-chave: diagnóstico rápido, tratamento precoce e a escolha adequada do tratamento antimalárico (WHO, 2018a). Tendo isso em conta, a presente dissertação tem como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico de malária, que disponibilizará um perfil muito completo de características que influenciam a escolha do tratamento, como características do parasita: espécie de *Plasmodium*, potencial para possíveis resistências a fármacos antimaláricos e evolução para doença grave, assim como características do hospedeiro, tal como deficiência em G6PD. Esta plataforma permitiria um tratamento precoce e específico para cada indivíduo infetado. Devido ao aumento crescente de resistências aos fármacos antimaláricos e à necessidade de novos tratamentos, esta dissertação tem também como objetivo o estudo do *Composto E*, que possui potencial efeito antimalárico, em *P. falciparum* (*in vitro*), através de possíveis alterações no desenvolvimento do parasita, nomeadamente no processo metabólico de degradação de hemoglobina. Deste modo, foram analisadas: densidade parasitária, número de células (RBCs) e quantidade de hemozoína. Para o desenvolvimento da plataforma de diagnóstico, realizou-se a otimização de várias técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (*nested* PCR, *multiplex* PCR e LAMP) para a identificação de espécies de *Plasmodium*, a seleção da técnica mais apropriada para diagnóstico de malária, o desenho e adaptação da técnica selecionada a LFD e, por fim, otimização da reação da técnica adaptada a LFD. A técnica selecionada para adaptação a LFD, foi o *multiplex* PCR, pela sua elevada sensibilidade para deteção de *P. falciparum* e pela a sua capacidade de amplificar múltiplas sequências alvo numa única reação. Dada a difícil otimização de um dos *primers* marcados (GEN-FITC), não foi possível alcançar o objetivo final no tempo desejado, no entanto o trabalho de otimização continuará em curso. Relativamente ao estudo do efeito do *Composto E*, concluiu-se que efetivamente este composto tem efeito antimalárico, com alguma capacidade de retardar o desenvolvimento do parasita e de impedir o processo de biocristalização, levando à morte do parasita. Por fim, foi idealizado um conjunto de perspetivas futuras relativas, essencialmente, à plataforma de diagnóstico, com uma seleção geral de alvos moleculares relacionados com o tratamento, que permitirão compor o tal perfil de características importantes ao tratamento, assim como a oportunidade de monitorização de marcadores de perfis de resistência a fármacos antimaláricos, contribuindo para o controle global da malária.

Palavras-chave: Malária, plataforma de diagnóstico, *multiplex* PCR, LFD, composto antimalárico.



Abstract

Malaria, caused in humans by five *Plasmodium* spp., has led to around 219 million cases, more than 435,000 deaths and the death of a child (under five years old) every two minutes in 2017 (WHO, 2018a). Nowadays, there is a stagnation of global progress in the fight against malaria that will only be countered by innovation in malaria control, through three key aspects: rapid diagnosis, early treatment and the appropriate selection of antimalarial treatment (WHO, 2018a). The aim of this dissertation is the development of a malaria diagnostic platform, which would provide a very complete profile of characteristics that influence the choice of treatment, such as characteristics of the parasite: *Plasmodium* specie, potential for possible resistance to antimalarial drugs and evolution to severe disease, as well as host characteristics, such as G6PD deficiency. This platform would allow an early and specific treatment for each infected individual. Due to increasing resistance to antimalarial drugs and the need for new treatments, this dissertation also aims to study the *Compound E*, which has a potential antimalarial effect, on *P. falciparum* (*in vitro*), through possible changes in the development of the parasite, namely in the metabolic process of haemoglobin degradation. Thus, it was analyzed: parasitemic density, number of cells (RBCs) and amount of hemozoin. For the development of the diagnostic platform, the optimization of several nucleic acid amplification techniques (nested PCR, multiplex PCR and LAMP) for the identification of *Plasmodium* spp., the selection of the most appropriate technique to diagnose malaria, design and adaptation of the selected technique to LFD and, finally, optimization of the reaction of the technique adapted to LFD, was conducted. The technique selected for adaptation to LFD was the multiplex PCR, due to its high sensitivity for detection of *P. falciparum* and its ability to amplify multiple target sequences in a single reaction. Given the difficult optimization of one of the marked primers (GEN-FITC), it was not possible to reach the final goal in the desired time, however the optimization work will continue. Concerning the study of the effect of *Compound E*, it was concluded that effectively this compound has antimalarial effect, with some capacity to delay the development of the parasite and to prevent the process of biocrystallization, leading to the death of the parasite. Finally, a set of future perspectives was designed, essentially, on the diagnostic platform, with a general selection of molecular targets related to the treatment, which will allow the establishment the profile of important characteristics to the treatment, as well as the opportunity to monitor markers of antimalarial drug resistance profiles, contributing to overall malaria control.

Keywords: Malaria, diagnostic platform, *multiplex* PCR, LFD, antimalarial compound.



Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
SIGLAS E ACRÓNIMOS	IX
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 Malária	2
I.1.1 Definição.....	2
I.1.2 Contextualização	2
I.1.3 Vetor da malária.....	3
I.1.4 Ciclo biológico do parasita	3
I.1.5 Epidemiologia.....	8
I.1.6 Condição clínica e patogénese	12
I.1.7 Controlo e Prevenção.....	15
I.1.8 Diagnóstico.....	16
I.1.9 Tratamento.....	21
I.2 Justificação e objetivos	26
II. MATERIAIS E MÉTODOS	30
II.1 Amostras biológicas	31
II.1.1 Origem das amostras biológicas	31
II.1.2 Técnicas de extração de DNA.....	32
II.1.3 Quantificação do DNA extraído.....	33
II.2 Técnicas de deteção de produtos amplificados.....	34
II.2.1 Eletroforese em gel de agarose.....	34
II.2.2 Eletroforese por capilaridade.....	34
II.2.3 LFD.....	35
II.3 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos.....	35
II.3.1 <i>Nested</i> PCR	35
II.3.2 <i>Multiplex</i> PCR	37
II.3.3 LAMP	38
II.3.4 <i>Multiplex</i> PCR adaptado a LFD	40
II.4 Estudo do <i>Composto E</i>	42
II.4.1 Culturas	42
II.4.2 Experiência com <i>Composto E</i>	47
III. RESULTADOS	51
III.1 Técnica de extração de DNA	52
III.2 Técnica de deteção de produtos amplificados	52



III.3 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos	53
III.3.1 <i>Nested</i> PCR	53
III.3.2 <i>Multiplex</i> PCR	54
III.3.3 LAMP	55
III.4 <i>Multiplex</i> PCR adaptado a LFD	57
III.5 Composto E	61
IV. DISCUSSÃO	66
V. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79



Índice de Figuras

I. Introdução

Figura I.1 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	4
Figura I.2 Ciclo intra-eritrocitário de <i>P. falciparum</i>	7
Figura I.3 Origem da infeção de casos de malária importada em França.....	10
Figura I.4 Casos de malária importada na Europa e mortes associadas, entre 2010 e 2017...	10
Figura I.5 Países e territórios com casos autóctones de malária em 2000 e o seu estado em 2017.....	11
Figura I.6 Estimativa dos casos de malária por região da OMS relativo ao ano de 2017.....	12
Figura I.7 Processo de amplificação de DNA pela técnica LAMP.....	20
Figura I.8 Número de ACTs com altas taxas de insucesso no tratamento de infeções por <i>P. falciparum</i>	23
Figura I.9 Degradação da hemoglobina por <i>Plasmodium</i> e efeito do <i>Composto E</i>	25
Figura I.10 Esquema representativo dos objetivos da dissertação.....	29

II. Materiais e Métodos

Figura II.1 Localização de cada um dos <i>primers</i> utilizados na técnica de <i>nested</i> PCR, inseridos em sequências das espécies respetivas.....	36
Figura II.2 Localização de cada um dos <i>primers</i> , utilizados na técnica de <i>multiplex</i> PCR, inseridos em sequências das espécies respetivas.....	38
Figura II.3 Localização de cada um dos <i>primers</i> utilizados na técnica de LAMP inseridos numa sequência do genoma de <i>P. falciparum</i>	39
Figura II.4 Desenho dos <i>primers</i> com marcação e a deteção de produtos amplificados por LFD.....	41
Figura II.5 Imagem exemplificativa de como fazer um esfregaço.....	43
Figura II.6 Processo de sincronização de culturas.....	45

III. Resultados

Figura III.1 Comparação de técnicas de deteção de produtos amplificados.....	53
Figura III.2 Sensibilidade da técnica <i>nested</i> PCR.....	54
Figura III.3 Sensibilidade da técnica <i>multiplex</i> PCR.....	55
Figura III.4 Sensibilidade e especificidade da técnica LAMP.....	56
Figura III.5 Produto final da reação por <i>multiplex</i> PCR – LFD.....	58
Figura III.6 Teste dos <i>primers</i> de <i>multiplex</i> PCR – LFD.....	59
Figura III.7 Otimização da reação <i>multiplex</i> PCR – LFD.....	60
Figura III.8 Densidade parasitária antes e após a aplicação do <i>Composto E</i>	61
Figura III.9 Imagem obtida através de microscópio ótico.....	62
Figura III.10 Contagem do número de células (RBCs) por unidade de volume.....	63
Figura III.11 Quantificação da hemozoína após a aplicação do <i>Composto E</i>	65



Índice de Tabelas

II. Materiais e Métodos

Tabela II.1 Parasitemia das amostras biológicas.....	31
Tabela II.2 Quantificação do DNA das diferentes amostras dos indivíduos infectados e respectivas diluições.....	34
Tabela II.3 <i>Primers</i> utilizados na técnica de <i>nested</i> PCR.....	36
Tabela II.4 Condições de amplificação utilizadas na técnica de <i>nested</i> PCR.....	37
Tabela II.5 <i>Primers</i> utilizados na técnica de <i>multiplex</i> PCR.....	37
Tabela II.6 Condições de amplificação utilizadas na técnica de <i>multiplex</i> PCR.....	38
Tabela II.7 <i>Primers</i> utilizados na técnica de LAMP.....	39
Tabela II.8 Combinações de pares de <i>primers</i> , com cruzamento entre <i>primers</i> de <i>multiplex</i> PCR – LFD (marcados) e <i>multiplex</i> PCR (não marcados).....	42
Tabela II.9 Preparação de percoll em diferentes concentrações.....	46
Tabela II.10 Cálculo da densidade parasitária final da amostra sincronizada.....	46
Tabela II.11 Quantificação do volume das amostras sincronizadas.....	48
Tabela II.12 Fatores de diluição aplicados às amostras sincronizadas.....	49

III. Resultados

Tabela III.1 Sumário dos resultados de sensibilidade das técnicas <i>nested</i> PCR, <i>multiplex</i> PCR e LAMP.....	57
--	----



Siglas e acrónimos

ACT	Terapia combinada com base em artemisina (<i>Artemisinin-based combination therapy</i>)
CO₂	Dióxido de Carbono
CS	Proteína circunsporozoítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HCl	Ácido clorídrico
H₂O	Água
LFD	Tiras de fluxo lateral (<i>Lateral Flow Dipstick</i>)
MDR	Resistência a múltiplos fármacos (<i>Multidrug Resistance</i>)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MO	Microscopia Ótica
N₂	Diazoto
NaCl	Cloreto de sódio
NALF	Tecnologia de fluxo lateral de ácidos nucleicos (<i>Nucleic acid lateral flow</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>), constituído por cloreto de sódio e fosfato de sódio.
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PfHRP2	Proteína 2 rica em histidina de <i>Plasmodium falciparum</i> (<i>P. falciparum histidine-rich protein-2</i>)
pLDH	Desidrogenase lactática de <i>Plasmodium</i> (<i>Plasmodium lactate dehydrogenase</i>)



POC	Prestação de cuidados no local (<i>Point-of-care</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona
RBCs	Eritrócitos (<i>Red blood cells</i>)
RDTs	Testes de diagnóstico rápido (<i>Rapid diagnosis tests</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SAG	Mistura de NaCl (cloreto de sódio), D-Glicose, hidrato de cloridrato de adenina e H ₂ O
SAG-M	Mistura de NaCl (cloreto de sódio), D-Glicose, hidrato de cloridrato de adenina, D-Manitol e H ₂ O
ssrRNA	Subunidade pequena do RNA ribossomal (<i>Small subunit ribosomal RNA</i>)
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único
TBH	Solução de hidroperóxido de terc-butilo (<i>Tert-Butyl hydroperoxide</i>)
TE	Tampão composto por Tris-HCl (tris-ácido clorídrico) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina (<i>Thrombospondin-related adhesive protein</i>)



I. Introdução



I.1 Malária

I.1.1 Definição

A malária, também conhecida como paludismo, impaludismo, febre intermitente e maleita, é transmitida através da picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles* e provocada por protozoários parasitas do género *Plasmodium*. Existem cinco espécies que podem provocar malária em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo este último uma zoonose, tendo como hospedeiro principal os primatas (White *et al.*, 2014; Gajbhiye *et al.*, 2017; CDC, 2018a).

I.1.2 Contextualização

Os sintomas da malária foram inicialmente descritos na China antiga assim como na Grécia antiga por Hipócrates. No entanto, o termo malária teve origem no século XIX em Itália, onde se pensava que a doença era transmitida pelo ar, chamando-lhe de “*mal aria*”, que significa “mau ar” (Neves *et al.*, 2005).

Em 1955, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) implementou o primeiro programa de erradicação da malária, definida como a redução permanente a valor zero da incidência mundial da infecção por malária causada por todas as espécies de parasitas de malária humana (WHO, 2017), o número de casos estimados a nível mundial encontrava-se entre 200 e 225 milhões. Este programa tinha como principais ações a pulverização das paredes das casas com inseticida de ação residual e tratamento em massa com fármacos antimaláricos de baixa toxicidade – cloroquina. Após o término deste programa, em 1969, os valores relativos à malária haviam baixado para 90 milhões de casos e foram evitados cerca de 500 milhões de infeções, o que permitiu o desenvolvimento económico em muitas das áreas endémicas por todo o mundo (WHO, 1983), levando inclusive à eliminação da malária, que se trata da interrupção da transmissão local (redução a zero da incidência de casos nativos) de uma determinada espécie de parasita da malária numa área geográfica definida (WHO, 2017), na Europa, América do Norte, Caraíbas e algumas zonas da Ásia e América Centro/Sul (Tanner & Savigny, 2008).



Este e outros programas funcionaram, e funcionam, com o objetivo de reduzir a mortalidade, morbidade e o número de pessoas infetadas a nível mundial. No entanto, a emergência de resistência aos fármacos antimaláricos por parte dos parasitas assim como as limitações em termos de aplicação de inseticidas e tratamentos em massa de acordo com as diferentes situações político-económicas em diferentes regiões endémicas, são situações que dificultam o alcance desse objetivo (Neves *et al.*, 2005).

I.1.3 Vetor da malária

O vetor da malária em humanos é o mosquito fêmea do género *Anopheles*, existindo algumas espécies vetoriais dominantes, que correspondem a espécies (ou complexos de espécies) que transmitem a maioria da malária em humanos numa determinada área (Takken & Lindsay, 2003), correspondendo a menos de 8% das cerca de 400 espécies de *Anopheles* (Hay *et al.*, 2010; Sinka *et al.*, 2012).

A alimentação do mosquito fêmea acontece normalmente entre o anoitecer e o amanhecer. No entanto, a intensidade de transmissão da malária depende de um conjunto de fatores relativos ao parasita, ao mosquito, ao hospedeiro humano e ao ambiente. O mosquito fêmea *Anopheles* necessita de se alimentar de sangue para realizar a postura dos seus ovos. Esta é realizada em *habitat* aquático, permanecendo na água durante a eclosão em larvas, desenvolvimento em pupas e posterior emergência em formas adultas. O pico dos níveis de transmissão corresponde normalmente à época das chuvas nos países tropicais, quando são gerados a maioria dos *habitats* aquáticos necessários ao ciclo de vida do mosquito *Anopheles*. Determinadas áreas, como muitas regiões em África, onde o período de vida do mosquito é maior e as espécies vetoras são essencialmente antropofágicas (que se alimenta de sangue humano), têm um maior nível de transmissão. Este é um dos principais motivos porque 90% dos casos de malária ocorrem em África (WHO, 2018c).

I.1.4 Ciclo biológico do parasita

Todas as espécies de *Plasmodium* apresentam um ciclo bifásico: a fase sexuada ou esporogónica e a fase assexuada ou esquizogónica. A fase sexuada ocorre no hospedeiro invertebrado (especificamente no intestino do mosquito) e a fase assexuada no hospedeiro



vertebrado (neste caso, os humanos), primeiramente no fígado (fase exoeritrocitária) e depois nos eritrócitos (fase eritrocitária) (Figura I.1).

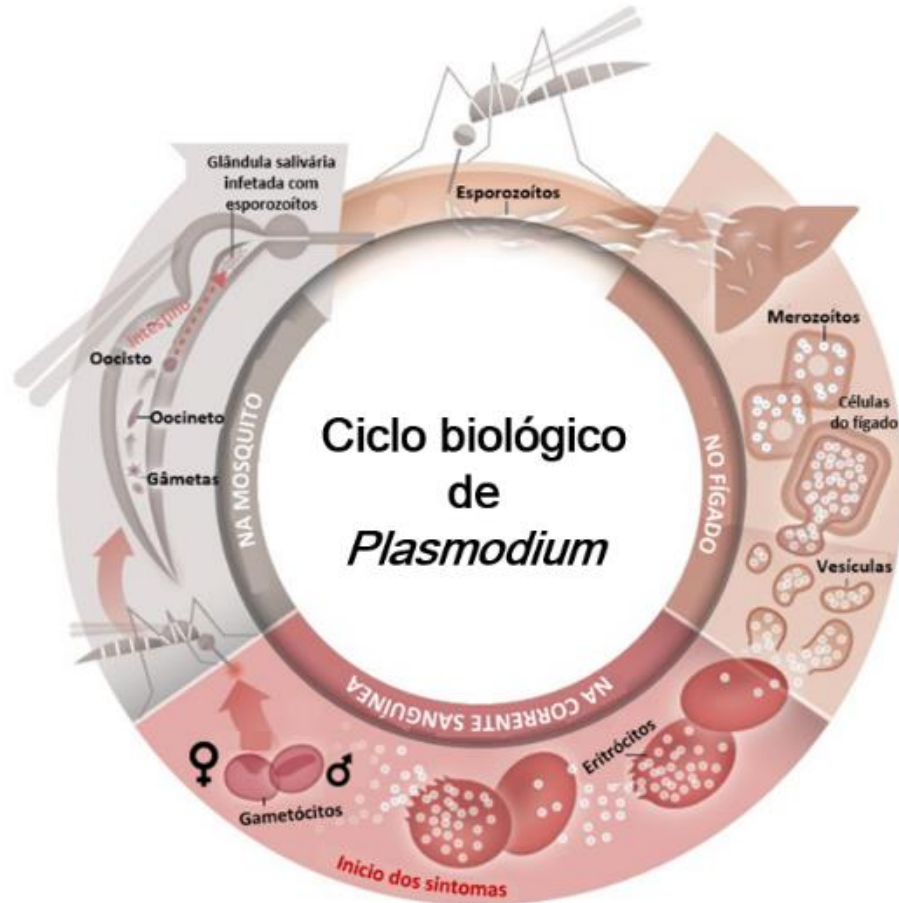


Figura I.1 Ciclo biológico de *Plasmodium*, a fase assexuada no hospedeiro humano (no fígado e na corrente sanguínea) e a fase sexuada no hospedeiro invertebrado (no intestino médio e nas glândulas salivares do mosquito) (Adaptado de MVI, 2018a).

I.1.4.1 Hospedeiro Invertebrado – Fase sexuada

Quando uma fêmea *Anopheles* se alimenta, esta ingere diversas formas sanguíneas de *Plasmodium*, tais como merozoítos e trofozoítos (formas assexuadas) mas somente os gametócitos (formas sexuadas) conseguem desenvolver-se no interior do mosquito. Quando ingerido, o parasita passa pelo trato digestivo, onde encontra as condições perfeitas para a gametogénese (<30°C e pH alto devido à baixa concentração de CO₂). Nesse ambiente, os gametócitos femininos dão origem a um macrogâmeta e os gametócitos masculinos originam 8 microgâmetas que ao fecundarem, por exflagelação,



geram um ovo ou zigoto (forma diploide) (Despommier *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2005). Após a fecundação, o zigoto sofre meiose e diferenciação, evoluindo para um oocineto diploide móvel, que penetra na camada epitelial do intestino repousando entre as células epiteliais. Após 24 horas, o oocineto torna-se oocisto, que ao maturar, origina por mitoses sucessivas, a diferenciação de mais de 1000 esporozoítos haploides (Despommier *et al.*, 2005).

A maturação dos esporozoítos demora entre 10 a 14 dias (Despommier *et al.*, 2005), levando à rutura do oocisto e à posterior invasão das glândulas salivares do mosquito pelos esporozoítos. Desta forma, o mosquito parasitado ao realizar uma nova refeição vai injetar esporozoítos na corrente sanguínea de um novo indivíduo, transmitindo assim a infecção (Neves *et al.*, 2005).

I.1.4.2 Hospedeiro vertebrado – Fase assexuada

I.1.4.2.1 Fase exoeritrocitária

Os esporozoítos infetantes são inoculados no hospedeiro humano, normalmente entre 15 a 200 por refeição de sangue (Neves *et al.*, 2005), atingindo os vasos sanguíneos em poucos minutos, não infetando imediatamente os eritrócitos. Para a infecção ter início, os esporozoítos devem atingir a fase de replicação intracelular nos hepatócitos do fígado produzindo merozoítos, que libertados depois para a corrente sanguínea, são responsáveis pela invasão dos eritrócitos (Tarum *et al.*, 2006; Kasetsirikul *et al.*, 2016).

A infecção no fígado começa com a invasão dos sinusóides hepáticos, onde os esporozoítos atravessam a parede sinusoidal e migram através de vários hepatócitos, penetrando as membranas plasmáticas, antes de infetar um hepatócito final e formar um vacúolo parasitóforo (Prudêncio *et al.*, 2006; Mota & Rodriguez, 2008). Estes acontecimentos podem ocorrer mesmo com um número reduzido de esporozoítos (Weiss, 1990). Nesse vacúolo, os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos hepáticos, ou trofozoítos pré-eritrocitários, que se dividem por reprodução assexuada/esquizogonia, originando os esquizontes hepáticos. Estes, por sua vez, originam milhares de merozoítos. Os esquizontes, quando maduros, libertam estes merozoítos na corrente sanguínea, que ficam livres para invadir os eritrócitos. (Knell, 1991; Neves *et al.*, 2005 ; Tarum *et al.*, 2006; Kasetsirikul *et al.*, 2016).



O tempo de maturação nos hepatócitos e a quantidade de merozoítos produzidos variam entre as diferentes espécies de *Plasmodium*: 5-7 dias para *P. falciparum*, produzindo cerca de 40 000 merozoítos por esporozoítos; 12-16 dias para *P. malariae*, produzindo cerca de 2 000 merozoítos; 6-8 dias para *P. vivax*, produzindo cerca de 10 000 merozoítos; 9 dias para *P. ovale*, produzindo cerca de 15 000 merozoítos (Despommier *et al.*, 2005) e cerca de 5 dias para *P. knowlesi*, produzindo cerca de 60 000 merozoítos (Millet *et al.*, 1990).

Até este momento, a infecção encontra-se num período chamado de incubação, onde não apresenta sintomas, continuando dessa forma, inclusive, nos primeiros ciclos da próxima fase, esquizogonia eritrocitária (Knell, 1991).

Plasmodium vivax e *P. ovale* podem possuir esporozoítos geneticamente diferentes que, em vez de iniciarem de imediato a fase exoeritrocitária, ficam latentes no hepatócito, criando cistos – hipnozoítos. Estes, são capazes de permanecer nesse estado por vários meses ou até mesmo anos, podendo mais tarde desenvolver-se e causar relapsos tardios (Knell, 1991; Neves *et al.*, 2005). *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, não formam hipnozoítos, e, assim sendo, não causam relapsos tardios. No entanto, através da continuação do ciclo eritrocitário com parasitémias muito baixas e quando não tratados, alguns poderão recrudescer: por 1-2 anos no caso de *P. falciparum* e por aproximadamente 30 anos no caso de *P. malariae*. Neste processo a infecção pode ser subpatente e assintomática por algum tempo (Despommier *et al.*, 2005; Singh & Daneshvar, 2013).

I.1.4.2.2 Fase intraeritrocitária

Quando os merozoítos são libertados dos esquizontes hepáticos e infiltram-se na corrente sanguínea, invadem rapidamente os eritrócitos, através do reconhecimento de recetores específicos existentes nas membranas destas células, iniciando assim a fase eritrocitária, onde os merozoítos se transformam em anéis, depois em trofozoítos e posteriormente em esquizontes (Figura I.2) (Knell, 1991; Shahinas *et al.*, 2013).

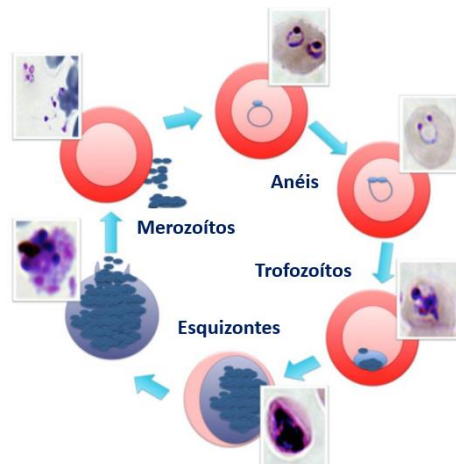


Figura I.2 Ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*, representado através de imagem esquemática e imagens obtidas por microscopia ótica de cada uma das fases de desenvolvimento (Shahinas *et al.*, 2013).

A fonte nutritiva do parasita neste ciclo é a hemoglobina, que é ingerida e digerida através de uma estrutura especializada chamada citóstoma, levando a uma acumulação de pigmento malárico ou hemozoína (Goldberg *et al.*, 1990; Parra *et al.*, 2011).

As características das diferentes espécies de *Plasmodium* têm relação direta com o nível de parasitemia e, conseqüentemente, com o tipo de gravidade da infecção. Tendo em conta a idade dos eritrócitos, enquanto que *P. falciparum* invade eritrócitos de qualquer idade, *P. malariae* e *P. knowlesi* invadem preferencialmente eritrócitos maduros e *P. vivax* e *P. ovale* invadem apenas reticulócitos (eritrócitos jovens). Estas restrições de idade explicam o porquê de *P. falciparum* parasitar, pelo menos, quatro vezes mais eritrócitos que todas as outras espécies de *Plasmodium* (McQueen & McKenzie, 2004; Neves *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2013).

A divisão por esquizogonia, onde anéis/jovens trofozoítos maturam e produzem um esquizonte em forma de roseta, demora aproximadamente 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (malária terçã), 72 horas para *P. malariae* (malária quartã) e 24 horas para *P. knowlesi* (malária diária) (Knell, 1991; Neves *et al.*, 2005; Singh & Daneshvar, 2013; Shahinas *et al.*, 2013). Após esse período, o esquizonte rebenta, causando a ruptura do eritrócito e a liberação de 8-16 novos merozoítos para a corrente sanguínea, que irão invadir novos eritrócitos e começar um novo ciclo de esquizogonia. Estes ciclos causam as febres periódicas típicas da malária que são induzidas pela liberação de pirogênios



para o sangue quando os esquizontes rebentam, sendo um sintoma diferencial entre espécies devido aos ciclos de tempos diferentes (Knell, 1991; Knell, 1991; Singh & Daneshvar, 2013).

Após vários ciclos, alguns trofozoítos desenvolvem-se em diversas formas, produzindo formas sexuais, os gametócitos, que atingem a maturação em cerca de 4 horas, tornando-se formas dormentes circulando no sangue por longos períodos de tempo. Quando um mosquito *Anopheles* fêmea se alimenta no hospedeiro humano, este ingere diversas formas do parasita, incluindo gametócitos intracelulares. Ao chegar ao trato intestinal do mosquito, a membrana do eritrócito desintegra-se, libertando os gametócitos, permitindo o início de uma nova fase sexuada (Knell, 1991; Despommier *et al.*, 2005).

I.1.5 Epidemiologia

A epidemiologia da malária é caracterizada por vários fatores que influenciam a dinâmica da transmissão da doença, tais como, fatores biológicos, ecológicos, socioculturais e político-econômicos. A dinâmica da transmissão da doença pode ser influenciada por diferentes fatores da suscetibilidade do hospedeiro humano à infecção ou da espécie específica de *Plasmodium* que causa a infecção. *Plasmodium falciparum* é a forma mais patogénica de todas as espécies de *Plasmodium* assim como a mais prevalente, responsável pelos valores mais elevados de morbidade e mortalidade. A segunda espécie mais comum é *P. vivax*. As infecções por *Plasmodium* menos frequentes são causadas por *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. (Despommier *et al.*, 2005, CDC, 2018a).

I.1.5.1 Situação atual da malária

De acordo com a OMS (WHO, 2018a), em 2017, ocorreram cerca de 219 milhões de casos de infecções por malária no mundo. Atualmente, estima-se que existam mais de 435 mil mortes, maioritariamente em África, provocadas por malária e calcula-se que ocorra a morte de uma criança com menos de 5 anos a cada dois minutos.

Não obstante, a melhoria no número de casos atuais em comparação com 2010 (239 milhões) e do aumento do número de países próximos da eliminação da malária, os casos a nível mundial têm vindo a aumentar de forma preocupante, tendo aumentado em cerca de 5 milhões de casos entre 2015 e 2017 (WHO, 2018a).



Este declínio de valores está relacionado com o impacto do progresso reduzido, ou mesmo negativo, dos países com maior carga de malária. Exemplo disso são os 10 países de maior incidência em África, onde foi estimado o aumento de 3,5 milhões de casos de malária de 2016 para 2017 (WHO, 2018a). A OMS afirma que os níveis de acesso a ferramentas e a adoção de métodos de intervenção no combate à malária não têm sido suficientes, aliado ao agravamento por diferentes fatores, entre eles: o aumento da temperatura e mudanças na época das chuvas devido às alterações climáticas (Siraj *et al.*, 2015); indivíduos não-imunes que emigram para zonas endémicas de malária, como refugiados (WHO, 2018c); ou, como na Índia, devido ao aumento da população nas zonas urbanas em condições sanitárias muito precárias (Santos-Vega *et al.*, 2016).

Existem atualmente novos desafios no combate à malária, sendo um deles a sua importação. Apesar da crise económica global, o comércio internacional e o turismo têm crescido nos últimos anos bem como as migrações das populações, que incluem trabalhadores migrantes, refugiados, requerentes de asilo e deslocados internos, e que somam 244 milhões de migrantes internacionais, que corresponde a 3,3% da população mundial, dos quais, 22 milhões são refugiados (WHO, 2018b). Os migrantes que se estabelecem, por exemplo, num país europeu e que regularmente viajam de volta ao seu país de origem, endémico para malária, para visitar amigos e família, representam um elevado risco de importação de malária (Figura I.3) (Piperaki & Daikos, 2016). Vários estudos reportam que grande parte dos casos de malária importada provêm destas populações de migrantes, agora com maior influência das populações refugiadas, e o número de casos prevê-se que continue a aumentar (Figura I.4) (Takken & Lindsay, 2003; Norman *et al.*, 2015; Piperaki & Daikos, 2016; Castelli & Sulis, 2017; de Gier *et al.*, 2017; Eperon *et al.*, 2017). O número de chegadas de turistas internacionais tem também aumentado a grande escala, sendo que segundo a Organização Mundial de Turismo, somente nos últimos anos, de 2005 para 2015, o número de turistas internacionais aumentou de 730 milhões para 1187 milhões (WTO, 2018) e é esperada a continuação deste aumento. Esta mobilidade global está a contribuir para a mudança da epidemiologia da malária e, com isso, uma maior dificuldade no combate à doença (Norman *et al.*, 2015).

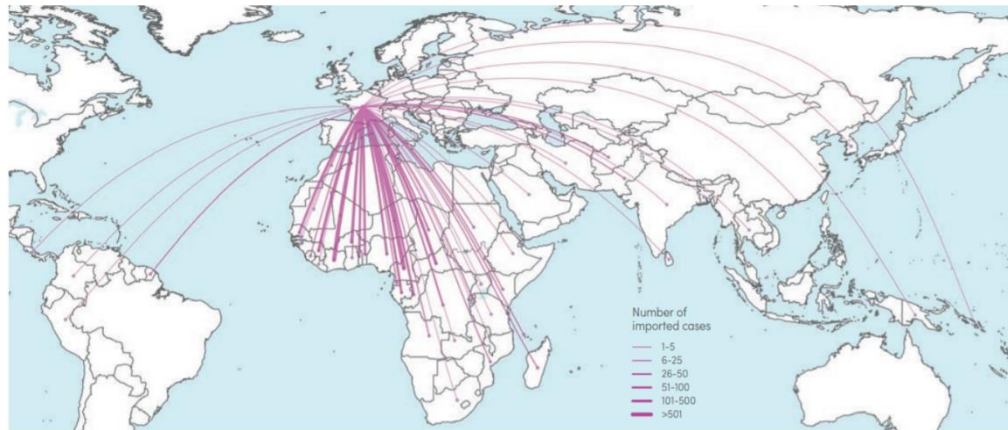


Figura I.3 Origem da infeção de casos de malária importada em França, um dos três países europeus com maior número de casos, relativos a 2017 (WHO, 2018a).

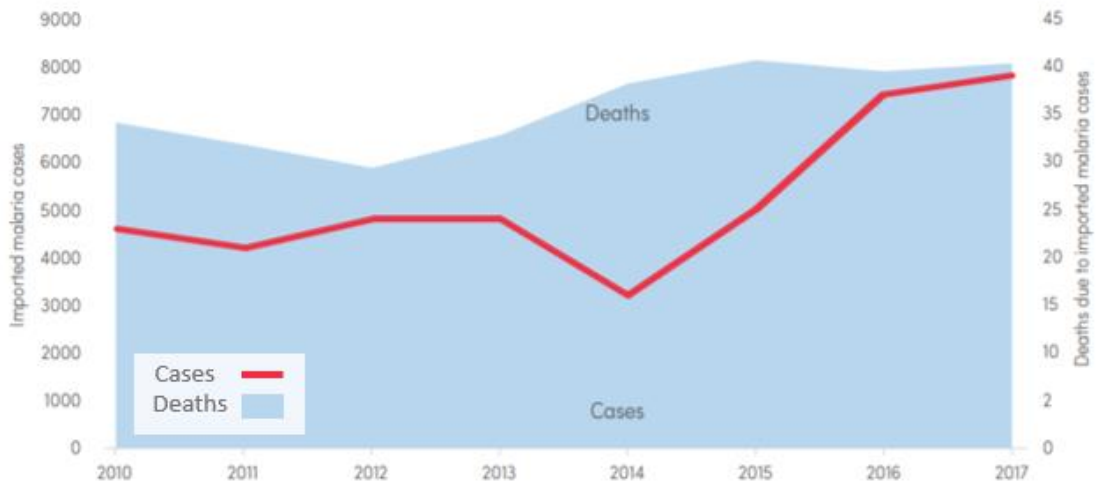


Figura I.4 Casos de malária importada na Europa e mortes associadas, entre 2010 e 2017 (WHO, 2018a).

I.1.5.2 Distribuição geográfica

A malária ocorre nas zonas tropicais e subtropicais; no entanto, a taxa de incidência da doença não está uniformemente distribuída. Nas áreas endémicas, a incidência de casos é aproximadamente constante ao longo dos anos, enquanto que nas áreas epidémicas há picos em que a incidência de novos casos aumenta periodicamente (Neves *et al.*, 2005).

A OMS reportou que em 2017, de 87 países com casos autóctones de malária (Figura I.5), 15 são africanos, que, juntamente com a Índia, correspondem a 80% dos casos a nível



mundial (WHO, 2018a). Em 2017, 92% dos casos de malária ocorreram na região Africana, 5% na região sudeste Asiática e 2% na região do Mediterrâneo Oriental (WHO, 2018a).

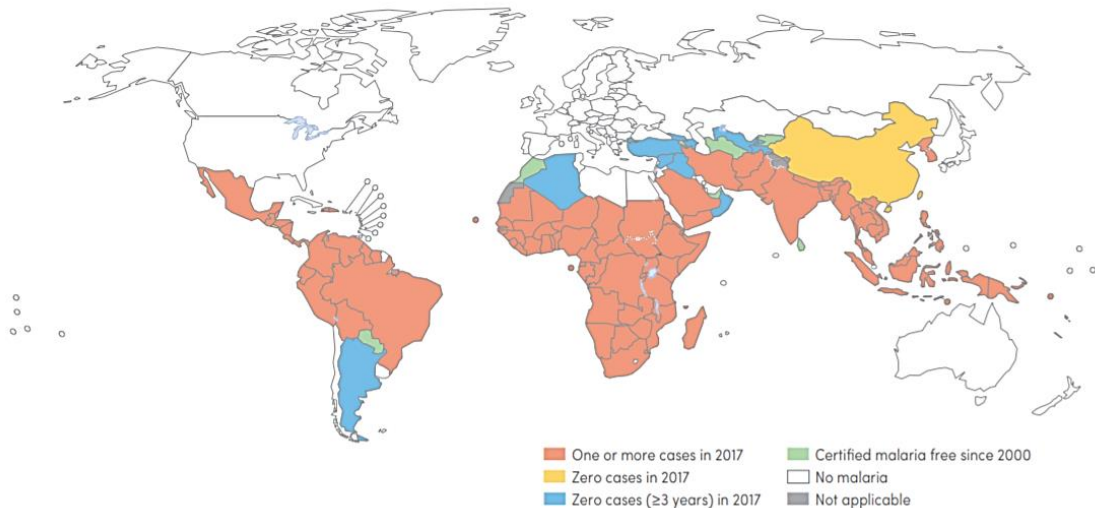


Figura I.5 Países e territórios com casos autóctones de malária em 2000 e o seu estado em 2017 (WHO, 2018a).

Plasmodium falciparum é o parasita predominante na região Africana, sendo a causa de 99,7% das infeções maláricas em 2017 (Figura I.6). Seguem-se a região do Pacífico Ocidental com 71,9%, o Mediterrâneo Oriental com 69% e Sudeste Asiático com 62,8% dos casos por *P. falciparum*. Apesar de *P. vivax* ser o parasita predominante na região das Américas representando 74,1% de casos de malária em 2017, cerca de 82% do número de casos estimados, a nível mundial provocados por esta espécie ocorreram num conjunto de cinco países não-americanos (Índia, Paquistão, Etiópia, Afeganistão e Indonésia) (WHO, 2018a). A distribuição de *P. ovale* está limitada à África tropical e algumas áreas específicas do oeste do Pacífico; *P. malariae* tem uma distribuição desigual e fragmentada, mas global, e *P. knowlesi* encontra-se por todo o sudeste Asiático, particularmente na Malásia (significativa malária zoonótica) (Despommier *et al.*, 2005; Guinovart *et al.*, 2006; Bronner *et al.*, 2009; CDC, 2018a).

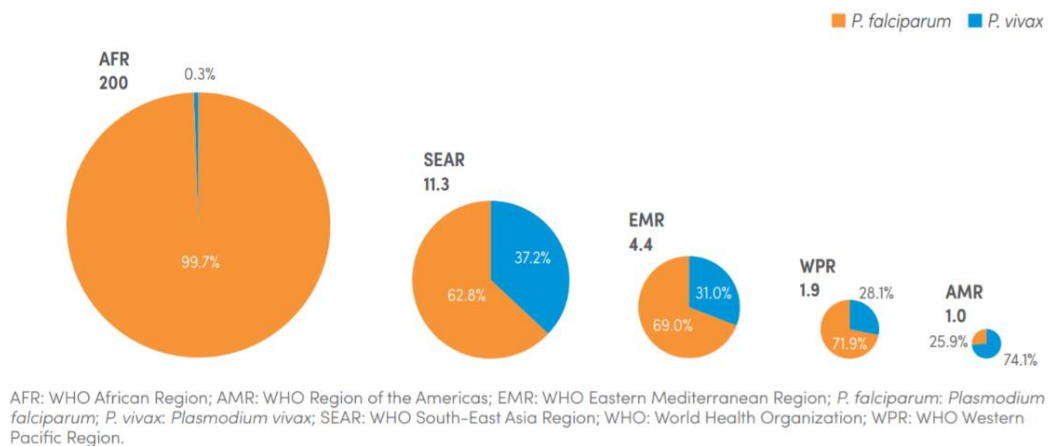


Figura I.6 Estimativa dos casos de malária (milhões) por região da OMS relativo ao ano de 2017 (WHO, 2018a).

I.1.6 Condição clínica e patogênese

As manifestações clínicas e patológicas começam na fase assexuada do ciclo eritrocitário, pois a passagem pelo fígado (fase exoeritrocitária) não causa sintomas.

I.1.6.1 Infecção assintomática

De acordo com a OMS, é considerada uma infecção sem sintomas de malária quando da presença do parasita *Plasmodium* em qualquer densidade confirmado em laboratório, por microscopia ótica (MO), ou por outro método de identificação molecular, e sem qualquer sintoma indicativo nem nenhum tratamento antimalárico recente (Lindblade *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016). Esta condição é comum em várias áreas com diferentes níveis de endemicidade, no entanto, ainda não existe um limite de parasitemia universalmente padronizado para classificar uma infecção como assintomática. A falta de manifestações clínicas impede muitas vezes a detecção da infecção, que pode durar seis meses ou mais. Um dos fatores que influenciam a falta de sintomas é o aumento da imunidade, que ocorre normalmente em indivíduos que sofreram repetidas infecções por *Plasmodium* ao longo do tempo, uma vez que leva a um melhor controle da multiplicação do parasita e diminuição da densidade parasitária no sangue (Laishram *et al.*, 2012; Lindblade *et al.*, 2013). Maioritariamente, essas infecções constituem um reservatório de transmissão (Starzengruber *et al.*, 2014).



I.1.6.2 Malária não-complicada

Os primeiros sintomas começam a surgir após o tempo de incubação, que varia consoante a espécie de *Plasmodium*: 9-14 dias para *P. falciparum*, 12-17 para *P. vivax*, 18-40 para *P. malariae*, 16-18 para *P. ovale* e 10-12 dias para *P. knowlesi*. No entanto, em infeções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, a infeção pode manter-se assintomática durante alguns meses, ou até mesmo anos, devido à sua capacidade de formar hipnozoítos, causando mais tarde relapsos da infeção, com sintomas (Knell, 1991; Neves *et al.*, 2005; Bronner *et al.*, 2009).

Os sintomas clínicos da malária, que, no início, se podem assemelhar aos da gripe, são comuns entre as diferentes espécies de malária. Têm algumas variações segundo a faixa etária: em adultos, os sintomas mais comuns são os calafrios periódicos e febre, normalmente acompanhada de cefaleia frontal e mialgia, enquanto que em crianças é comum existirem sintomas mais inespecíficos, que incluem febre, tosse, vómitos e diarreia (Hanscheid, 1999; Despommier *et al.*, 2005). A infeção por malária é considerada a principal causa de febre em crianças menores de 5 anos em África (Neves *et al.*, 2005).

Dado que os sintomas são inespecíficos, mimetizam uma gripe, e são comuns com muitas outras infeções, o diagnóstico clínico pode ser um pouco problemático (Bartoloni & Zammarchi, 2012). No entanto, os calafrios periódicos e a febre cíclica, um padrão clássico da sintomatologia da malária, dão uma certa segurança sobre o diagnóstico. Este episódio coincide com a rutura dos eritrócitos durante o ciclo eritrocitário. A fase febril, que pode chegar a 41°C, dura de 2 a 6 horas e é seguida de 15 minutos a 1 hora de defervescência, calafrios e sudorese (Neves *et al.*, 2005).

A duração dos sintomas também varia com a duração dos ciclos eritrocitários de cada espécie: *P. knowlesi* possui ciclo de 24 horas - malária quotidiana, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* têm um ciclo de 48 horas - malária terça, e *P. malariae* tem um ciclo de 72 horas - malária quarta. No entanto, esse padrão só acontece quando não há influência de qualquer tratamento anterior (Neves *et al.*, 2005; Singh & Daneshvar, 2013).

Além dos sintomas previamente referidos, existem ainda sintomas adicionais da doença, como mal-estar, náusea, anorexia e dor abdominal. Inicialmente pode ocorrer uma anemia leve com elevação da contagem de reticulócitos, no entanto o número de leucócitos tende



a permanecer normal ou mesmo baixo, e não há eosinofilia. Conforme o desenvolvimento da doença, o vômito pode-se tornar mais intenso (Despommier *et al.*, 2005).

I.1.6.3 Malária grave

Em adultos e crianças não imunes, assim como em mulheres grávidas, a infecção pode agravar-se para malária grave, que é uma doença potencialmente fatal, mas curável (especialmente em infecções por *P. falciparum*) (Bartoloni & Zammarchi, 2012).

A malária grave é uma desordem multissistêmica complexa, com muitas semelhanças aos sintomas de sépsis. Os sintomas que indicam esta condição são: hipoglicémia, início de convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbios da consciência, podendo mesmo levar a outras formas clínicas complicadas e graves, como malária cerebral, edema agudo de pulmão, icterícia, hemoglobinúria e hipovolemia (Mackintosh *et al.*, 2004). A malária cerebral é provocada por eritrócitos infetados sequestrados que obstruem os pequenos vasos do cérebro e anemia grave é causada pela destruição dos eritrócitos. A verificação a nível clínico é realizada através do reconhecimento da acidose metabólica e, embora a patogénese não seja totalmente compreendida, sabe-se que isso indica dificuldade respiratória - o mais forte indicador de morte na malária grave. A obstrução microvascular de parasitas sequestrados e a anemia, juntamente com a hipovolemia, levam provavelmente à diminuição da oferta de oxigénio aos tecidos, ao metabolismo anaeróbico e à acidose láctica (em alguns casos) (Taylor *et al.*, 1993; Marsh *et al.*, 1995; English *et al.*, 1996; Maitland *et al.*, 2003).

Nas espécies de *Plasmodium* que não *P. falciparum*, quando a doença não é tratada aos primeiros indícios de sintomas, esta tende a tornar-se crónica, provocando repetidos ataques causados por recrudescência ou relapso. No caso de *P. falciparum*, quando não tratada, pode ser fatal nos estágios iniciais após o início dos sintomas, especialmente em infecções em crianças jovens ou adultos não imunes. No entanto, com o tempo, o sistema imunológico do indivíduo pode desenvolver uma imunidade protetora contra o parasita (Despommier *et al.*, 2005).



I.1.7 Controlo e Prevenção

Para a prevenção da malária, a recomendação da OMS é o controlo de vetores e quimioprevenção quer para subgrupos populacionais específicos, quer para contextos específicos, tais como emergências complexas e eliminação.

O controlo efetivo do vetor levará à redução da transmissão e, conseqüentemente, à diminuição da morbidade e da mortalidade provocada pela malária. A OMS considera que as duas principais intervenções operacionais para o controlo do paludismo são as redes mosquiteiras impregnadas com inseticidas de longa duração e a pulverização residual com inseticidas no interior das casas. Em áreas com transmissão moderada ou alta, a implementação de redes mosquiteiras tratadas com inseticida piretróide reduziu o nível de mortalidade em crianças menores de 5 anos em aproximadamente 20% (Phillips-Howard *et al.*, 2003). No entanto, o aparecimento da resistência aos inseticidas está-se a tornar num grande problema a nível geral para todos os programas de controlo da malária (WHO, 2018a).

O tratamento preventivo intermitente, com sulfadoxina-pirimetamina, em mulheres grávidas e crianças (WHO, 2018h) e a quimioprevenção sazonal da malária, com amodiaquina e sulfadoxina-pirimetamina, em crianças menores que 5 anos, pode evitar milhões de casos, milhares de mortes e reduzir a incidência de casos clínicos e malária grave em cerca de 75% entre crianças que vivem em áreas de transmissão altamente sazonal da malária, como na sub-região do Sahel (WHO, 2013).

É necessário um compromisso político claro, o envolvimento das autoridades nacionais e o apoio a longo prazo por parte dos parceiros de financiamento para que haja uma implementação eficaz e sustentada do controlo dos vetores da malária; para além da necessidade de medir o progresso, avaliar os retrocessos e reorientar o programa para que se atinjam as metas nacionais e/ou globais definidas (The Global Fund, 2018).

Relativamente à prevenção, é aconselhada a realização de profilaxia aos viajantes que se deslocam para regiões endémicas. O fármaco, ou combinação de fármacos, varia de país para país. Nenhum dos fármacos permite uma proteção total, sendo que se devem tomar cuidados adicionais de proteção, como a utilização de repelentes de insetos, roupas que



cubram o máximo do corpo, além da utilização de redes mosquiteiras ou pulverização já acima referidos (CDC, 2018b).

Atualmente, a OMS recomenda a profilaxia com primaquina como gametocitocida de *P. falciparum*, uma vez que esta tem uma elevada eficácia no bloqueio da transmissão com apenas uma dose única (0,25mg/kg) (WHO, 2012). No entanto, apesar de, segundo os testes da OMS, ser pouco provável que esta cause toxicidade grave em indivíduos com qualquer uma das variantes de glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) que possa causar deficiência na atividade desta enzima, é sempre benéfico o diagnóstico prévio quanto à sua condição, uma vez que a primaquina pode provocar hemólise dos eritrócitos em indivíduos com esta deficiência (Li *et al.*, 2008; White *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013; Howes *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015; WHO, 2015a).

Ainda referente à prevenção da malária, têm sido realizados grandes esforços no estudo e desenvolvimento de uma vacina eficaz. Neste momento, a vacina mais promissora é a RTS,S. Esta tem um adjuvante químico, o Sistema Adjuvante AS01, para aumentar a resposta do sistema imunológico e foi baseada na proteína circunsporozoítica de *P. falciparum*. Nos testes clínicos em crianças jovens, realizado em vários países africanos, a vacina demonstrou uma eficácia de 17-56% em casos de malária não-complicada e 38-50% em casos de malária grave (Kliegman *et al.*, 2017; MVI, 2018b). Esta vacina tem também como alvo uma proteína do envelope viral do vírus da hepatite B. O Programa de Implementação de Vacinas contra a Malária, da OMS, irá disponibilizar, para breve, a vacina RTS,S em áreas selecionadas do Gana, Quênia e Maláui (RTS, S Clinical Trials Partnership, 2012; RTS, S Clinical Trials Partnership, 2015; MVI, 2018b).

I.1.8 Diagnóstico

I.1.8.1 Microscopia ótica

O padrão de ouro do diagnóstico de malária ainda é a Microscopia Ótica, através da observação de esfregaço sanguíneo e/ou gota espessa com coloração de Giemsa, pois permite a identificação das diferentes espécies de *Plasmodium*, os diferentes estádios do ciclo de vida do parasita e o nível de parasitemia (DGS, 2017; WHO, 2018e). Esta técnica exige um microscopista qualificado e bem treinado, é trabalhosa e demorada, e tem baixa



sensibilidade, sendo o mínimo detetável pelo exame microscópico cerca de 5-20 parasitas/ μ L (Bruce-Chwatt, 1984; Ciceron *et al.*, 1999).

I.1.8.2 Testes de diagnóstico rápido

Os testes de diagnóstico rápido (RDTs) têm a capacidade de detetar antigénios (proteínas) específicos produzidos pelos parasitas de *Plasmodium* spp. presentes no sangue dos indivíduos infetados. Existem diferentes tipos de RDTs, alguns com capacidade de deteção de uma única espécie, e outros com capacidade de deteção de diferentes *Plasmodium* spp. em simultâneo (*P. falciparum* e *P. vivax*), através da deteção de diferentes proteínas. Os RDTs para deteção do género *Plasmodium* detetam antigénios de aldolase de *Plasmodium* ou pLDH (*Plasmodium* lactate dehydrogenase); para identificação de *P. falciparum* detetam antigénios de isómeros de pLDH (específicos para *P. falciparum*) ou PfHRP2 (*P. falciparum* histidine-rich protein-2); e para identificação de *P. vivax* detetam antigénios de isómeros de pLDH (específicos para *P. vivax*) (Moody, 2002; Makler & Piper, 2009; Lillehoj *et al.*, 2013; Kasetsirikul *et al.*, 2016; WHO, 2018f).

Os testes são realizados diretamente a partir de uma gota de sangue dos indivíduos infetados, sendo esta obtida a partir de punção digital, e os resultados estão disponíveis em 15 a 30 minutos. Sendo os RDT tão práticos e rápidos, são até ao momento, o método indicado para o diagnóstico clínico da malária em termos de *point-of-care* (POC) (Hansen *et al.*, 2015; Silumbe *et al.*, 2015; Boyce *et al.*, 2015). No entanto, estes têm baixa sensibilidade e, no caso de RDTs baseados em PfHRP2, estão muito propensos a falso-positivos, uma vez que, mesmo após o parasita ter sido eliminado da circulação do paciente, os antigénios originários do parasita, como o pfHRP2, podem persistir no sangue durante cerca de 2 semanas, tal como, a uma elevada taxa de resultados falso-negativos, provocada pela alta prevalência de deleção do gene *pfhrp2* (WHO *et al.*, 2014; Gendrot *et al.*, 2018).

I.1.8.3 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

Atualmente, a OMS recomenda uma confirmação parasitológica imediata por microscopia ou RDT em todos os pacientes suspeitos de malária antes de iniciar tratamento, a fim de acabar com o tratamento presuntivo da malária. Deste modo, têm sido realizados esforços que visam desenvolver métodos de diagnóstico mais sensíveis, específicos e informativos, levando a um tratamento mais informado e a uma escolha de



antimaláricos mais exata e específica possível para cada indivíduo infetado (WHO, 2018a).

O principal método molecular de diagnóstico de infecções de malária são as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), dado terem maior especificidade e sensibilidade na identificação e diferenciação ao nível das espécies de *Plasmodium*, dando resultados quantitativos e qualitativos. Entre as principais técnicas de amplificação de ácidos nucleicos desenvolvidas para o diagnóstico de infecção por *Plasmodium* spp., estão: *nested* PCR, *multiplex* PCR e amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) (Snounou & Singh, 2002; Padley *et al.*, 2003; WHO, 2018g).

A técnica de PCR é baseada no processo de replicação do DNA que ocorre *in vivo*; esta técnica tem como objetivo a amplificação de uma sequência alvo única e bem conservada no genoma de *Plasmodium*, sequência essa que não exista nos hospedeiros vertebrados (humanos) e não-vertebrados (mosquito). Durante o PCR, são usadas temperaturas específicas (elevadas) de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, possibilitando então a ligação de dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*) – *sense/forward* e *anti-sense/reverse*, os quais são obtidos por síntese química.

O gene que codifica para o RNA da subunidade ribossomal 18S (18S rRNA) é altamente conservado nas espécies de *Plasmodium* e é o alvo mais frequentemente utilizado, possuindo sequências únicas que permitem a identificação de todas as cinco espécies de malária que infetam humanos assim como um número elevado de cópias no genoma do parasita (entre quatro a oito cópias/parasita) (Snounou & Singh, 2002; Kasetsirikul *et al.*, 2016; WHO, 2018g). Outro alvo comumente utilizado é o DNA mitocondrial, devido à sua grande abundância em relação ao DNA nuclear (entre 30-100 cópias/parasita), como por exemplo, o caso de um gene bem conservado do citocromo b no genoma da mitocôndria em *Plasmodium* spp. que infetam humanos (Steenkeste *et al.*, 2009).

I.1.8.3.1 *Nested* PCR

A técnica *nested* PCR usa uma estratégia de dois ciclos de amplificação, onde o produto da primeira reação serve como molde para um segundo e os dois *primers* oligonucleótidos usados, na segunda reação, hibridizam para sequências pré-amplificadas dentro daquele produto, sendo consequentemente, uma técnica muito sensível e específica (Snounou *et*



al., 1993a; Snounou *et al.*, 1993b; Snounou *et al.*, 1993c; Snounou *et al.*, 1999; Snounou & Singh, 2002). No entanto, esta é uma técnica demorada (cerca de 7h) e que exige, uma zona limpa para lidar com o DNA molde, e uma zona extra para lidar com o produto amplificado da primeira reação.

I.1.8.3.2 Multiplex PCR

Em contrapartida, a técnica *multiplex* PCR usa um conjunto de *primers* numa única amplificação, um *primer anti-sense* e um ou mais *primers sense*, específicos para cada sequência alvo, permitindo a amplificação de uma ou mais sequências alvo em simultâneo, sendo, por conseguinte, mais prática, menos demorada e menos propensa a contaminações cruzadas (Padley *et al.*, 2002; Padley *et al.*, 2003).

As técnicas baseadas em PCR, apesar de exigirem equipamentos caros e técnicos qualificados, são técnicas com elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que permitem não apenas identificar as diferentes espécies de *Plasmodium*, mesmo em infeções mistas, mas também detetar marcadores moleculares relacionados com resistências a antimaláricos ou outros fatores que caracterizam a infeção, através da análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (Imwong *et al.*, 2001; Padley *et al.*, 2002; Padley *et al.*, 2003; Imwong *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2006; Tangpukdee *et al.*, 2009; Chotivanich *et al.*, 2009; Niemz *et al.*, 2011; Antony & Parija, 2016).

I.1.8.3.3 LAMP

Uma das mais recentes técnicas de amplificação de ácidos nucleicos a ser adaptada para o diagnóstico de malária é a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), uma técnica muito específica, eficiente e rápida (Notomi *et al.*, 2000; Polley *et al.*, 2013; Piera *et al.*, 2017). A especificidade da técnica LAMP advém da utilização de um conjunto de seis *primers*, que inclui dois *primers* externos (F3 e B3), dois *primers* de *loop* (LF e LB) e dois *primers* internos (FIP e BIP). A estrutura em *loop*, característica da amplificação de LAMP, duplica o tamanho de cada fragmento em cada ronda de amplificação, podendo produzir até 10⁹ cópias em apenas 1h (Figura I.7) (FIND, 2012; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017). Sendo esta uma técnica relativamente recente no diagnóstico de malária, e dado o facto de ter uma elevada exigência ao nível da especificidade/conservação da sequência alvo a amplificar, esta encontra-se em grande destaque perante a comunidade científica de forma a ser otimizada para a deteção de todas as cinco espécies de *Plasmodium* em



humanos, sendo que de momento já existem alguns protocolos disponíveis para identificar, essencialmente, o género *Plasmodium* (pan-*Plasmodium*), a espécie *P. falciparum* e, mais recentemente, a espécie *P. vivax* (Polley *et al.*, 2010; FIND, 2012; Singh *et al.*, 2013; Najafabadi *et al.*, 2014; Dinzouna-Boutamba *et al.*, 2014). Esta técnica tem também duas grandes vantagens em termos de baixo custo que passam: 1) pela dispensabilidade de utilização de termociclador, uma vez que o DNA é amplificado sob condições isotérmicas e 2) pela possibilidade de observação do produto amplificado à vista desarmada, que acontece devido à precipitação dos subprodutos de pirofosfato de magnésio formados durante a amplificação (Notomi *et al.*, 2000; Schweitzer & Kingsmore, 2001; Mori *et al.*, 2001; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017).

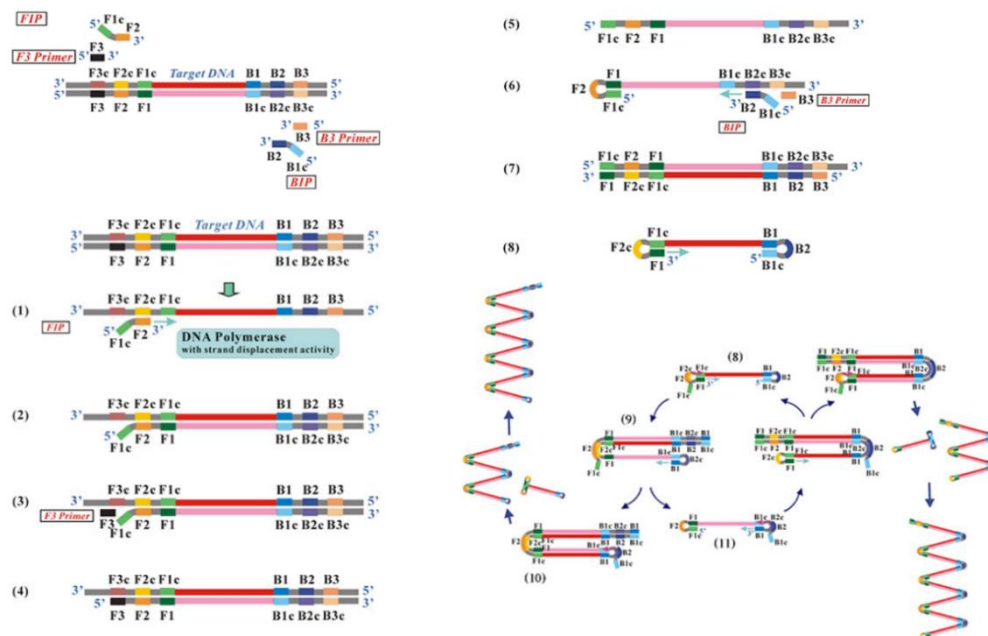


Figura I.7 Processo de amplificação de DNA pela técnica LAMP (Einken, 2005).

I.1.8.3.4 Detecção de produtos amplificados

A análise dos produtos obtidos através técnicas de amplificação de ácidos nucleicos está geralmente envolvida com métodos de leitura dispendiosos e/ou com mão-de-obra intensiva, tais como sistemas de eletroforese em gel de agarose e de deteção de fluorescência ou sistemas de eletroforese por capilaridade, onde os ácidos nucleicos são separados de acordo com o seu tamanho através da aplicação de voltagem em capilares com gel no interior e os dados são convertidos em imagens diretamente no *software*



informático (QIAGEN[®], 2014). No entanto, considerando que os principais surtos de malária ocorrem em áreas de baixa renda, é essencial que os métodos de detecção e análise possam ser usados em ambientes não laboratoriais e/ou no campo. Com isso em mente, um método de análise muito conveniente é a tecnologia com microfluidos como é o caso das tiras de fluxo lateral (LFD – *lateral flow dipstick*) (Milena Biotec[®], 2010; Kersting *et al.*, 2014; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017).

Um dos métodos mais inovadores na área do LFD é a utilização de partículas de ouro para a detecção de produtos de amplificação, inclusive uma dupla detecção. Através da marcação dos oligonucleótidos (*primers*), utilizados nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, com isotiocianato de fluoresceína (FITC), biotina e digoxigenina, que por sua vez vão formar produtos amplificados duplamente rotulados (FITC-biotina e FITC-digoxigenina), que se vão ligar à respetiva banda na tira LFD (a qual possui ligandos de biotina e anticorpos anti-digoxigenina), banda essa que fica de cor negra devido à ligação da partícula de ouro a FITC. Este teste, para além de ser quase instantâneo (cerca de 2 minutos), dá um resultado qualitativo e semiquantitativo colorido que pode ser analisado à vista desarmada, ideal para usuários não técnicos (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Milenia Biotec[®], 2010; Kersting *et al.*, 2014; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017).

I.1.9 Tratamento

Segundo a OMS, existem alguns princípios base para o tratamento da malária. Estes princípios passam pelo diagnóstico precoce e tratamento rápido e eficaz de forma a evitar que a malária não-complicada evolua para formas mais graves da doença (WHO, 2015a). A dosagem dos fármacos antimaláricos deve ser calculada segundo o peso dos indivíduos infetados e ser administrado em concentrações e por períodos ótimos em termos de eficácia de eliminação da infeção. Para redução do aumento das resistências aos antimaláricos, estes devem ser apenas administrados, após o diagnóstico confirmatório da infeção por *Plasmodium* spp. (WHO, 2015a), sendo apenas aceitável o tratamento com base apenas na suspeita clínica em zonas em que não é possível fazer testes de diagnóstico do parasita (WHO, 2018a). Deve ser também aplicada terapia combinada (combinados pelo menos dois antimaláricos com diferentes mecanismos de ação e tempos de meia-



vida diferentes), em vez de monoterapia, uma vez que aumenta a eficácia dos antimaláricos e retarda o aparecimento de resistências aos mesmos (WHO, 2015a).

A OMS recomenda, para infecções não-complicadas por *P. falciparum* e infecções não-complicadas por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (em áreas com infecções resistentes a cloroquina), assim como para viajantes não-imunes com infecções não-complicadas de malária que retornam a áreas não-autóctones, um dos cinco tratamentos de terapia combinada com base em artemisinina (ACT) por 3 dias: artemeter com lumefantrina, artemeter com amodiaquina, artemeter com mefloquina, diidroartemisinina com piperaquina ou artemeter com sulfadoxina–pirimetamina. Estes tratamentos são também aplicáveis a infecções não-complicadas por *Plasmodium* spp., com diagnóstico da espécie incerto. Nas infecções não-complicadas por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (em áreas com infecções suscetíveis a cloroquina) os indivíduos infetados podem ser tratados com ACT ou cloroquina (WHO, 2015a).

Os indivíduos infetados com *P. vivax* ou *P. ovale*, espécies capazes de produzir hipnozoítos e provocar relapsos da infecção, devem ser tratados com primaquina. No entanto, uma vez que a primaquina pode provocar hemólise dos eritrócitos quando em indivíduos com deficiência em G6PD (Li *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013; Howes *et al.*, 2013; Goo *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2015; WHO, 2015a;), os indivíduos infetados que irão ser tratados com primaquina deverão ser previamente diagnosticados quanto à sua condição de G6PD. Os indivíduos normais relativamente a G6PD, devem ser tratados com primaquina (0,25-0,5mg/kg diariamente por 14 dias). No caso dos indivíduos infetados com deficiência em G6PD, este tratamento deve ser menos intensivo (0,75mg/kg, um dia por semana, por 8 semanas) e com vigilância médica rigorosa, de modo a evitar a potencial hemólise induzida pela primaquina (WHO, 2015a).

O tratamento em casos de malária grave passa pela administração intravenosa ou intramuscular de artesunato por pelo menos 24 horas, seguido de tratamento com ACT por 3 dias (WHO, 2015a).

I.1.9.1 Resistência a antimaláricos

A resistência aos fármacos antimaláricos, segundo a OMS, é definida como a capacidade do parasita sobreviver e/ou se multiplicar, apesar da administração e absorção de um antimalárico em doses iguais ou superiores às normalmente recomendadas (dentro dos



limiares de tolerância do indivíduo), enquanto que a resistência a múltiplos fármacos antimaláricos (MDR – *multidrug resistance*) é a resistência a mais de dois compostos antimaláricos de diferentes classes químicas (WHO, 2018d).

A área mais preocupante relativamente a este assunto é a zona do Sudeste Asiático, na Sub-região do Grande Mekong (Figura I.8), onde emergiram resistência a múltiplos antimaláricos, como a cloroquina e a sulfadoxina-pirimetamina, tendo sido posteriormente disseminadas até África, e, mais recentemente, reportada a emergência de resistência parcial à artemisinina, que se relata como a eliminação tardia do parasita após o tratamento com uma monoterapia de artesunato ou com uma ACT (White *et al.*, 2014; WHO, 2018a; WHO, 2018d).

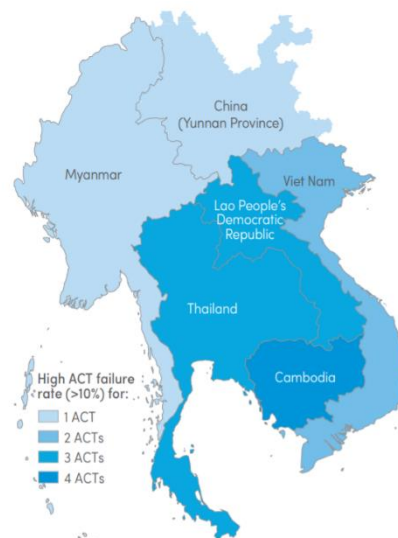


Figura I.8 Número de ACTs com altas taxas de insucesso no tratamento de infeções por *P. falciparum* (WHO, 2018a).

A fim de delinear estratégias como a Estratégia Técnica Global da OMS para a Malária 2016-2030 na eliminação da malária, é de extrema importância a monitorização da eficácia e dos perfis de resistência a fármacos antimaláricos; esta monitorização pode ser feita através da deteção de alvos moleculares específicos, permitindo a elaboração de mapas desses mesmos perfis (WHO, 2015b; Antony & Parija, 2016).

I.1.9.2 Composto E

Devido a este aumento crescente do perfil de resistências a fármacos antimaláricos adquiridos pelos parasitas (WHO, 2015b; WHO, 2018a) é cada vez mais urgente a



procura e estudo de novos compostos antimaláricos com potencial para se tornarem compostos integrantes de novos fármacos (Benoit-Vical, 2005).

O *Composto E* é um polifenol, encontrado em vários produtos vegetais, com propriedades antioxidantes e prooxidantes, assim como atividade anti-mutagénica e anticancerígena já conhecidas (Teel, 1987). De acordo com estudos anteriores, este composto aparenta ser um promissor composto antimalárico, tendo vindo a ser cada vez mais estudado e avaliado o seu potencial para possível integração num fármaco antimalárico (Verotta *et al.*, 2001; Banzouzi *et al.*, 2002; Dell' Agli *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2007; Soh *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2011; Usta *et al.*, 2013; Coronado *et al.*, 2014).

O parasita *Plasmodium* tem a capacidade de degradar hemoglobina (Fe^{2+}), no vacúolo digestivo, em *heme* (quatro moléculas de *heme*, por cada molécula de hemoglobina), que é oxidado em hematina (Fe^{3+}). Esta é extremamente tóxica para o parasita, uma vez que pode gerar espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 , radicais superóxido e radicais hidroxila, que são mediadores diretos de certos processos bioquímicos que causam a ruptura celular e, por consequência, a morte do parasita. Para a sua sobrevivência, o parasita tem sistemas de desintoxicação, através da biocristalização, que consiste na transformação da hematina num pigmento mineralizado: β -hematina e hemozoína (Goldberg *et al.*, 1990; Parra *et al.*, 2011). O potencial efeito antimalárico do *Composto E* atua nesta fase (Figura I.9), uma vez que o seu modo de ação, apesar de não ser totalmente compreendido, pensa-se que impossibilite de alguma forma esta biocristalização (Dell' Agli *et al.*, 2003), impedindo a formação de β -hematina/hemozoína a partir de hematina, e, desta forma, leve à morte do parasita (Parra *et al.*, 2011).

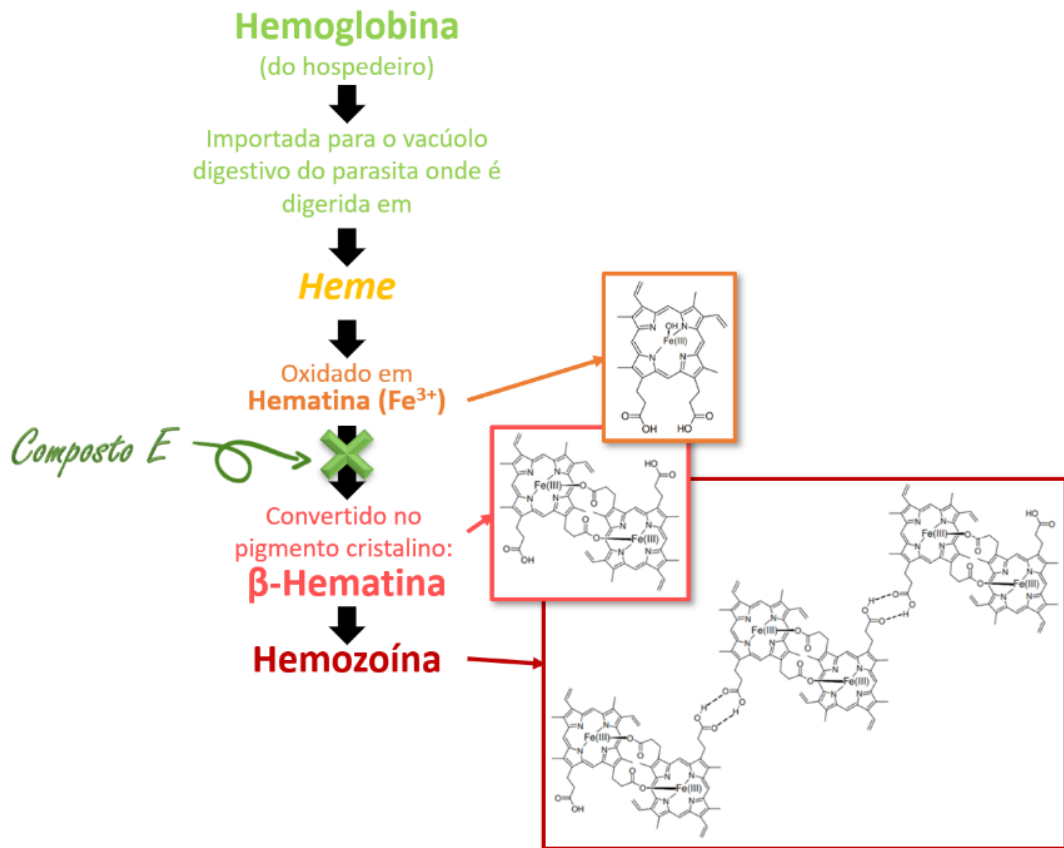


Figura I.9 Degradação da hemoglobina por *Plasmodium* e efeito do *Composto E* (Dell' Agli *et al.*, 2003). Estrutura química de **hematina**, **β-hematina** e **hemozoína** (Parra *et al.*, 2011).



I.2 Justificação e objetivos

Nos últimos anos, apesar do número de países que se encaminham na eliminação da malária estar a aumentar, tem ocorrido uma regressão do progresso global no combate à malária, influenciado pelo aumento do número de casos em alguns países com maior impacto (WHO, 2018a). Outro elemento interveniente nesta regressão são os casos de malária importada, que aparentam estar a aumentar com o aumento do número de turistas e de populações migrantes. Atualmente, uma grande emergência destes casos aparenta estar relacionada com a crise dos refugiados, indivíduos que procuram exílio em território europeu, e outros, e que com eles trazem o parasita *Plasmodium*, possibilitando a sua transmissão a cidadãos não-imunes, no acaso de existirem espécies de mosquitos *Anopheles* vetores nessa região (Takken & Lindsay, 2003; Norman *et al.*, 2015; Piperaki & Daikos, 2016; Castille & Sulis, 2017; de Gier *et al.*, 2017; Eperon *et al.*, 2017). Esta mobilidade global, que se prêve que continue a aumentar, está a contribuir para a mudança da epidemiologia da malária e, conseqüentemente, a levar a uma maior dificuldade no seu combate (Norman *et al.*, 2015; Piperaki & Daikos, 2016).

De forma a ir de encontro aos objetivos da Estratégia Técnica Global da OMS para a Malária 2016-2030, de reduzir o número de casos e de mortes por malária em pelo menos 40% até 2020 (WHO, 2015b), é importante agir na medida de controlar a doença, sendo possível através de três aspetos-chave: diagnóstico rápido, tratamento precoce e a escolha adequada do tratamento antimalárico (WHO, 2018a), quer para casos de malária importada, quer para os países de elevada incidência, em que também é essencial a melhoria e otimização das medidas de prevenção e fortalecimento do sistema de vigilância da malária (WHO, 2015b; WHO, 2016).

De modo a contribuir para os dois primeiros aspetos-chave para o controlo da malária, diagnóstico rápido e tratamento precoce, é necessário a existência de um diagnóstico detalhado com informações biológicas individuais, que incluam características clínicas e genéticas (através de deteção de marcadores moleculares específicos), de forma a alcançar o tratamento com melhor resposta e maior margem de segurança, garantindo um tratamento mais eficaz ao indivíduo infetado e, portanto, a promoção do controlo da doença na população, isto é, baseando-se na medicina personalizada (Vogenberg *et al.*,



2010; Becla *et al.*, 2011; Drahia-Akli, 2012; AMS, 2013; Schleidgen *et al.*, 2013; Di Paolo *et al.*, 2017).

O presente projeto tem como Objetivo Geral o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico, baseada numa técnica de amplificação de ácidos nucleicos, rápida, confiável e económica, que disponibilize um perfil de informações que podem influenciar o tratamento, permitindo um tratamento precoce, mas eficaz, ao nível da medicina personalizada. Para esse propósito, este dispositivo deve: permitir a identificação rápida das espécies de *Plasmodium* presentes, através da deteção de sequências de DNA amplificadas, específicas para as diferentes espécies, assim como a identificação de determinados marcadores moleculares associados a características que podem influenciar o tratamento, tais como resistências a fármacos antimaláricos e de severidade da doença (no caso de uma infeção por *P. falciparum*) ou deficiência em G6PD (no caso de uma infeção por *P. vivax* ou *P. ovale*) (Figura I.10).

Os Objetivos Específicos são:

- i. Otimizar as técnicas de diagnóstico molecular em estudo (amplificação de DNA): *nested* PCR, *multiplex* PCR e LAMP;
- ii. Determinar, dentro das três técnicas em estudo, qual a mais apropriada para a deteção de espécies de *Plasmodium*, de acordo essencialmente com a sensibilidade e tempo de execução;
- iii. Desenhar a marcação dos *primers* da técnica escolhida e otimizar a deteção dos produtos amplificados através da técnica LFD;
- iv. Estudar e desenhar *primers*, para a técnica escolhida, para amplificar alvos moleculares relacionados com características que podem influenciar o tratamento (referidos anteriormente);
- v. Otimizar a leitura dos diferentes produtos amplificados através da técnica LFD.

Os objetivos adicionais deste projeto são:

- a. Comparar a eficiência das diferentes técnicas de extração de DNA (processamento das amostras) e selecionar a mais adequada para a conceção de um diagnóstico rápido;



- b. Otimizar, comparar a eficiência e estabelecer a técnica de detecção de produtos amplificados mais adequada, entre eletroforese em gel de agarose e eletroforese por capilaridade, para a elaboração deste projeto.

Relativamente ao terceiro aspeto-chave no controlo da malária, a escolha adequada do tratamento antimalárico (WHO, 2018a), devido ao aumento de perfil de resistências a fármacos antimaláricos adquiridos pelo parasita, é cada vez mais urgente o estudo de novos compostos antimaláricos com potencial para se tornarem constituintes integrantes de novos fármacos (Benoit-Vical, 2005; WHO, 2015b; WHO, 2018a). Para esse efeito, foi realizado, através de um estágio pelo programa Erasmus+¹, no Departamento de Oncologia da Università degli studi di Torino, em Turim, Itália, o estudo de um composto com potencial efeito antimalárico. Este foi realizado sob a orientação da Dr^a Evelin Schwarzer, tendo como tema “A interação do parasita da malária com as células imunitárias do hospedeiro humano” (*Malaria parasite interaction with human host immune cells*)². O objetivo deste estudo foi a análise do efeito do *Composto E* em *P. falciparum* (*in vitro*), através de possíveis alterações no desenvolvimento do parasita, nomeadamente no processo metabólico de degradação de hemoglobina. Para tal foram analisadas: densidade parasitária, número de células (RBCs) por unidade de volume e quantidade de hemozoína (através de técnica de luminescência) por unidade de volume e por número de RBCs. Foram também desenvolvidos procedimentos de rotina inerentes à manutenção e gestão de culturas *in vitro* de *P. falciparum* (Figura I.10).

Referente aos objetivos apresentados anteriormente, e esquematizados na Figura I.10., devido a contratempos frequentemente inerentes a trabalhos de investigação científica e no desenvolvimento de projetos pioneiros, como dificuldades na otimização de técnicas e escassez de tempo, levou a que apenas fosse possível concretizar os objetivos até ao

¹ “O programa Erasmus+ permite aos estudantes do ensino superior, realizarem um estágio de 2 meses, em contexto de Trabalho / Investigação. Estes estágios podem decorrer numa Empresa ou numa Instituição de Ensino Superior, sendo que o estudante não vai realizar um período de estudos, mas sim adquirir uma experiência de trabalho, investigação e pesquisa. Esta experiência é considerada uma mais valia para alunos de 2º e 3º ciclos na fase de realização das suas dissertações / teses.” [retirado do Edital ERASMUS + Estágios (SMT), Ano letivo 2017-2018].

² Os resultados aqui apresentados são dados científicos originais não publicados e devem ser tratados confidencialmente. A Dr.^a Schwarzer reivindica direitos de propriedade intelectual para uma publicação científica potencial após experiências adicionais no laboratório do Departamento de Oncologia da Università degli studi di Torino, em Turim, Itália.

ponto iii. “Desenhar a marcação dos *primers* da técnica escolhida e otimizar a detecção dos produtos amplificados através de LFD”. Os pontos cuja concretização não foi possível em tempo útil, iv. e v., estão posteriormente referidos na dissertação em V. Conclusões e Considerações Finais.

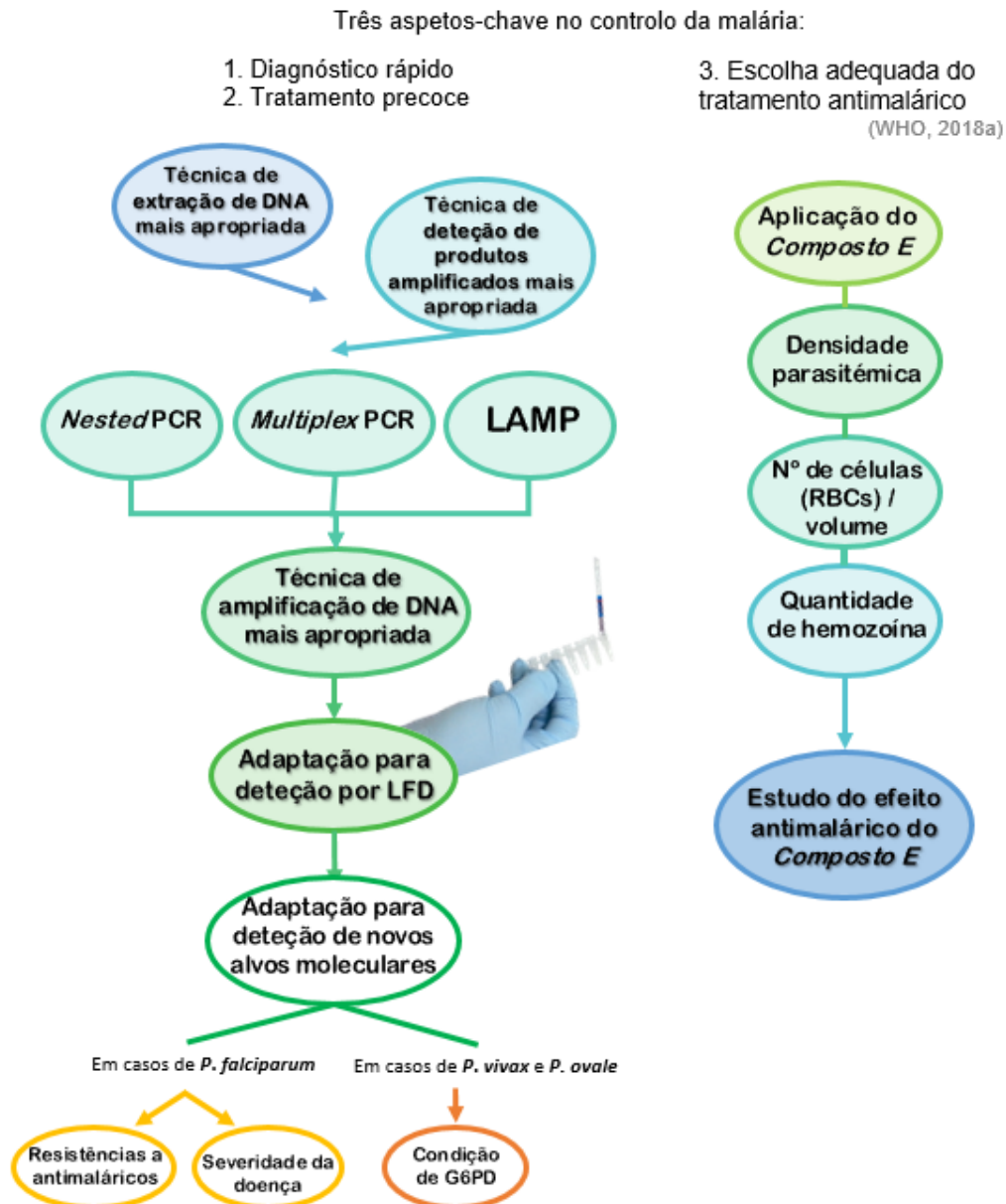


Figura I.10 Esquema representativo dos objetivos da dissertação.



II. Materiais e Métodos



II.1 Amostras biológicas

II.1.1 Origem das amostras biológicas

Neste projeto, foram utilizadas amostras biológicas de sangue infetado por *Plasmodium* de duas origens diferentes para dois objetivos diferentes.

Para otimização das técnicas, quer de extração quer de diagnóstico molecular, foram utilizadas amostras de culturas *in vitro* de *P. falciparum* estirpe 3D7 mantidas por elementos do Grupo de Malária da UEI de Parasitologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, para outros trabalhos em curso, não tendo sido realizadas especificamente para este projeto. Estas são mantidas em sangue tipo 0 com um hematócrito de 5%, incubadas a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂ e 90% N₂. Foram utilizadas amostras de culturas de *P. falciparum* maioritariamente em fase de anel, que melhor simula uma infeção natural no hospedeiro humano e as amostras utilizadas apresentavam densidades parasitárias entre 1,2% e 6%.

Para os testes de sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico molecular, foram utilizadas três amostras de sangue periférico coletado de indivíduos infetados com malária e armazenadas a -20°C no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa. Estas amostras encontravam-se codificadas não tendo sido disponibilizado qualquer informação pessoal destes indivíduos. As amostras foram selecionadas a partir de um conjunto de isolados pela sua caracterização quanto à infeção: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (Tabela II.1). Não foram utilizadas amostras das outras duas espécies de *Plasmodium* infetante de humanos (*P. ovale* e *P. knowlesi*) por não existirem no armazenamento ou não estarem preservadas em condições.

Tabela II.1 Parasitemia das amostras biológicas (parasitemia determinada no momento da colheita).

	Espécie de <i>Plasmodium</i>	Parasitas/ μ L
Amostras de indivíduos infetados	<i>P. falciparum</i>	25.290
	<i>P. vivax</i>	3.400
	<i>P. malariae</i>	3.264



II.1.2 Técnicas de extração de DNA

O processo de extração de DNA, apesar de tornar o processo de diagnóstico um pouco mais moroso e dispendioso, é importante para a realização de técnicas de diagnóstico por amplificação de ácidos nucleicos. Uma vez que *Plasmodium* é um parasita eucariota e intracelular, o seu DNA, necessário ao diagnóstico, para além de estar naturalmente protegido pela membrana nuclear e pela membrana exterior do parasita, está ainda preso dentro da membrana do eritrócito, é, portanto, essencial a lise das membranas e a extração do DNA. Foram testados dois métodos de extração de DNA a partir do sangue periférico dos indivíduos infetados.

II.1.2.1 Método de três fases

O primeiro método de extração de DNA foi baseada no método descrito por Plowe *et al.*, 1995. Este procedimento compreende 3 fases: lise, extração e precipitação do DNA.

Na primeira fase, a lise, foram identificados todos os tubos de 1,5mL tipo Eppendorf[®], cada um com 60µL de sangue periférico, assim como dois outros tubos com a mesma quantidade em água – “branco” /controlo negativo - de forma a aferir qualquer possível contaminação. Todas as amostras, inclusive os “brancos”, passaram pelos mesmos processos. Foi adicionado a cada tubo 1mL 1x PBS (VWR[®]) + 0,5% p/v saponina (Sigma-Aldrich[®]) e deixado na incubadora (VWR[®]) por 2h a 37°C. Efetuou-se uma centrifugação (Centrifuge 5810R, Eppendorf[®]) a 14.000rpm por 15min. a 4°C e foi descartado o sobrenadante. Nesta fase, procedeu-se à realização, por três vezes, dos seguintes dois passos: adição a cada tubo 1mL 1x PBS e incubação por 20min. a 4°C, seguido de centrifugação a 14.000rpm por 15min. a 4°C e descarto do sobrenadante.

Durante a extração, foi adicionado 200µL Chelex-100 (Sigma-Aldrich[®]) 5% p/v a 100°C, vortexando vigorosamente por 30seg. e incubado por 10min. a 100°C (com vortex rápido aos 5min.). Efetuou-se centrifugação a 14.000rpm por 15min. a 4°C.

Na última fase, de precipitação do DNA, o sobrenadante foi adicionado em novos tubos, inicialmente com 45µL de acetato de sódio (Sigma-Aldrich[®]) e 1mL de etanol 100% v/v (Fisher Scientific[™]) (preservado a -20°C) e os tubos foram deixados a incubar durante a noite a -20°C. No dia seguinte, efetuou-se centrifugação a 14.000rpm por 15min. a 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 700µL de etanol 70% v/v (ThermoFisher[™]) (preservado a -20°C). Centrifugou-se novamente a 14.000rpm por 10min. a 4°C,



descartou-se o sobrenadante e permitiu-se a secagem por completo do etanol (tapando os tubos com *parafilm* furado), por 1h numa estufa a 37°C. Por último, eluiu-se o *pellet* em tampão TE (Tampão composto por Tris-HCl (tris-ácido clorídrico) (Biorad e Sigma-Aldrich[®], respetivamente) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Sigma-Aldrich[®]), de forma a que 1µL de TE correspondesse a 5µL de sangue periférico inicialmente usado. Preservou-se a 4°C até à sua utilização.

II.1.2.2 Método de duas fases

O segundo método de extração de DNA foi baseada no método descrito em WWARN, 2015. Este procedimento compreende apenas 2 fases: lise e extração do DNA.

Na fase de lise, à semelhança da técnica de extração de anteriormente referida, foram identificados todos os tubos de 1,5mL tipo Eppendorf[®], cada um com 60µL de sangue periférico, assim como dois outros tubos com a mesma quantidade em água – “branco” /controlo negativo - de forma a aferir qualquer possível contaminação. Todas as amostras, inclusive os “brancos”, passaram pelos mesmos processos. Foi adicionado a cada tubo 1mL 1x PBS (VWR[®]) + 0,5% p/v saponina (Sigma-Aldrich[®]) e centrifugou-se (Centrifuge 5810R, Eppendorf[®]) a 14.000rpm por 2min. a 4°C e foi descartado o sobrenadante.

Durante a extração, foi adicionado 200µL Chelex-100 (Sigma-Aldrich[®]) 5% p/v a 100°C, vortexado vigorosamente por 30seg. e incubado por 10min a 100°C (com vortex rápido aos 5min.). Efetuou-se centrifugação a 14.000rpm por 1min. a 4°C, aproveitando-se o sobrenadante. Preservou-se a 4°C até à sua utilização.

II.1.3 Quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA extraído, em ng/µL, foi realizada num espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific[®]) seguindo as instruções do mesmo.

Das amostras de culturas de *P. falciparum* 3D7 foi possível extrair entre 75ng/µL e 119ng/µL de DNA puro.

Para efeito dos testes de sensibilidade foram realizadas diluições seriadas do DNA até 10⁻⁷ das amostras de indivíduos infetados (Tabela II.2).



Tabela II.2 Quantificação do DNA das diferentes amostras dos indivíduos infetados e respetivas diluições.

		Quantificação do DNA (ng/ μ L)							
		Original	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Amostras de indivíduos infetados	<i>P. falciparum</i>	112	11,2	1,1	0,11	0,01	0,001	0,0001	0,00001
	<i>P. vivax</i>	103	10,3	1,0	0,10	0,01	0,001	0,0001	0,00001
	<i>P. malariae</i>	89	8,9	0,9	0,09	0,01	0,001	0,0001	0,00001

II.2 Técnicas de deteção de produtos amplificados

A deteção dos produtos amplificados poderia ser realizada por métodos diferentes: eletroforese em gel de agarose, eletroforese por capilaridade (QIAxcel, QIAGEN®) e LFD (HybriDetect 2T, Milenia Biotec®).

Sendo LFD o método de deteção de produtos amplificados tido como objetivo final de deteção, ao longo do desenvolvimento deste projeto, durante os processos de otimização das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, foi necessária a utilização de métodos de eletroforese: em gel de agarose e por capilaridade. Estes foram testados e avaliados segundo a sua eficácia e rapidez.

II.2.1 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada com gel de agarose (Seakem®LE Agarose, Lanza) a 2% p/v em tampão TAE [constituído por Tris (Biorad), ácido acético (Sigma-aldrich®) e EDTA (Sigma-Aldrich®)], com 0,005% v/v de corante Expert Green DNA Stain (GRiSP), numa tina própria para o efeito sob a corrente elétrica estabelecida por um gerador (Power Pac Basic, Biorad), a cerca de 100V, por um período de tempo que pode variar entre 30min. a 1h. A visualização de imagem foi possível através de luz UV (Syngene), com captação de imagem através de uma câmara fotográfica (PowerShot G5, Canon) e recolha e edição da mesma pelo *software* ZoomBrowse Ex (Canon).

II.2.2 Eletroforese por capilaridade

A eletroforese foi realizada num aparelho QIAxcel (QIAGEN®) com QIAxcel DNA High Resolution Kit, QX DNA Size Marker 50/800pb e QX Alignment Marker 15 pb/1kb. A visualização e captação de imagem foi possível através do *software* QIAxcel ScreenGel,



de acordo com as instruções do fabricante QIAGEN® (QIAGEN, 2014). Este método demora exatamente 12min. por cada fila de amostras (12 amostras), sendo que as imagens são automaticamente e imediatamente disponibilizadas.

II.2.3 LFD

Após o processo de amplificação terminado, é adicionado 100µL de HybriDetect Assay Buffer (Milenia Biotec®) e a tira de LFD (HybriDetect 2T, Milenia Biotec®) é mergulhada no tubo de reação por 5-15min. Os dispositivos LFD comerciais (HybriDetect 2T, Milenia Biotec®) para a detecção de produtos amplificados marcados foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante (Milena Biotec®, 2010).

II.3 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

II.3.1 *Nested* PCR

A técnica de *nested* PCR consiste em duas reações de PCR sucessivas com dois conjuntos de *primers* diferentes, em que a 2ª reação de PCR tem como objetivo amplificar um alvo secundário no produto amplificado da 1ª reação de PCR. Esta técnica exige a utilização de quatro espaços diferentes: sala “limpa” para a preparação da mistura de reação (câmara de biossegurança – Nuair® *biological safety cabinets*, Class II), sala “limpa” para o manuseamento do DNA, sala intermédia para manipulação do produto amplificado (da 1ª reação) e sala “suja” para o manuseamento do produto amplificado final (da 2ª reação) e detecção dos mesmos, por técnicas de eletroforese.

Neste trabalho, os *primers* utilizados no *nested* PCR (Snounou *et al.*, 1993a) (Tabela II.3) estão desenhados para amplificar regiões do gene da subunidade pequena do RNA ribossomal (ssurRNA) de *Plasmodium*, tendo sido confirmados, por alinhamento com sequências das respetivas espécies, através do *software* Standard Nucleotide BLAST® (NCBI) (Figura II.1), sendo o protocolo baseado em Snounou *et al.*, 1993a e Snounou *et al.*, 1999.

Tabela II.3 *Primers* utilizados na técnica de *nested* PCR.

1 ^a Reação	<i>Plasmodium</i> spp.	rPLU5	5' – CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC – 3'
		rPLU6	5' – TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG – 3'
2 ^a Reação	<i>P. falciparum</i>	FAL1	5' – TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT – 3'
		FAL2	5' – ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC – 3'
	<i>P. vivax</i>	VIV1	5' – CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC – 3'
		VIV2	5' – ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAAGTCCTTA – 3'
<i>P. malariae</i>	MAL1	5' – ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC – 3'	
	MAL2	5' – AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA – 3'	

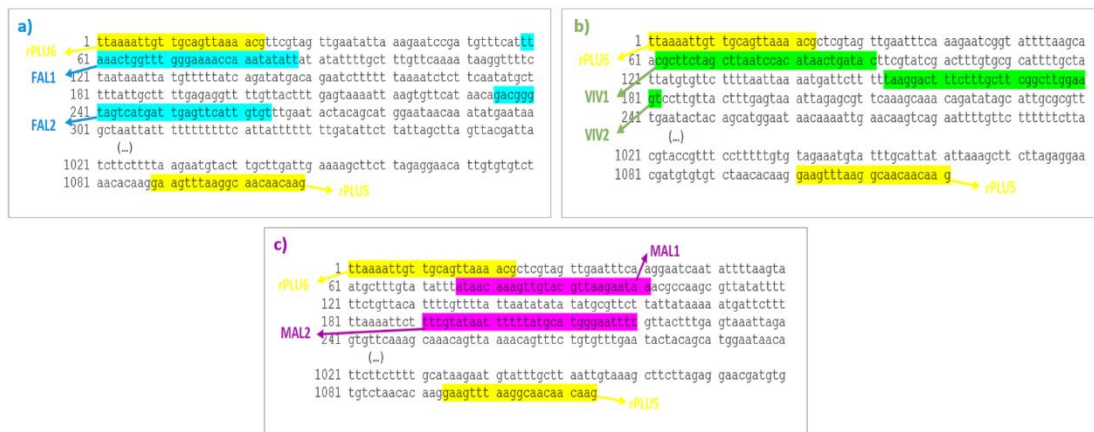


Figura II.1 Localização de cada um dos *primers*, utilizados na técnica de *nested* PCR, em seqüências do genoma de *Plasmodium* spp., de 1^a reação (rPLU5 e rPLU6) e de 2^a reação (FAL1, FAL2, VIV1, VIV2, MAL1 e MAL2), inseridos em seqüências das espécies respectivas. **a)** *P. falciparum* (ssurRNA; n° de acesso: AF145334); **b)** *P. vivax* (ssurRNA; n° de acesso: AF145335); **c)** *P. malariae* (ssurRNA; n° de acesso: AF145336).

II.3.1.1 Reação de *nested* PCR

O protocolo de *nested* PCR, comum entre as duas reações, foi realizada num volume final de 20µl, contendo 1× Colorless GoTaq[®] Flexi buffer (Promega Corporation), 2mM de MgCl₂ (Promega Corporation), 250µM de cada dNTP (Promega Corporation), 125nM de *primers forward* e *reverse*, 0,02U/µL de GoTaq[®] G2 Flexi DNA polymerase (Promega Corporation) e 1µl de DNA (1^a reação) ou 1µl de produto amplificado (2^a reação). A amplificação foi efetuada num termociclador (Biometra T1 Temocicler, Alfagene[®]) segundo as condições da Tabela II.4.



Tabela II.4 Condições de amplificação utilizadas na técnica de *nested* PCR.

	Temperatura	Tempos	N° de ciclos	
			1ª Reação	2ª Reação
Desnaturação inicial	95°C	5min.	1	1
Hibridização dos <i>primers</i>	58°C	2min.		
Extensão/alongamento	72°C	2min.	30	35
Desnaturação	94°C	1min.		
Hibridização final	58°C	2min.	1	1
Extensão final	72°C	5min.	1	1

II.3.2 Multiplex PCR

O *multiplex* PCR é uma técnica de PCR que amplifica várias sequências diferentes de DNA simultaneamente, usando múltiplos *primers* numa única mistura de PCR; ao serem amplificados fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, é possível a detecção de diferentes sequências alvo simultaneamente, economizando tempo e reagentes. Esta técnica exige a utilização de três espaços diferentes: sala “limpa” para a preparação da mistura de reação (câmara de biossegurança – *Nuairé*[®] *biological safety cabinets*, Class II), sala “limpa” para o manuseamento do DNA, sala “suja” para manipulação do produto amplificado e detecção dos mesmos, por técnicas de eletroforese.

Neste trabalho, os *primers* utilizados no *multiplex* PCR (Padley *et al.*, 2003) (Tabela II. 5) amplificam regiões da sequência 18s *ssrRNA*, tendo sido confirmados, por alinhamento com sequências das respectivas espécies, através do *software* Standard Nucleotide BLAST[®] (NCBI) (Figura II.2), sendo o protocolo baseado em Padley *et al.*, 2003.

Tabela II.5 *Primers* utilizados na técnica de *multiplex* PCR.

<i>Reverse</i>	GEN	5' – GTATCTGATCGTCTTCACTCCC – 3'
	FAL	5' – AACAGACGGGTAGTCATGATTGAG – 3'
<i>Forward</i>	VIV	5' – CGGCTTGGAAGTCCTTGT – 3'
	MAL	5' – CGTTAAGAATAAACGCCAAGCG – 3'

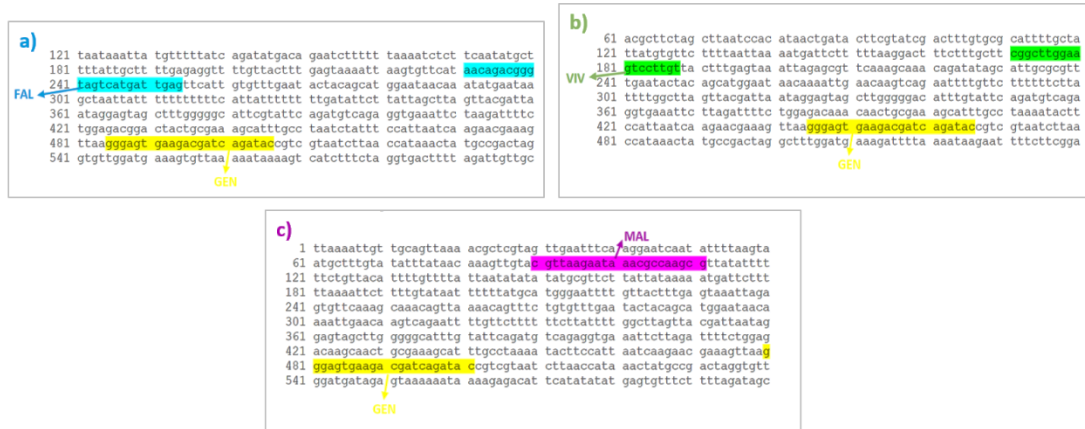


Figura II.2 Localização de cada um dos *primers*, utilizados na técnica de *multiplex* PCR, *reverse primer* (GEN) e *forward primer* (FAL, VIV e MAL), inseridos em seqüências das espécies respetivas. a) *P. falciparum* (ssurRNA; nº de acesso: AF145334); b) *P. vivax* (ssurRNA; nº de acesso: AF145335); c) *P. malariae* (ssurRNA; nº de acesso: AF145336).

II.3.2.1 Reação de *multiplex* PCR

A reação do *multiplex* PCR foi realizada num volume final de 25µl, contendo 1× HotStartTaq[®] DNA Polymerase (QIAGEN), 3mM de MgCl₂ (Promega Corporation), 400µM de cada dNTP (Promega Corporation), 0,6µM dos *primers* GEN e FAL, 0,7µM dos *primers* MAL, 0,3µM do *primer* VIV e 5µl de DNA. A amplificação foi efetuada num termociclador (Biometra T1 Temocicler, Alfacene[®]) segundo as condições da Tabela II.6.

Tabela II.6 Condições de amplificação utilizadas na técnica de *multiplex* PCR.

	Temperatura	Tempos	Nº de ciclos
Incubação inicial	95°C	15min.	1
Desnaturação	95°C	45seg.	
Hibridização	60°C	90seg.	43
Extensão	72°C	2min.	
Extensão final	72°C	5min.	1

II.3.3 LAMP

O LAMP é uma técnica de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos, ou seja, um método de amplificação que é realizado a uma temperatura constante. Nesta técnica é



utilizado um conjunto de seis *primers*, incluindo dois *primers* externos (F3 e B3), dois *primers* de *loop* (LF e LB) e dois *primers* internos (FIP e BIP). Esta técnica exige a utilização de três espaços diferentes: sala “limpa” para a preparação da mistura de reação (câmara de biosegurança – *Nuairé*[®] *biological safety cabinets*, Class II), sala “limpa” para o manuseamento do DNA e sala intermédia para manipulação do produto amplificado e detecção dos mesmos, por técnicas de eletroforese.

Neste trabalho, os *primers* utilizados no LAMP (Polley *et al.*, 2010) (Tabela II.7) amplificam uma sequência de uma região do genoma mitocondrial de *P. falciparum* (EMBL AJ276844) (Figura II.3), confirmados através do *software* PrimerExplorer V5 (*software* específico para *design* de *primers* de LAMP), e através de por alinhamento com sequência de *P. falciparum*, através do *software* Standard Nucleotide BLAST[®] (NCBI) (Figura II.3), sendo o protocolo baseado em Polley *et al.*, 2010, FIND, 2012 e Nunes, 2016.

Tabela II.7 Primers utilizados na técnica de LAMP.

Primers externos	F3	5' – GTATCTGATCGTCTTCACTCCC – 3'
	B3	5' – AACATTTTTTAGTCCCATGCTAA – 3'
Primers internos	FIP	5' – ACCCAGTATATTGATATTGCGTGACAGCCTTGCAATAAATAATATCTAGC – 3'
	BIP	5' – AACTCCAGGCGTTAACCTGTAATGATCTTTACGTTAAGGGC – 3'
Primers de loop	LF	5' – CGGTGTGTACAAGGCAACAA – 3'
	LB	5' – GTTGAGATGGAAACAGCCGG – 3'



Figura II.3 Localização de cada um dos *primers* (Polley *et al.*, 2010) utilizados na técnica de LAMP inseridos numa sequência de *P. falciparum* (estirpe NF54; n° de acesso: AJ276844). *Primers* externos – F3 e B3; *Primers* internos – FIP (F2 + F1c) e BIP (B2 + B1c); *Primers* de *loop* – LF e LB.



II.3.3.2 Reação LAMP

Baseado nos protocolos de reação de LAMP de Polley *et al.*, 2010, Nunes, 2016 e FIND, 2012, foram inicialmente testadas duas concentrações de MgSO₄ (8mM e 10mM), assim como duas temperaturas de amplificação (60°C e 65°C) por 40min., realizado para um volume final de 25μ, mantendo os restantes complementos da reação constantes. A reação final de LAMP foi realizada num volume final de 25μl, contendo 1× Isothermal Amplification buffer (New England, Biolabs®), 10mM de MgSO₄ (New England, Biolabs®), 1M de solução de betaína (Sigma®), 1,4mM de cada dNTP (Promega Corporation), 1,6μM de *primers* FIP e BIP, 0,2μM de *primers* F3 e B3, 0,4μM de *primers* LF e LB, 8U de Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase (New England, BioLabs®) e 1μl de DNA. A mistura de reação foi incubada num termociclador (Biometra T1 Temocicler, Alfagene®), podendo também ter sido realizada em banho-maria ou numa incubadora, por 40 min. a 65°C, seguido de 2 min. a 95°C (para inativação da enzima).

II.3.4 Multiplex PCR adaptado a LFD

Após a seleção da técnica *multiplex* PCR como a mais adequada para a plataforma pretendida, foi planeado e desenhado o esquema de interação *primer*-LFD, inspirado em procedimentos desta natureza previamente descritos na literatura, essencialmente adaptados à técnica LAMP (Moreira *et al.*, 2005; Costa, 2014; Yongkiettrakul *et al.*, 2014; Kamphée *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017a; Huang *et al.*, 2017b; lalle *et al.*, 2018)

Os *primers* (Padley *et al.*, 2003) foram marcados na terminação 5', pela Eurofins Genomics®, com marcadores específicos, de forma a interagirem com os recetores que se encontram na tira de LFD (HybriDetect 2T, Milena Biotec®): *primer* GEN marcado com FITC (GEN*), *primer* FAL marcado com digoxigenina (FAL*) e *primer* VIV marcado com biotina (VIV*) (Figura II.4).

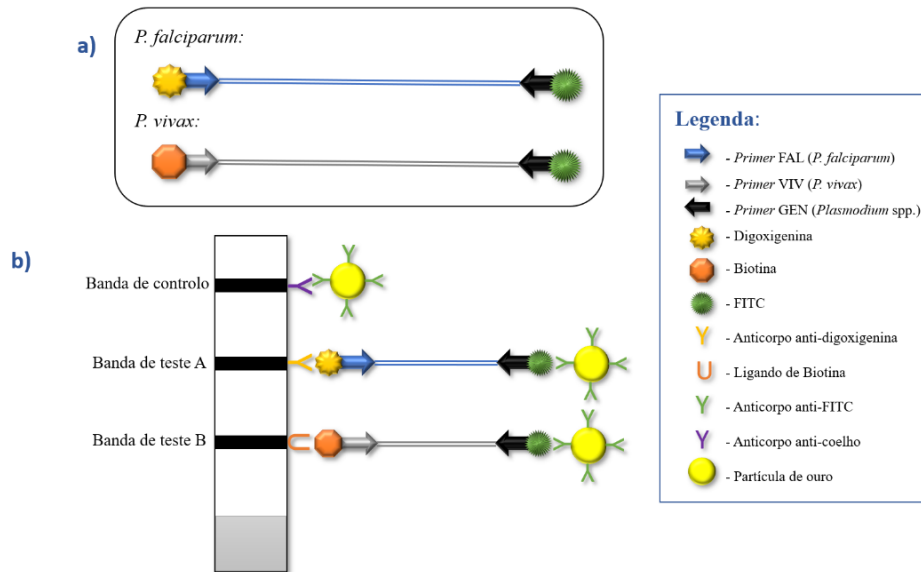


Figura II.4 Desenho dos *primers* com marcação e a deteção de produtos amplificados por LFD (HybriDetect 2T). Adaptado de Milena Biotec, 2010.

a) Amplificação DNA por *multiplex* PCR com *primers* marcados: *primer* GEN com FITC; *primer* FAL com digoxigenina e *primer* VIV com biotina;

b) Hibridação do produto amplificado com as tiras LFD (HybriDetect 2T, Milena Biotec[©]) e com as partículas de ouro.

Banda de teste A: o *primer* FAL marcado com digoxigenina e o *primer* GEN marcado com FITC ligam-se à sequência alvo (*P. falciparum*) para iniciar a amplificação. No processo de deteção dos produtos amplificados: o *primer* FAL-digoxigenina liga-se ao anticorpo anti-digoxigenina e o *primer* GEN-FITC forma um complexo com anticorpo anti-FITC conjugado a partícula de ouro. **Banda de teste B:** o *primer* VIV marcado com biotina e o *primer* GEN marcado com FITC ligam-se à sequência alvo (*P. vivax*) para iniciar a amplificação. No processo de deteção dos produtos amplificados: o *primer* VIV-biotina liga-se ao ligando de biotina e o *primer* GEN-FITC forma um complexo com anticorpo anti-FITC conjugado a partícula de ouro. **Banda de controlo:** O anticorpo anti-FITC conjugado com ouro é capturado pelo anticorpo anti-coelho. Caso não haja sinal na banda de controlo, os resultados são inválidos.

II.3.4.1 Otimização da reação *multiplex* PCR adaptado a LFD

Baseado no protocolo de reação do *multiplex* PCR de Padley *et al.*, 2003, foram testadas quatro concentrações para o *primer* GEN-FITC (1,2 μ M, 0,75 μ M, 0,6 μ M e 0,5 μ M), três concentrações de MgCl₂ (2mM, 3mM e 4mM), assim como sete temperaturas de hibridização (52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 61°C, 62°C) e diferentes combinações de pares de *primers* como representado na Tabela II.8 (FAL-GEN, FAL*-GEN, FAL-GEN*, FAL*-GEN*, VIV-GEN, VIV*-GEN, VIV-GEN* e VIV*-GEN*), tudo realizado num volume final de 25 μ l, e mantendo todos os restantes complementos da reação constantes.



Tabela II.8 Combinações de pares de *primers*, com cruzamento entre *primers* de *multiplex* PCR – LFD (marcados) e *multiplex* PCR (não marcados).

<i>Primers</i>	GEN	GEN-FITC
FAL	FAL-GEN	FAL-GEN*
FAL-digoxigenina	FAL*-GEN	FAL*-GEN*
VIV	VIV-GEN	VIV-GEN*
VIV-biotina	VIV*-GEN	VIV*-GEN*

II.4 Estudo do *Composto E*

II.4.1 Culturas

II.4.1.1 Preparação de hemácias

A partir de tubos

A partir do sangue doado coletado para tubos de 6mL, centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante por aspiração. Adicionou-se meio [meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) com Hepar (Sigma-Aldrich®)] ao sedimento de sangue de forma a perfazer um volume final de 14 mL. Ressuspendeu-se bem a mistura e seguiu-se para a centrifugação a 2500rpm durante 5 min. (com travão) e descartou-se o sobrenadante, repetindo-se de novo este processo. Em seguida, adicionou-se mais 14mL de meio ao sangue, centrifugou-se a 3800rpm por 5 min. (com travão) e descartou-se o sobrenadante, este processo repetiu-se mais duas vezes, para um total de três lavagens.

A partir de sacos

Os tubos dos sacos de sangue foram limpos com iodopovidona (Betadine®) e, em seguida, secos com papel absorvente. O corte dos tubos foi realizado com uma tesoura desinfetada (pelo bico de Bunsen) em condições de assépsia. O sangue foi transferido do saco para um tubo de 50mL. Centrifugou-se a 1000rpm por 20min e descartou-se o sobrenadante. O sangue foi transferido depois para tubos de 14mL e adicionou-se meio, de forma a perfazer os 14 mL. Centrifugou-se a 3800rpm por 5 min. (com travão) e descartou-se o sobrenadante, este processo repetiu-se mais duas vezes, para um total de três lavagens.

Em ambos os casos, para chegar a um hematócrito de 50%, adicionou-se ½ de volume final de sangue em meio de cultura e outro ½ em SAG (consultar II.4.1.2.2 - Preparação de SAG e SAG-M).



II.4.1.2 Mudança do meio de cultura

Inicialmente o meio de crescimento deve ser aquecido a 37°C em banho-maria.

Sem agitar o frasco, aspirou-se o meio de cultura antigo do frasco. Adicionou-se 98mL do novo meio de cultura e 2mL de SAG-M (consultar II.4.1.2.2 - Preparação de SAG e SAG-M). Ressuspendeu-se lentamente a cultura, com a tampa bem fechada. Incubação da cultura é colocado na incubadora (37°C, 10% CO₂), com a respectiva tampa ligeiramente desenroscada.

II.4.1.2.1 Preparação do meio de crescimento

A 500mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich[®]) adicionou-se: 5mL de L-Glutamina (SIGMA[®]) a 200mM, 5mL de D-Glucose (Sigma-Aldrich[®]) a 20mM, 600µL de antibiótico Sulfato de Gentamicina (Fisiopharma[®]) a 40mg/mL e 50mL de AlbuMAX[™] (ThermoFisher[®]) a 5% v/v.

II.4.1.2.2 Preparação SAG e SAG-M

Para 200mL de SAG, adicionou-se: 1,758g de NaCl (Sigma-Aldrich[®]), 1,636g de D-Glucose (Sigma-Aldrich[®]), 0,043g de hidrato de cloridrato de adenina (Sigma-Aldrich[®]) e 200mL de H₂O miliQ.

Para 200mL de SAG-M, adicionou-se: 1,758g de NaCl, 1,636g de D-Glicose (Sigma-Aldrich[®]), 0,043g de hidrato de cloridrato de adenina, 1,05g de D-Manitol (Sigma-Aldrich[®]) e 200mL de H₂O miliQ.

II.4.1.3 Esfregação e coloração das amostras

A partir de 1,5/2mL de cultura parasitada, centrifugou-se a 13000rpm por 1min. e descartou-se o sobrenadante. Após homogeneizar o *pellet*, adicionou-se uma gota de aproximadamente 2µL de amostra na lâmina e com outra lâmina arrastou-se a gota de forma a gerar uma camada fina, como representado na Figura II.4. Assim que o esfregação secou, iniciou-se o processo de fixação e coloração.

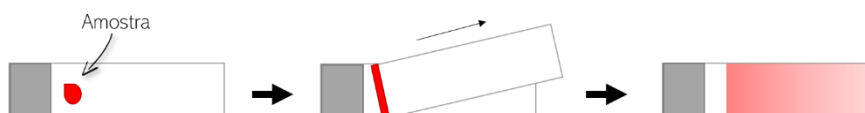


Figura II.5 Imagem exemplificativa de como fazer um esfregação.



A coloração do esfregaço (através do *kit* de coloração Diff-Quick[®], Medion Diagnostics) começa com a submersão da lâmina por 2seg. em metanol[®] [com 0.002g/L de *Fast Green* (Diff-Quick[®] Fix, Medion Diagnostics)] para fixar as células, seguido de 5seg. numa solução corante I [1,22g/L de Eosina Y em tampão fosfato de pH 6,6 e 0,1% p/v de azida sódica como conservante - Diff-Quick[®] I, Medion Diagnostics] para tingir as proteínas e, por fim, 1min. numa solução corante II [1,1g/L de tiazina (corante) em tampão fosfato de pH 6,6 - Diff-Quick[®] II, Medion Diagnostics] para tingir os cromossomas/núcleos. De seguida lavou-se a lâmina com água corrente e secou-se rapidamente ao ar. A observação do esfregaço foi realizada através de um microscópio ótico com lente 100x e utilizando óleo de imersão.

II.4.1.4 Separação de fases de desenvolvimento do parasita

Uma vez que o objetivo era a separação em fase de desenvolvimento de anéis e trofozoítos, em tubos de 14mL adicionou-se 3mL de 80% v/v percoll e, em seguida, 2mL de 40% percoll (gota a gota de forma a não misturar). Pode utilizar-se outras percentagens de percoll para separar outras fases de desenvolvimento do parasita ou pigmentos (consultar II.4.1.4.1 - Preparação de percoll).

As culturas foram transferidas dos frascos para tubos de 50mL e centrifugou-se a 2500rpm por 7min. a 37°C (sem travão). Descartou-se praticamente todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 9mL de volume total (incluindo *pellet*). Essa amostra final (9mL) foi adicionada (gota a gota) e centrifugou-se 3800rpm por 25min. a 37°C (sem travão). Após a centrifugação e estratificação dos constituintes da amostra por camadas, utilizou-se, para sincronização na fase de anéis, a última camada/fração de fundo (*bottom fraction*) gerada pela centrifugação. Enquanto que para sincronizar na fase de trofozoítos, usou-se a segunda camada (entre o percoll 80% e 40%) (Figura II.5).

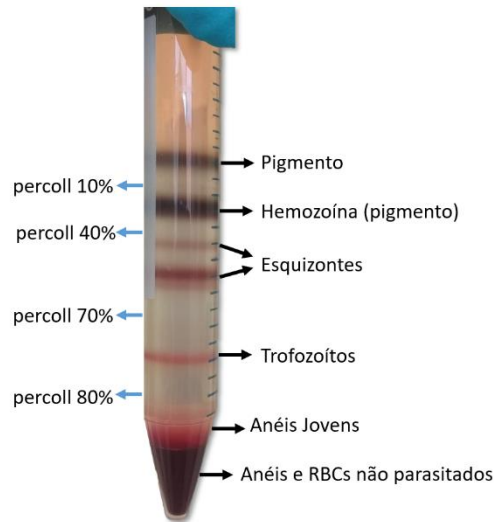


Figura II.6 Processo de sincronização de culturas. Separação por camadas, após centrifugação, das diferentes fases de desenvolvimento do parasita, utilizando percoll a 10%, 40%, 70% e 80%.

De acordo com a fase de desenvolvimento do parasita pretendida, aspirou-se tudo, exceto a camada correspondente à fase pretendida, e adicionou-se a amostra sincronizada num novo tubo de 50mL.

No novo tubo com a amostra sincronizada, adicionou-se meio, até perfazer os 50mL, e centrifugou-se a 2500rpm por 7min. a 37°C (sem travão). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se RBCs de acordo com a parasitemia desejada (consultar II.4.1.4.2 Definir parasitemia pós-sincronização). Em seguida, adicionou-se meio de crescimento até perfazer os 50mL e transferiu-se para um frasco. Já no frasco, adicionou-se 2mL SAG-M e meio de cultura até perfazer 100mL.

No final do processo fez-se um esfregaço para conferir o estado da cultura, e caso fosse a esperada, prosseguia-se para a incubação na incubadora (37°C, 10% CO₂).

II.4.1.4.1 Preparação de percoll

Percoll™ é uma ferramenta criada por Pertoft *et al.*, 1978, que permite a separação por densidades mais eficiente em bioquímica. É constituído por partículas de sílica coloidal de 15 - 30nm de diâmetro (23% p/v em água) revestidas com polivinilpirrolidona (PVP). Percoll™ é adequado para experiências de gradiente de densidade, pois possui baixa viscosidade e osmolaridade e ausência de toxicidade para as células (Pertoft *et al.*, 1978). O termo "percoll", neste trabalho, representa a mistura de Percoll™ (GE Healthcare®),



PBS (Sigma-Aldrich®), D-Manitol (Sigma-Aldrich®) e D-Glucose (Sigma-Aldrich®), preparada a diferentes concentrações, representada em Tabela II.9.

As soluções finais foram esterilizadas por filtração através de uma tampa/funil de esterilização com um filtro com poros de 0,2µm de diâmetro.

Tabela II.9 Preparação de percoll em diferentes concentrações (com percentagem em v/v).

%	Percoll™	PBS 10x	D-Manitol	D-Glucose	H ₂ O Milli-Q®	Total
10% percoll	20mL				180mL	
40% percoll	80mL	20mL	120g	0,36g	120mL	200mL
80% percoll	160mL				40mL	

II.4.1.4.2 Definir densidade parasitária pós-sincronização

Centrifugou-se a amostra sincronizada e descartou-se o sobrenadante, ficando com um volume final de 20µL.

Para uma densidade parasitária de 6,25% (informação apresentada na Tabela II.10), é necessário adicionar $20 + 40 + 80 + 160\mu\text{L} = 300\mu\text{L}$ de RBC (100% de hematócrito). No entanto, como o hematócrito utilizado se encontrava a 50%, foi adicionado 600µL. Adicionou-se 49mL de meio de crescimento e 1mL SAG-M. Este cálculo em que se considera a densidade parasitária inicial a 100% é apenas válido para trofozoítos e esquizontes. No caso dos anéis, a densidade parasitária inicial será inferior a 100%, uma vez que a fração selecionada, que corresponde sincronização em fase de anéis, inclui também RBCs não parasitados.

Tabela II.10 Cálculo da densidade parasitária final da amostra sincronizada (admitindo que esta tem um volume de 20µL).

RBCs	Densidade parasitémica
Ao adicionar 20µL de RBCs	50%
Ao adicionar 40µL de RBCs	25%
Ao adicionar 80µL de RBCs	12,5%
Ao adicionar 160µL de RBCs	6,25%



II.4.1.5 Congelamento de culturas

Para congelamento de uma cultura de sangue parasitado é necessário que os parasitas se encontrem em fase de anel e que possua uma densidade parasitária alta (>10%).

Transferiu-se a cultura do frasco para tubos de 50mL. De seguida centrifugou-se a 2000rpm por 10 min. e descartou-se o sobrenadante. Os *pellets* foram quantificados e unidos todos num único tubo. Adicionou-se 1/3 de glicerolite a 57% p/v (Sigma-Aldrich®) (gota a gota, em constante homogeneização) e deixou-se repousar 5 min. à temperatura ambiente. Adicionou-se 4/3 do volume total (*pellet* + 1/3 glicerolite 57% p/v) (gota a gota, em constante homogeneização). O volume total foi distribuído em criotubos de 2mL. Armazenou-se a -80°C.

II.4.1.6 Descongelamento de culturas

Os criotubos foram descongelados rapidamente com as mãos e quantificado o seu volume. Depois de transferido para um tubo de 50mL, adicionou-se 0,2mL de NaCl a 12% p/v, multiplicando pelo volume total (ml) de cultura descongelada (gota a gota, em constante homogeneização). Em seguida, adicionou-se 2mL de NaCl a 1,6% p/v multiplicando pelo volume total (ml) de cultura descongelada (gota a gota, em constante homogeneização). Centrifugou-se a 2500rpm por 6min. a 30°C (sem travão) e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 50mL de meio (lentamente, com agitação suave). Centrifugou-se novamente a 2500rpm por 6min. a 30°C e descartou-se o sobrenadante. O sangue parasitado foi quantificado e adicionou-se 30mL de meio de crescimento. Em seguida, adicionou-se em RBC, com hematócrito a 50%, metade do volume equivalente ao volume do sangue parasitado. Transferiu-se para um frasco e retirou-se 1mL da cultura para fazer um esfregaço e ver o estado dos parasitas. Estando os parasitas viáveis, colocou-se o frasco na incubadora (37°C, 10% CO₂).

II.4.1.7 Descartar sangue parasitado

Ao descartar o sangue parasitado/cultura é necessário inativar qualquer parasita que possa estar vivo, adicionando hipoclorito de sódio (lixívia).

II.4.2 Experiência com *Composto E*

Uma cultura de *P. falciparum* sincronizada em fase de anéis, de aproximadamente 100mL, foi dividida por três frascos, marcados com 2, 0,2 e CN, em quantidades iguais, sendo adicionado 50mL de meio de cultura e 1mL de SAG. Em dois tubos de 50mL,



marcados com 2 e 0,2, foi adicionado, de forma a perfazer 500 μ L, *Composto E* (33mM) diluído em NaOH (1M) (Sigma-Aldrich[®]), previamente preparado com H₂O estéril, em proporção de 1:16,5 e 1:165 de modo a obter o *Composto E* em concentrações de 2mM e 0,2mM, respetivamente. Num terceiro tubo, marcado com CN (controlo negativo), foi adicionado somente 500 μ L de NaOH. Em cada um destes tubos foi adicionado 3mL de meio. Depois de bem homogeneizado, esta solução foi adicionada aos respetivos frascos com cultura de *P. falciparum*, atingindo a concentração desejada de *Composto E* de 2 μ M, 0,2 μ M e 0 μ M nas culturas de teste 2, 0,2 e CN, respetivamente.

Após 16 horas de incubação, realizou-se o cálculo da densidade parasitária, por Microscopia Ótica, e a separação da cultura por fase de anéis e trofozoítos e quantificada a quantidade de sangue, em volume (Tabela II.11) e em número de células (RBCs) no final do processo.

Tabela II.11 Quantificação do volume das amostras sincronizadas, em fase de anéis e de trofozoítos.

	Anéis	Trofozoítos
Controlo negativo	600 μ L	157 μ L
<i>Composto E</i> [0,2μM]	550 μ L	120 μ L
<i>Composto E</i> [2μM]	550 μ L	66 μ L

Utilizou-se PBS para perfazer o volume necessário para o procedimento seguinte: 50 μ L nas amostras de trofozoítos e 1mL nas amostras de anéis.

II.4.2.1 Contagem de células (RBCs) por mL

Recolheu-se uma alíquota de 10 μ L, de cada uma das amostras, e diluiu-se em PBS até se obter uma concentração razoável de RBCs para contagem [<10 RBCs por quadrado (0,0025m²) do hemocitómetro], num total de 1:15 nas amostras sincronizadas em fase de trofozoítos e de 1:900 nas amostras sincronizadas em fase de anéis. Adicionou-se 10 μ l de cada uma das amostras diluídas no hemocitómetro para contagem de RBCs (Tabela II.12) e procedeu-se ao cálculo de número de RBCs por mL.



Tabela II.12 Fatores de diluição aplicados às amostras sincronizadas, em fase de anéis e em fase de trofozoítos, até ao momento de contagem das células.

	Anéis	Trofozoítos
Controlo negativo	1:2.403	1:19,8
<i>Composto E</i> [0,2µM]	1:2.538	1:21,3
<i>Composto E</i> [2µM]	1:2.538	1:26,4

II.4.2.2 Extração da hemozoína

O processo de extração de hemozoína engloba duas fases: uma fase inicial de lise das membranas, dos RBCs e do parasita, através de vários ciclos de lavagem com centrifugação que permite a eliminação de todos os componentes e compostos presentes nas amostras exceto a β -hematina/hemozoína, e uma segunda fase de solubilização da hemozoína, de forma a dissolvê-la, da sua forma cristalizada, em *heme*, que é o que será medido logo após.

Adicionou-se 1mL de PBS (10mM) ao volume total das amostras de trofozoítos e a 200µL de amostras de anéis. Estas soluções foram mantidas em gelo por 5min. Realizou-se centrifugação a 15000rpm, por 3min. a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se novamente 1mL de PBS (10mM). Realizou-se nova centrifugação a 15000 rpm, por 1 min. a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Os últimos dois passos foram repetidos vezes suficientes até à lavagem total da hemozoína, que correspondeu a duas vezes para as amostras de trofozoítos e quatro vezes para as amostras de anéis. No final, foi adicionado 200µL e 500µL de NaOH-EDTA-Triton X100 [(0,1M) NaOH, 3mM EDTA (Sigma-Aldrich®), 0,05% p/v Triton X100 (Sigma-Aldrich®)] nas amostras sincronizadas em fase de trofozoítos e de anéis, respetivamente. Para a preparação de Triton-X100, devido à viscosidade ser muito elevada, o método de medição foi o peso e não o volume: fez-se uma aproximação de 1g para 1mL (precisamente é 1.07g/mL).

No caso da suspensão direta das amostras sincronizadas em fase de anéis (não lisados, que não foram sujeitos a lise das membranas), foram adicionados 2µL de amostra em 1mL de NaOH-EDTA-Triton X100.

As amostras pós-extração sofreram um arrefecimento a 4°C por 3h, sendo depois armazenadas a -20°C até serem utilizadas.



II.4.2.3 Quantificação da hemozoína

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e procedeu-se à quantificação da hemozoína pela técnica de luminescência. O luminómetro utilizado, Sirius, *single tube luminometer*, Berthold[®], é um luminómetro de amostra única altamente sensível e compacto, projetado especificamente para a deteção de luminescência analítica aprimorada por luminol. A quantificação de hemozoína é medida em unidades de luz relativa por segundo (*Relative Light Units per second*) ou RLU/s.

O luminómetro foi ligado cerca de 30 min. antes de iniciar uma medição e preparou-se as soluções necessárias ao seu funcionamento. Adicionou-se, num primeiro tubo 50mL dessa solução e num segundo tubo 50µL de solução de hidroperóxido de terc-butilo (TBH) (Sigma-Aldrich[®]) ou 14µL de Luminol (Sigma-Aldrich[®]) a 3,5mg/mL

As diluições necessárias para uma leitura correta da luminescência foram feitas com NaOH-EDTA-Triton X100, tendo atingido 1:200 para as amostras sincronizadas em fase de anéis, 1:1000 para as amostras sincronizadas em fase de trofozoítos e 1:500 para as amostras de anéis (sem lavagem). A amostra utilizada como branco foi a solução de NaOH-EDTA-Triton X100 e foram realizados vários testes a esta amostra para obtenção do cálculo da média dos “brancos” (1). Foi utilizado 1µL de cada amostra para a leitura. O cálculo da quantidade de hemozoína foi realizado segundo (2).

$$\text{Média dos "brancos": } \frac{45396 + 40314 + 37209 + 39566 + 39799}{5} \cong 32395 \text{ RLU/s} \quad (1)$$

$$\text{Cálculo da quantidade de hemozoína: } \frac{(\text{Média brancos}) \times \text{fator de diluição}}{\text{RBC/mL}} \quad (2)$$



III. Resultados



III.1 Técnica de extração de DNA

A seleção da técnica de extração de DNA mais adequada, para a conceção de um diagnóstico rápido, foi realizada através da comparação de duas técnicas diferentes: o método de três fases e o método de duas fases. As técnicas foram realizadas por diversas vezes com diferentes amostras e analisadas segundo o valor de densidade parasitária e pelo valor de quantificação do DNA.

Os valores de densidade parasitária mantêm uma relação relativamente proporcional em relação à quantificação de DNA em todas as amostras e são idênticos entre os dois métodos, sendo que os valores de quantificação variam entre 75ng/μL e 119ng/μL de DNA. Os níveis de pureza foram, em todos os casos, considerados normais (com valores de rácio OD260/OD280 aproximados a 1,8). No final, através do método de três fases o DNA extraído fica eluído em tampão TE e no método de duas fases o DNA extraído fica eluído em água estéril. Relativamente ao tempo laboral, o método de três fases exige um total de cerca de 5h40min a 6h dividido por dois dias, enquanto que o método de duas fases necessita no máximo de apenas 2h30min.

III.2 Técnica de deteção de produtos amplificados

O apuramento da técnica de deteção de produtos amplificados mais adequada (mais rápida e prática) para a obtenção dos resultados neste projeto foi realizada através da comparação de duas técnicas de eletroforese diferentes: eletroforese em gel de agarose e eletroforese por capilaridade (QIAxcel, QIAGEN®). Cada uma das técnicas foi testada e analisada segundo a resolução de imagem e a rapidez das técnicas. O tempo de realização da eletroforese em gel de agarose pode variar entre 30 min a 1h, não incluído o tempo de captação e recolha de imagens, enquanto que a eletroforese por capilaridade demora exatamente 12 min por cada fila de amostras (12 amostras), sendo que a imagem é automaticamente e imediatamente disponibilizada. Quanto à resolução de imagem, a imagem obtida por eletroforese por capilaridade (QIAxcel, QIAGEN®) (Figura III.1 b)) é muito mais nítida do que a imagem obtida por eletroforese em gel de agarose (Figura III.1 a)).

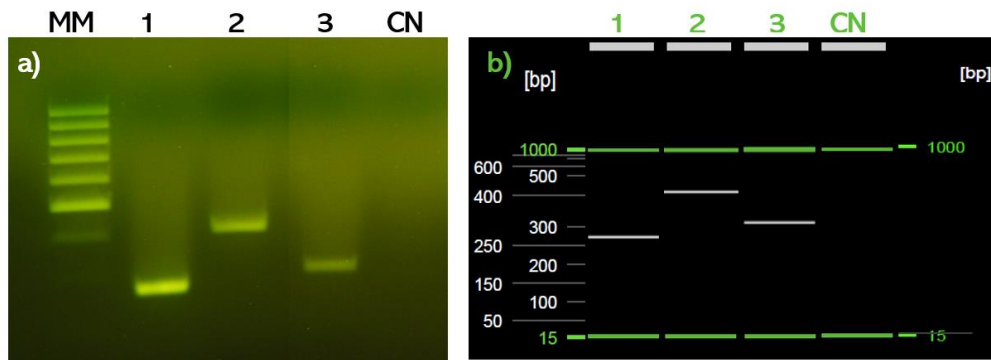


Figura III.1 Comparação de técnicas de detecção de produtos amplificados (pela técnica *multiplex* PCR).

Legenda: 1- *P. falciparum* (banda de ~280pb); 2- *P. malariae* (banda de ~412pb); 3- *P. vivax* (banda de ~300pb); CN- Controlo negativo; MM- Marcador molecular (1kb).

a) Eletroforese em gel de agarose. Imagens obtidas através de câmara fotográfica PowerShot G5 (Canon) e *software* ZoomBrowse Ex (Canon).

b) Eletroforese por capilaridade. Imagens obtidas através de *software* QIAxcel ScreenGel (QIAGEN®).

III.3 Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos

III.3.1 *Nested* PCR

Os testes de sensibilidade foram realizados para as três espécies diferentes disponíveis (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*), enquanto que os testes de especificidade foram apenas realizados para as espécies visadas como objetivo final deste projeto (*P. falciparum* e *P. vivax*).

A especificidade da amplificação das sequências alvo respetivas a cada uma das espécies é comprovada pelo tamanho das bandas após a eletroforese (Figura III.2), de 205pb em *P. falciparum*, 120pb em *P. vivax* e 144pb em *P. malariae*.

A capacidade mínima de detecção por parte desta técnica, segundo o protocolo baseado em Snounou *et al.*, 1993 e Snounou *et al.*, 1999, foi de 0,001ng/μL de DNA de *P. falciparum* (Figura III.2 a)), 0,01ng/μL de DNA de *P. vivax* (Figura III.2 b)) e de 0,09ng/μL de DNA de *P. malariae* (Figura III.2 c)).

Nos testes de especificidade observou-se que não houve qualquer amplificação inespecífica (Figura III.2. d)).

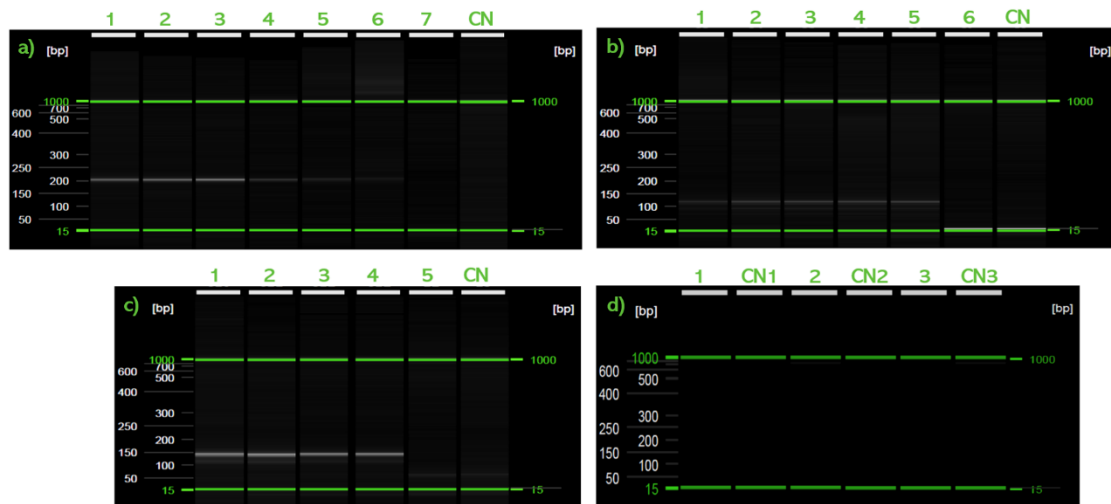


Figura III.2 Sensibilidade da técnica *nested* PCR. Imagens obtidas através de *software* QIAxcel ScreenGel (QIAGEN®).

a) Teste de sensibilidade: produtos da amplificação de DNA de *P. falciparum* (banda de ~205pb). **Legenda:** 1- 112ng; 2- 11,2ng/μL; 3- 1,1ng/μL; 4- 0,1ng/μL; 5- 0,01ng/μL; 6- 0,001ng/μL; 7- 0,0001ng/μL; 8- 0,00001ng/μL; CN- Controlo negativo.

b) Teste de sensibilidade: produtos da amplificação de DNA de *P. vivax* (banda de ~120pb). **Legenda:** 1- 103ng/μL; 2- 10,3ng/μL; 3- 1,03ng/μL; 4- 0,01ng/μL; 5- 0,001ng/μL; 6- 0,0001ng/μL; CN- Controlo negativo.

c) Teste de sensibilidade: produtos da amplificação de DNA de *P. malariae* (banda de ~144pb). **Legenda:** 1- 89ng/μL; 2- 8,9ng/μL; 3- 0,9ng/μL; 4- 0,09ng/μL; 5- 0,01ng/μL; CN- Controlo negativo.

d) Teste de especificidade. **Legenda:** 1- DNA de *P. vivax* com *primers* para *P. falciparum*; CN1- Controlo negativo com *primers* para *P. falciparum*; 2- DNA de *P. falciparum* com *primers* para *P. vivax*; CN2- Controlo negativo com *primers* para *P. vivax*; 2- DNA de *P. falciparum* com *primers* para *P. malariae*; CN2- Controlo negativo com *primers* para *P. malariae*.

III.3.2 Multiplex PCR

Os testes de sensibilidade de *multiplex* PCR foram realizados para as três espécies diferentes disponíveis (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*).

A especificidade da amplificação das sequências alvo respetivas a cada uma das espécies é comprovada pelo tamanho das bandas após a eletroforese (Figura III.3), de 280pb em *P. falciparum*, 300pb em *P. vivax* e 412pb em *P. malariae*.

A capacidade mínima de deteção por parte desta técnica, segundo o protocolo baseado em Padley *et al.*, 2003, foi de 0,0006ng/μL de DNA de *P. falciparum* (Figura III.3 a)), 5,2ng/μL de DNA de *P. vivax* (Figura III.3 b)) e de 44,5ng/μL de DNA de *P. malariae* (Figura III.3 c)).



Para esta técnica em questão, não é necessário a realização de reações para teste de especificidade, uma vez que sendo um *multiplex* PCR os *primers* relativos às diferentes espécies já se encontram na mesma reação. Desta forma pode-se afirmar que esta técnica é completamente específica.

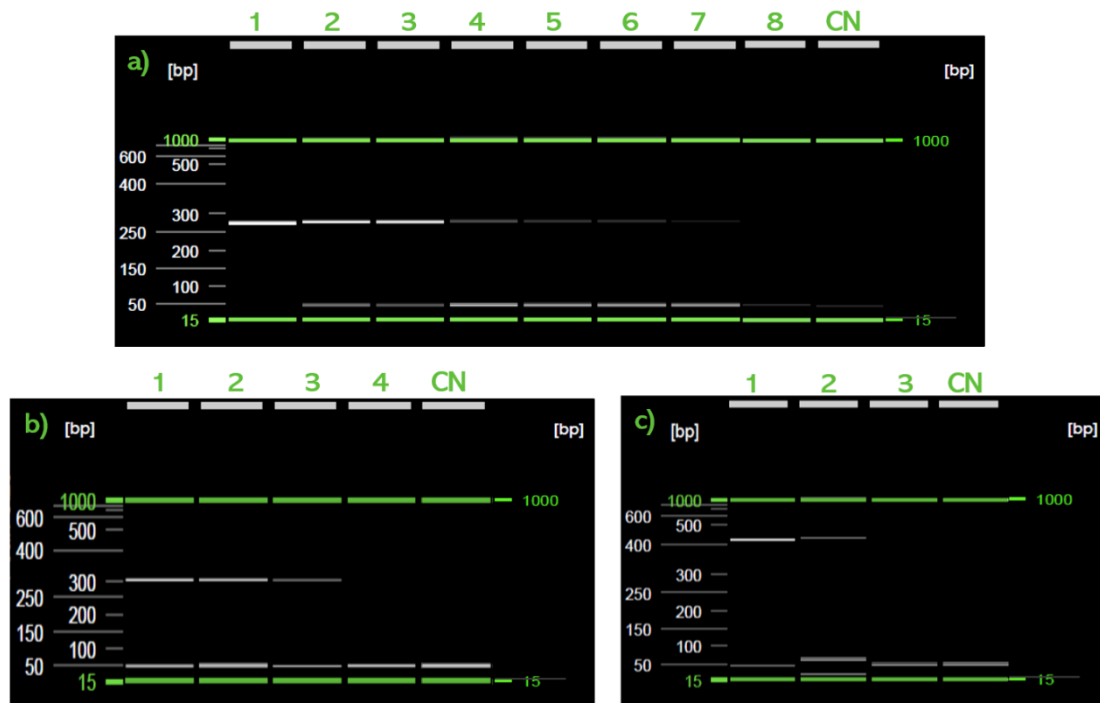


Figura III.3 Sensibilidade da técnica *multiplex* PCR. Imagens obtidas através de *software* QIAxcel ScreenGel (QIAGEN[®]).

a) Produtos da amplificação de DNA de *P. falciparum* (banda de ~280pb). **Legenda:** 1- 560ng; 2- 56,0ng/μL; 3- 5,6ng/μL; 4- 0,6ng/μL; 5- 0,06ng/μL; 6- 0,006ng/μL; 7- 0,0006ng/μL; 8- 0,00006ng/μL; CN- Controlo negativo.

b) Produtos da amplificação de DNA de *P. vivax* (banda de ~300pb). **Legenda:** 1- 515ng/μL; 2- 51,5ng/μL; 3- 5,2ng/μL; 4- 0,5ng/μL; CN- Controlo negativo.

c) Produtos da amplificação de DNA de *P. malariae* (banda de ~412pb). **Legenda:** 1- 445ng/μL; 2- 44,5ng/μL; 3- 4,5ng/μL; CN- Controlo negativo.

III.3.3 LAMP

O protocolo da reação LAMP foi apenas adaptado para a amplificação de *P. falciparum*, tendo os testes de especificidade da técnica realizados com DNA de *P. vivax*.

Dado o tipo de amplificação em *loop*, os produtos amplificados por esta reação evidenciam um padrão sequenciado de bandas de múltiplos tamanhos, característico da técnica LAMP, como exemplificado nas amostras 1 – 3 da Figura III.4 a). As amostras 4 - 7 da Figura III.4 a), apesar de apresentarem produtos amplificados, o padrão de bandas não é linear com o padrão esperado. Desta forma, considera-se o valor mínimo de deteção



desta técnica, com protocolo baseado em Polley *et al.*, 2010, Nunes, 2016 e FIND, 2012, como 1,1ng/ μ L de DNA de *P. falciparum* (Figura III.4 a)).

No teste de especificidade (Figura III.4 b)), através da utilização de DNA de *P. vivax*, não se deu qualquer amplificação inespecífica.

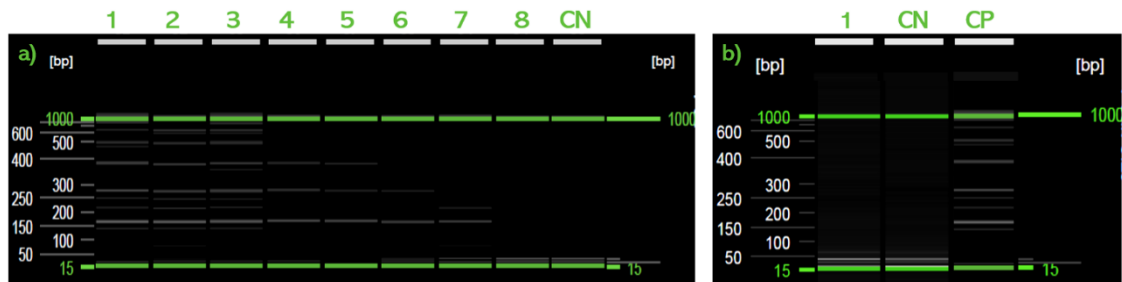


Figura III.4 Sensibilidade e especificidade da técnica LAMP. Imagens obtidas através de *software* QIAxcel ScreenGel (QIAGEN[®]).

a) Teste de sensibilidade: produtos da amplificação de DNA de *P. falciparum*. **Legenda:** 1- 112ng/ μ L; 2- 11,2ng/ μ L; 3- 1,1ng/ μ L; 4- 0,1ng/ μ L; 5- 0,01ng/ μ L; 6- 0,001ng/ μ L; 7- 0,0001ng/ μ L; 8 – 0,00001ng/ μ L; CN- Controlo negativo.

b) Teste de especificidade. **Legenda:** 1- DNA de *P. vivax*; CN- Controlo negativo; CP- Controlo positivo (DNA de *P. falciparum*).

Os resultados deveriam, teoricamente, ser analisados através de análise estatística, de forma a avaliar quantitativamente a relação entre o resultado das técnicas moleculares: *multiplex* PCR e LAMP, com a técnica de diagnóstico molecular considerada padrão (neste caso): *nested* PCR. No entanto, como demonstrado anteriormente, alguns resultados de técnicas a testar (*multiplex* PCR para *P. falciparum*) superaram de forma positiva, com maior sensibilidade, os resultados da, até então, técnica de diagnóstico molecular padrão (*nested* PCR para *P. falciparum*). Desta forma, tornou-se infundado realizar a análise estatística, e por tal, os resultados foram analisados por comparação da direta da sensibilidade das técnicas, através dos seus valores de concentração de DNA mínimos amplificáveis pelas mesmas, como apresentado na Tabela III.1.



Tabela III.1 Sumário dos resultados de sensibilidade das técnicas *nested* PCR, *multiplex* PCR e LAMP, em relação à concentração de DNA e densidade parasitária. Legenda: NT - Não testado.

	<i>Nested</i> PCR		<i>Multiplex</i> PCR		LAMP	
	Concentração de DNA	Densidade parasitária	Concentração de DNA	Densidade parasitária	Concentração de DNA	Densidade parasitária
<i>P. falciparum</i>	0,001ng/μL	0,25par./μL	0,0006ng/μL	0,025par./μL	1,1ng/μL	252,9par./μL
<i>P. vivax</i>	0,01ng/μL	0,34par./μL	5,2ng/μL	34par./μL	NT	NT
<i>P. malariae</i>	0,1ng/μL	3,26par./μL	44,5ng/μL	326,4par./μL	NT	NT

III.4 *Multiplex* PCR adaptado a LFD

A técnica *multiplex* PCR, selecionada como a mais adequada para a plataforma pretendida, foi testada de acordo com o protocolo otimizado, segundo Padley *et al.*, 2003, após o desenho do esquema de diagnóstico e a marcação dos *primers* com marcadores específicos na terminação 5': *primer* GEN marcado com FITC (GEN*), *primer* FAL marcado com digoxigenina (FAL*) e *primer* VIV marcado com biotina (VIV*) (representado na Figura II.4, em II.3.4 *Multiplex* PCR adaptado a LFD).

Quando testada a técnica de *multiplex* PCR com o conjunto de *primers* marcados pela primeira vez não ocorreu amplificação quer para *P. falciparum*, quer para *P. vivax* (Figura III.5 a)). Testou-se também o funcionamento da tira de LFD (HybriDetect 2T, Milenia Biotec®) de acordo com as instruções do fabricante (Milenia Biotec®, 2010), observando-se coloração apenas das bandas de teste (Figura III.5 b)).

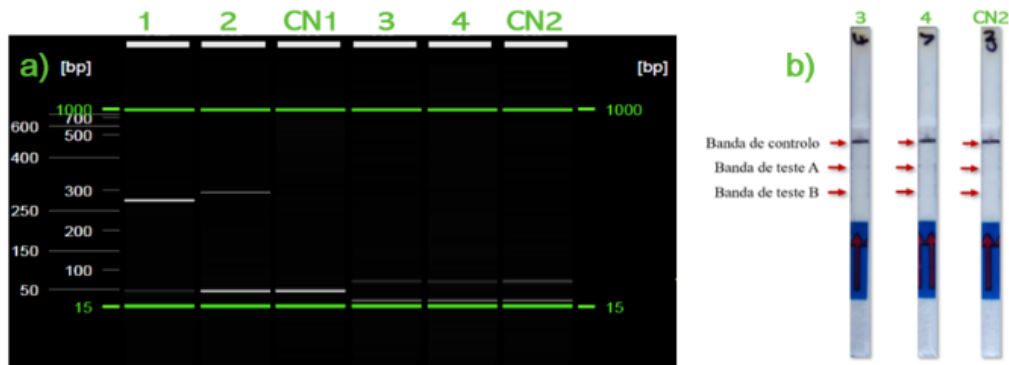


Figura III.5 Produto final da reação por *multiplex* PCR – LFD, segundo o protocolo inicial de *multiplex* PCR. Combinações dos *primers* na Tabela II.8. (em II.2.4.1 Otimização da reação *multiplex* PCR com *primers* marcados).

a) Detecção do produto final da amplificação por eletroforese. Imagens obtidas através de *software* QIAxcel ScreenGel (QIAGEN®); b) Detecção do produto final da amplificação por tiras LFD (HybriDetect 2T, Milenia Biotec®).

Legenda: Combinação de *primers* GEN-FAL/VIV: 1- *P. falciparum*, 2- *P. vivax*, CN1- Controlo negativo; Combinação de *primers* GEN*-FAL*/VIV*: 3- *P. falciparum*, 4- *P. vivax*, CN2- Controlo negativo.

De forma a otimizar a técnica e a perceber com detalhe a influência da marcação dos *primers* na amplificação, foram testadas as possíveis combinações de *primers* marcados e não-marcados. Ocorreu amplificação, tanto em *P. falciparum* como em *P. vivax*, nas combinações com *primers* não-marcados (com bandas intensas) e nas combinações FAL-digoxigenina com GEN e VIV-biotina com GEN (com bandas de menor intensidade) (Figura III.6). Verificou-se que não ocorreu amplificação em todas as reações que envolviam o *primer* GEN-FITC.

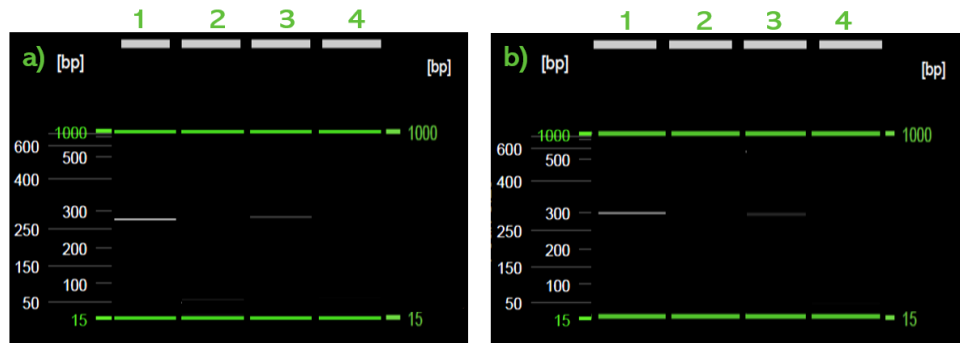


Figura III.6 Teste dos *primers* de *multiplex* PCR – LFD, segundo o protocolo inicial de *multiplex* PCR. Combinações dos *primers* na Tabela II.8. (em II.2.4.1 Otimização da reação *multiplex* PCR com *primers* marcados). Imagens obtidas através de *software* QIAXcel ScreenGel (QIAGEN®).

- a) Testado com DNA de *P. falciparum*. **Legenda:** 1- Combinação de *primers* GEN-FAL; 2- Combinação de *primers* GEN*-FAL; 3- Combinação de *primers* GEN-FAL*; 4- Combinação de *primers* GEN*-FAL*;
- b) Testado com DNA de *P. vivax*. **Legenda:** 1- Combinação de *primers* GEN-VIV; 2- Combinação de *primers* GEN*-VIV; 3- Combinação de *primers* GEN-VIV*; 4- Combinação de *primers* GEN*-VIV*.

Foram testadas, individualmente, várias condições de amplificação, utilizando DNA molde de *P. falciparum*: diferentes temperaturas de hibridização (52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 61°C, 62°C) (Figura III.7 a.1) e a.2)), diferentes concentrações (1,2µM, 0,75µM, 0,6µM e 0,5µM) (Figura III.7 b)), assim como diferentes concentrações de MgCl₂ (2mM, 3mM e 4mM) (Figura III.7 c)), mantendo os restantes componentes da reação constantes.

O padrão de bandas repete-se ao longo de quase todos os testes, com amplificação para as reações com combinações com *primers* não-marcados e combinações FAL-digoxigenina com GEN. As exceções, com resultados negativos, correspondem às amostras dos testes de temperatura de hibridização a 54°C e 58°C com combinação FAL-digoxigenina com GEN (amostra 7 e 15 da Figura III.7 a.1)), sem qualquer razão aparente, e às amostras dos testes de concentração de MgCl₂ a 2mM em todas as combinações de *primers* testadas (amostra 1 e 3 da Figura III.7 c)), tratando-se provavelmente de um limite mínimo de MgCl₂ ultrapassado.

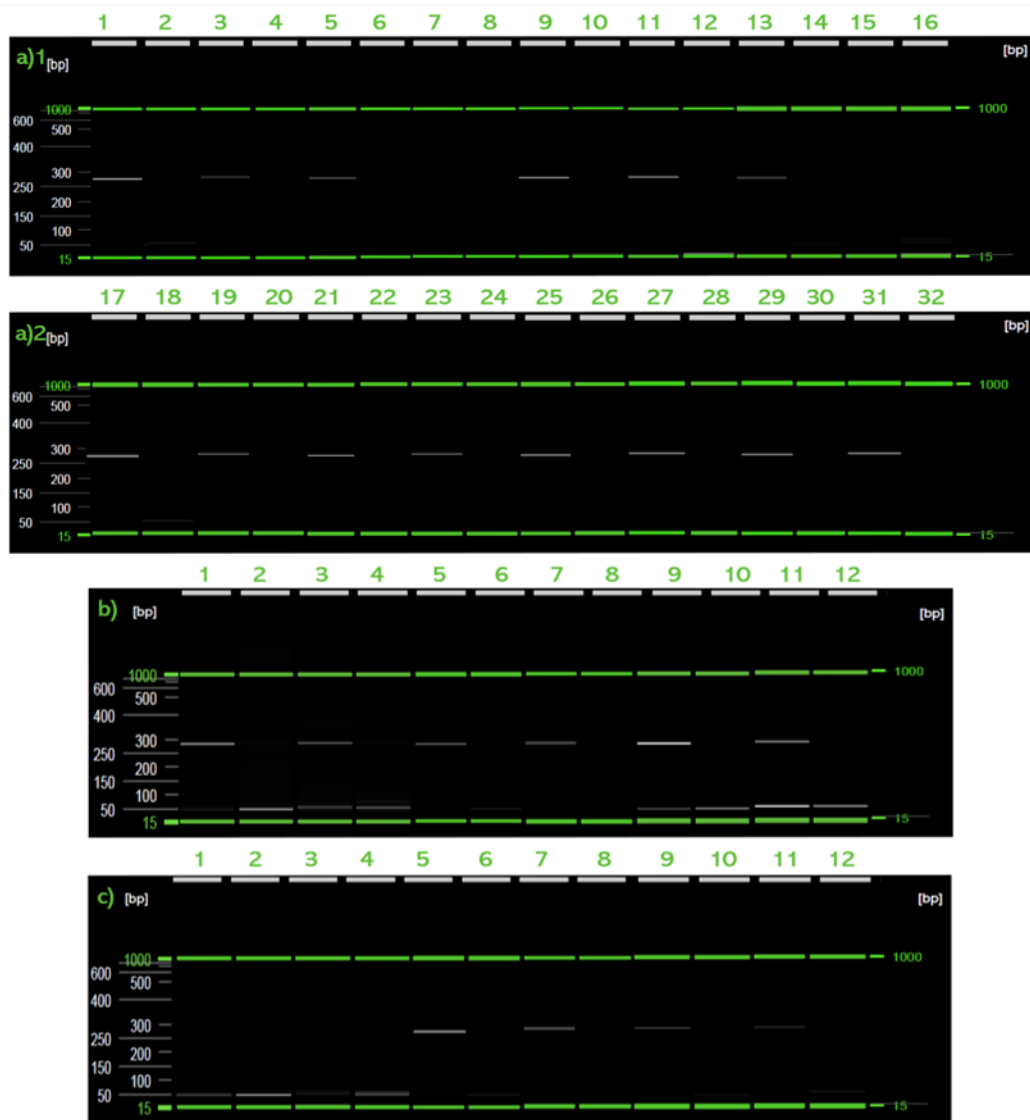


Figura III.7 Otimização da reação *multiplex* PCR - LFD. Combinações dos *primers* na Tabela II.8. (em II.2.4.1 Otimização da reação *multiplex* PCR com *primers* marcados). Imagens obtidas através de *software* QIAXcel ScreenGel (QIAGEN®).

a.1) a.2) Em relação à temperatura de hibridização, testado com DNA de *P. falciparum*.

Legenda:

Combinação de *primers* GEN-FAL: 1- 52°C; 5- 54°C; 9- 56°C; 13- 58°C; 17- 60°C; 21- 61°C; 25- 62°C; 29- 64°C;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL: 2- 52°C; 6- 54°C; 10- 56°C; 14- 58°C; 18- 60°C; 22- 61°C; 26- 62°C; 30- 64°C;
 Combinação de *primers* GEN-FAL*: 3- 52°C; 7- 54°C; 11- 56°C; 15- 58°C; 19- 60°C; 23- 61°C; 27- 62°C; 31- 64°C;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL*: 4- 52°C; 8- 54°C; 12- 56°C; 16- 58°C; 20- 60°C; 24- 61°C; 28- 62°C; 32- 64°C;

b) Em relação à concentração de *primer* GEN e GEN-FITC, testado com DNA de *P. falciparum*.

Legenda:

Combinação de *primers* GEN-FAL: 1- 0,5µM; 5- 0,6µM; 9- 0,7µM;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL: 2- 0,5µM; 6- 0,6µM; 10- 0,7µM;
 Combinação de *primers* GEN-FAL*: 3- 0,5µM; 7- 0,6µM; 11- 0,7µM;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL*: 4- 0,5µM; 8- 0,6µM; 12- 0,7µM.

c) Em relação à concentração de MgCl₂, testado com DNA de *P. falciparum*.

Legenda:

Combinação de *primers* GEN-FAL: 1- 2mM; 5- 3mM; 9- 4mM;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL: 2- 2mM; 6- 3mM; 10- 4mM;
 Combinação de *primers* GEN-FAL*: 3- 2mM; 7- 3mM; 11- 4mM;
 Combinação de *primers* GEN*-FAL*: 4- 2mM; 8- 3mM; 12- 4mM.



III.5 Composto E

A densidade parasitária foi calculada para a cultura antes de ser aplicado o *Composto E* (Cultura inicial) e, após o período de incubação de 16h, para as culturas onde foi aplicado o *Composto E* (*Composto E* [0,2 μ M] e *Composto E* [2 μ M]) e o controlo negativo (Figura III.8 e III.9). De modo geral a parasitemia diminuiu após a incubação de 16h, sendo a densidade parasitária da cultura inicial de 6,6%, a do controlo negativo de 5,58%, a da cultura sujeita ao *Composto E* a 0,2 μ M de 5,33% e a da cultura sujeita ao *Composto E* a 2 μ M de 4,35%, ou seja, a diminuição da densidade parasitária é crescente com o aumento da concentração de *Composto E*. Mais especificamente, tendo em consideração a diminuição da parasitemia do controlo negativo de 11% em comparação com a cultura inicial (e descontando esse valor), ocorreu 8% de morte na cultura sujeita ao *Composto E* a 0,2 μ M e de 23% na cultura sujeita ao *Composto E* a 2 μ M. É também observável um atraso no desenvolvimento na cultura sujeita à *Composto E* a 0,2 μ M, em que possui um percentagem de anéis (de 0,80%) muito superior às restantes culturas (de 0,12% no controlo negativo e 0,08% na cultura sujeita ao *Composto E* a 0,2 μ M) (Figura III.8 e III.9).

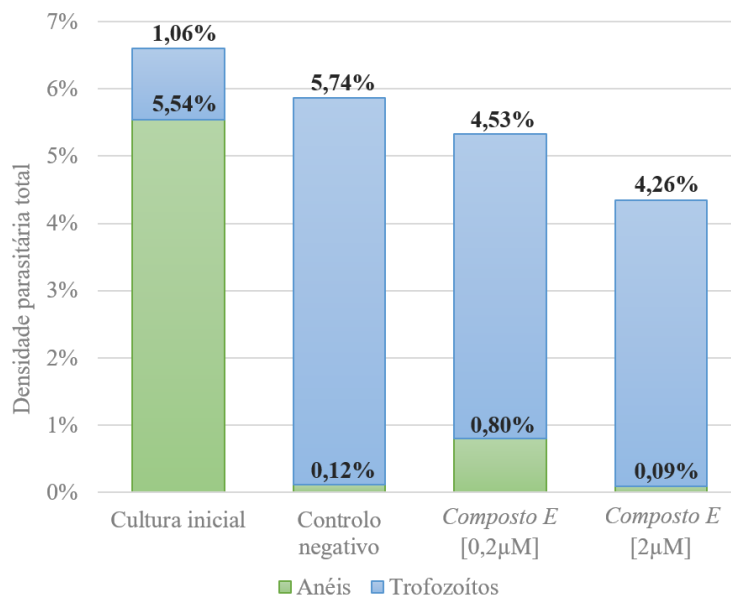


Figura III.8 Densidade parasitária antes (cultura inicial) e após a aplicação do *Composto E* (controlo negativo, *Composto E* [0,2 μ] e *Composto E* [2 μ]).

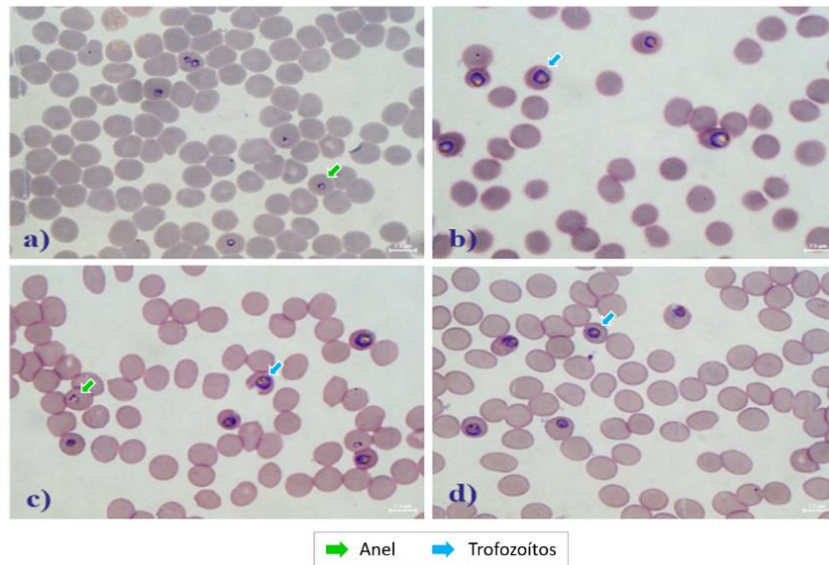


Figura III.9 Imagem obtida através de microscópio óptico com uma lente de 100x. a) Antes da aplicação do *Composto E*; b) Controlo Negativo; c) *Composto E* [0,2 μ M] e d) *Composto E* [2 μ M].

Após a separação em fase de desenvolvimento de anéis e trofozoítos, realizou-se a contagem das células (RBCs) por unidade de volume (mL) (Figura III.10). Como seria de esperar, tendo em conta que, apesar de a densidade parasitária antes da separação ser muito superior em trofozoítos do que em anéis, a camada de onde são retirados os anéis (*bottom fraction*) após a separação inclui também os RBCs não parasitados e, desse modo, os “anéis separados” têm valores muito superiores à dos trofozoítos.

Em comparação dos valores das amostras separadas em fase de anéis, é possível comprovar que os valores da cultura sujeita ao *Composto E* [0,2 μ M] apresentam-se como os mais elevados, seguindo-se da cultura sujeita ao *Composto E* [2 μ M] e por fim, com os valores mais baixos, o controlo negativo. Relativamente aos valores das amostras separadas em fase de trofozoítos, é possível verificar que os valores da cultura sujeita ao *Composto E* [2 μ M] apresentam-se como os mais baixos, seguindo-se do controlo negativo e da cultura sujeita ao *Composto E* [0,2 μ M], com valores semelhantes (Figura III.10).

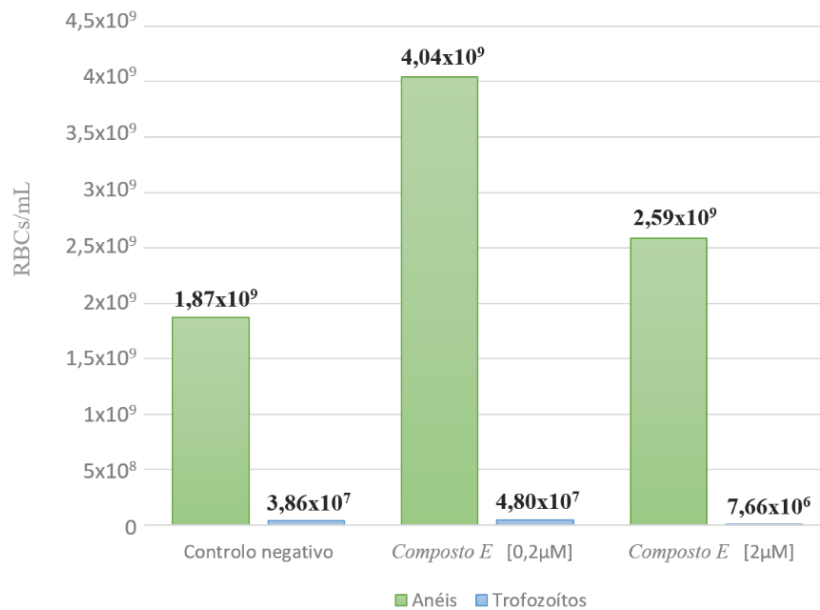


Figura III.10 Contagem do número de células (RBCs) por unidade de volume, em amostras sincronizadas em fase de anéis e em fase de trofozoítos, após a aplicação do *Composto E*.

Posteriormente à extração da hemozoína e da dissolução da sua estrutura cristalizada em *heme*, foi realizada a quantificação da *heme* (hemozoína não cristalizada) através de um luminímetro. Os resultados finais da quantificação da hemozoína (considerando todas as diluições ao longo de todo o processo), são apresentados em medida de unidade de RLU (tendo a unidade de tempo, segundos, como subentendida).

Os resultados obtidos através do luminímetro são fornecidos em formato de quantidade de hemozoína (RLU) por μL , no entanto foi também calculada a quantidade de hemozoína (RLU) por RBCs. Na relação da quantidade de hemozoína por unidade de volume, o que está a ser analisado é a quantidade de hemozoína existente, na mesma quantidade de volume quer para as amostras sincronizadas em fase de anéis quer nas amostras sincronizadas em fase de trofozoítos, independentemente do número de células. Enquanto que a análise realizada em relação à quantidade de hemozoína por RBCs, nas amostras sincronizadas em fase de anéis, os valores observados não são unicamente representativos dos RBCs infetados por anéis uma vez que a parcela correspondente a esta sincronização inclui também os RBCs não parasitados, e, portanto, o valor é menor do que o valor real. Desse modo, através da análise do gráfico que faz essa relação (Figura III.11 b)), é verificável que em amostras sincronizadas em fase de anéis a quantidade de hemozoína é



sempre muito inferior à quantidade apresentada em amostras sincronizadas em fase de trofozoítos.

Considerando a quantidade de hemozoína por unidade de volume (Figura III.11 a)) é possível observar que, tanto nas amostras sincronizadas em fase de anéis, como em fase de trofozoítos, quanto maior a concentração de *Composto E* aplicada, menor a quantidade de hemozoína. Relativamente às amostras sincronizadas em fase de anéis que não sofreram lise, os resultados são totalmente discrepantes dos restantes valores quando analisada a quantidade de hemozoína por unidade de volume, sendo esta tanto maior quanto maior a concentração de *Composto E* aplicada.

Quando considerada a quantidade de hemozoína por RBC (Figura III.11 b)), é observável, nas amostras sincronizadas em fase de trofozoítos, uma diminuição da quantidade de hemozoína nas amostras sujeitas a uma concentração de $0,2\mu\text{M}$ de *Composto E*, em relação ao controlo negativo, e o aumento da quantidade de hemozoína nas amostras sujeitas a uma concentração de $2\mu\text{M}$ de *Composto E*. Nas amostras sincronizadas em fase de anéis, quer as que sofreram lise quer as que não sofreram, ocorreu uma diminuição da quantidade de hemozoína em todas as amostras sujeitas ao *Composto E*, sendo, no entanto, as amostras sujeitas a uma concentração de $0,2\mu\text{M}$ de *Composto E* as que possuem os valores mais baixos.

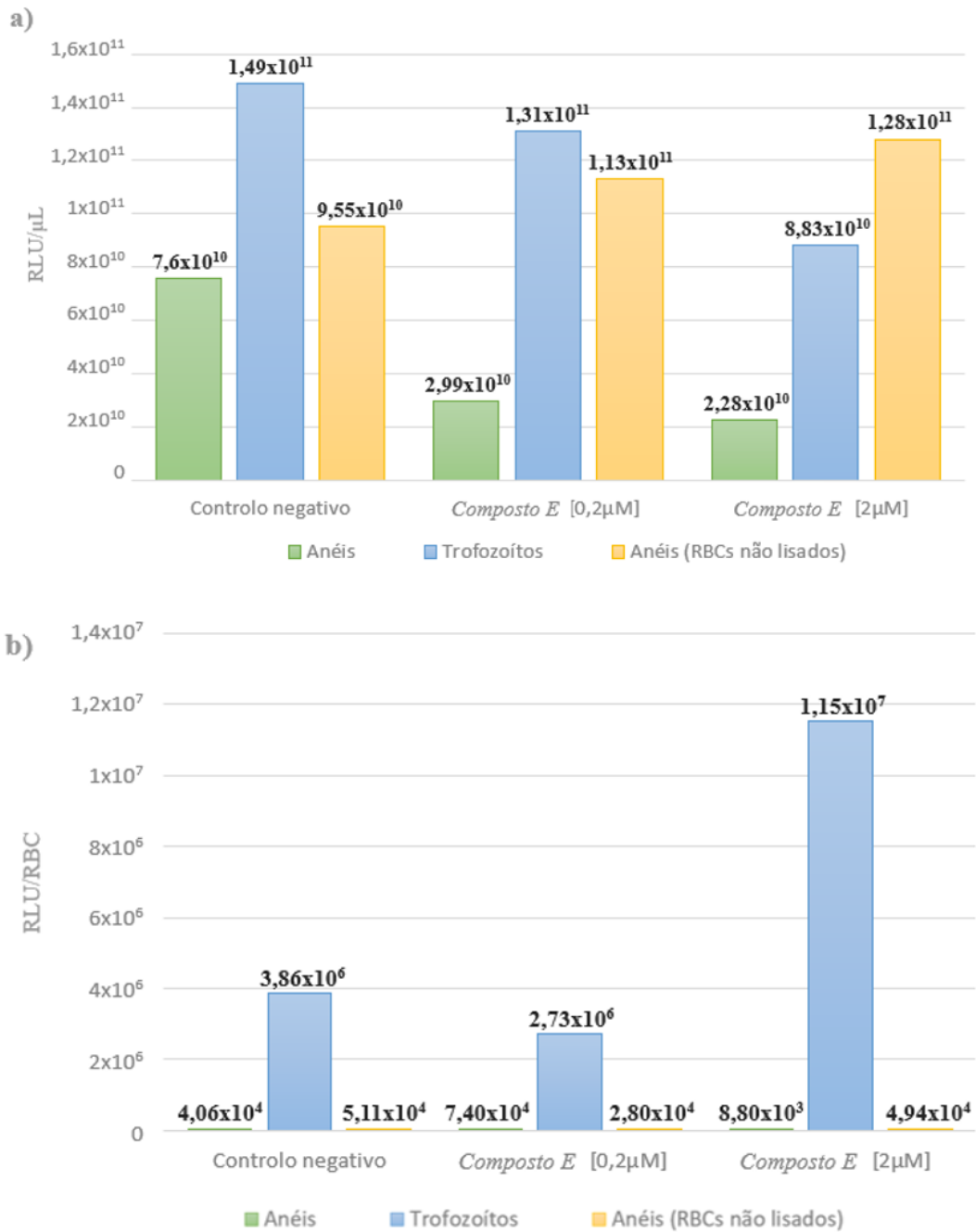


Figura III.11 Quantificação da hemozoína, pós-lavagem, em relação a amostras sincronizadas em fase de anéis, em fase de trofozoítos e em fase de anéis (RBCs não lisados).

a) Gráfico representativo da quantidade de hemozoína por unidade de volume (μ L); b) Gráfico representativo da quantidade de hemozoína por quantidade de células (RBCs).



IV. Discussão



Tendo em conta o objetivo deste projeto, optou-se pela utilização de técnicas de diagnóstico baseadas na amplificação de ácidos nucleicos (DNA). Estas, para além de possuírem valores de sensibilidade e especificidade bastante vantajosos, permitem a deteção de uma grande variedade de alvos moleculares diferentes, de importantes características de diagnóstico, devido à sua grande capacidade de diferenciação entre variâncias mínimas entre sequências de ácidos nucleicos, podendo estes variar apenas em alguns SNPs (Snounou *et al.*, 1993a; Snounou *et al.*, 1999; Moody *et al.*, 2000; Snounou & Singh, 2002).

Plataforma de diagnóstico

A seleção da técnica de extração de DNA mais adequada, para a conceção de um diagnóstico rápido, foi realizada através da comparação de duas técnicas de extração de DNA diferentes: ambas utilizando uma resina (Chelex-100), uma com um passo de precipitação adicional - método de três fases (Plowe *et al.*, 1995) ou outra sem precipitação - método de duas fases (WWARN, 2015). Estas foram analisadas segundo o valor de densidade parasitária pelo valor de quantificação do DNA.

Para além do tempo, sendo o método de duas fases bem mais célere, outra grande diferença entre os métodos é a solução em que o DNA fica eluído após o processo de extração, sendo que no método de três fases o DNA fica eluído em tampão TE e no método de duas fases o DNA fica eluído em água estéril. Para preservação a longo prazo de DNA a melhor solução são tampões alcalinos, como é o caso do tampão TE com pH 8, uma vez que o EDTA é um quelante de metal com capacidade de inibir nucleases (como DNAses), e, por tal, a degradação do DNA, através da ligação e inacessibilidade do Mg^{2+} , normalmente necessário à atividade dessas enzimas (Yagi *et al.*, 1996, Song *et al.*, 2003). Desta forma, e uma vez que as amostras de DNA de outras espécies de *Plasmodium*, para além de *P. falciparum*, não são de fácil obtenção, as amostras de DNA (dos indivíduos infetados) de *P. vivax* e *P. malariae* foram extraídas segundo o método adaptado de Plowe *et al.*, 1995, pois é importante a sua preservação a longo prazo, não só para este como para outros projetos em que sejam necessárias. No entanto, em termos práticos para diagnóstico, é perfeitamente razoável e prudente a utilização método adaptado de WWARN, 2015, uma vez que preservação a longo prazo é prescindível e, portanto, este é mais vantajoso por ser um procedimento mais rápido.



A eleição da técnica de detecção de produtos amplificados mais adequada (mais rápida e prática) para a obtenção dos resultados neste projeto foi realizada através da comparação de duas técnicas de eletroforese diferentes: eletroforese em gel de agarose e eletroforese por capilaridade (QIAxcel, QIAGEN[®]). As técnicas foram avaliadas segundo a qualidade de imagem e o tempo de realização do protocolo. A eletroforese em gel de agarose é mais demorada, mais trabalhosa (devido à preparação e manuseamento do gel) e a imagem é menos definida. Desta forma optou-se pela eletroforese por capilaridade (QIAxcel, QIAGEN[®]), tendo esta ainda a vantagem de as imagens serem automaticamente e imediatamente disponibilizadas após o processo de eletroforese.

Os protocolos e *primers* de cada uma das técnicas de amplificação de DNA foram selecionados de acordo com os resultados obtidos na literatura e relevância ao nível do diagnóstico de malária. As técnicas em estudo foram o *nested* PCR, *multiplex* PCR e LAMP, tendo sido foram otimizadas e analisadas em termos de sensibilidade, especificidade, tempo de execução, simplicidade de aplicação, inovação metodológica e custo.

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos foram adaptadas para a identificação de três das cinco espécies de malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (sendo que não se encontraram disponíveis amostras das restantes espécies). A exceção disso foi a técnica LAMP, que apesar de se encontrem protocolos/*primers* descritos na literatura para detecção de *P. falciparum*, do género *Plasmodium* (*pan-Plasmodium*) e de *P. vivax* (Polley *et al.*, 2010; FIND, 2012; Singh *et al.*, 2013; Najafabadi *et al.*, 2014; Dinzouna-Boutamba *et al.*, 2014), sendo algo experimental, optou-se por se iniciar somente com *P. falciparum*.

Nas amostras de DNA de *P. falciparum* em concentrações de 0,1ng/μL – 0,0001ng/μL, existe amplificação de produtos cujo o padrão de bandas se encontra incompleto (com uma ou mais bandas em falta) em relação ao padrão de bandas esperado. Este episódio poderá dever-se ao facto de a técnica, mesmo tendo capacidade de amplificar essas amostras, ir perdendo a sensibilidade à medida que a concentração de DNA transpõe um certo limite mínimo, neste caso de 1,1ng/μL. Tendo em conta o modo de atuação dos *primers* durante o processo de amplificação, em que primeiramente amplificam fragmentos mais pequenos que, ao longo dos ciclos, vão servindo de base para a amplificação de fragmentos de tamanhos superiores (de forma sucessiva), terminando com o perfil de



fragmentos de diferentes tamanhos (característico de LAMP), é possível compreender que, uma amostra ao ter menor concentração de DNA, a quantidade de fragmentos pequenos amplificados não será tão substancial e, conseqüentemente, não haverá tantos fragmentos base para a amplificação de fragmentos maiores. A amplificação dos fragmentos de tamanho superior poderá ocorrer na mesma, mas em tão pouca concentração que a banda, gerada em eletroforese, seja imperceptível. Esta hipótese é justificada pelo perfil de bandas das amostras de concentração inferior à sensibilidade da técnica, em que as bandas de tamanhos superiores vão deixando de existir de forma proporcional à diminuição da concentração de DNA. Este acontecimento poderá, possivelmente, ser otimizado, através de variação de algumas condições de realização técnica, como variando concentrações de $MgSO_4$, temperatura de amplificação ou, até mesmo, substituição dos reagentes por equivalentes de outras marcas (Wang *et al.*, 2015).

Apesar da sensibilidade da técnica LAMP neste estudo ser razoável ao nível de diagnóstico, em relação aos resultados obtidos em Polley *et al.*, 2010 (referência base para o protocolo e *primers* de LAMP), que correspondem a uma detecção mínima de $0,01ng/\mu L$, os resultados obtidos neste estudo (sensibilidade até $1,1ng/\mu L$ de DNA) ficam um pouco aquém do esperado. No entanto, nesse estudo não está especificado se o padrão de bandas é constante ao longo de todas as amostras amplificadas, em especial nas de menor concentração, uma vez que os resultados foram somente observados através da turbidez da amostra pós-amplificação. Dado que, neste projeto não foi tido em consideração este método de observação de resultados, por não ter sido considerado o método mais confiável, os resultados não são comparáveis.

A técnica com maior sensibilidade para *P. falciparum* foi o *multiplex* PCR (detecção de até $0,0006ng/\mu L$), seguindo-se de *nested* PCR (detecção de até $0,001ng/\mu L$) e LAMP (detecção de até $1,1ng/\mu L$). No caso de *P. vivax* e *P. malariae*, a técnica mais sensível foi *nested* PCR, com capacidade de detecção de até $0,01ng/\mu L$ e $0,1ng/\mu L$ em *P. vivax* e *P. malariae*, respetivamente; seguido de *multiplex* PCR, com capacidade de detecção de até $5,2ng/\mu L$ e $44,5ng/\mu L$ em *P. vivax* e *P. malariae*, respetivamente.

No que se refere a especificidade, nenhuma das técnicas apresentou ampliações inespecíficas quando testadas com DNA de espécies diferentes às espécies alvo dos *primers*. Relativamente à técnica LAMP, em diversos estudos (Wang *et al.*, 2015; Nunes, 2016) foi documentado a existência de ampliações inespecíficas nos controlos



negativos (que continham água em vez de DNA), sendo isto explicado pela presença de dímeros criados pelos *primers*, uma vez que existem pelo menos seis *primers* em reação, no entanto neste estudo não ocorreu qualquer amplificação inespecífica quer no controlo negativo, quer quando testado a especificidade através da utilização de DNA de *P. vivax*.

O tempo de execução é bastante díspar entre as diferentes técnicas, sendo que o processo completo da técnica, desde preparação das misturas de reação até à obtenção do produto final amplificado, demora cerca de 7h em *nested* PCR, cerca de 3h30min. em *multiplex* PCR e somente 1h em LAMP.

O LAMP, ainda que seja a técnica mais célere e económica, é a técnica que apresentou menor sensibilidade. Apesar de o *nested* PCR apresentar valores de sensibilidade elevados para todas as espécies estudadas, sendo o mais sensível na deteção de *P. vivax* e *P. malariae*, este é também o mais moroso, pois exige a realização de duas reações de amplificação, tornando-se também uma técnica mais dispendiosa, não indo, portanto, de encontro ao pretendido neste trabalho. Desta forma, devido a ser a técnica mais sensível relativamente a *P. falciparum*, de permitir a deteção de múltiplos alvos em simultâneo (Padley *et al.*, 2003), o que facilita o diagnóstico e economiza reagentes, e sendo uma técnica bem estabelecida que poderá facilmente ser adaptada para a deteção de novos alvos moleculares importantes na caracterização do diagnóstico, o *multiplex* PCR foi a técnica selecionada para a continuação deste estudo e adaptação a LFD.

Após a seleção da técnica, elaborou-se o desenho do esquema de diagnóstico e a marcação dos *primers* com marcadores específicos baseado em referências na literatura (Moreira *et al.*, 2005; Costa, 2014; Yongkiettrakul *et al.*, 2014; Kamphee *et al.*, 2015; Kamphee *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Kongkasuriyachai *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017a; Huang *et al.*, 2017b; lalle *et al.*, 2018;). A técnica *multiplex* PCR adaptada a LFD foi testada, revelando resultados negativos de amplificação nas amostras cuja mistura de reação envolvesse o *primer* GEN-FITC. Tendo isso em consideração, procedeu-se à tentativa de otimização da técnica através da “ativação” do *primer* em questão, através da variação da temperatura de hibridização, concentração do *primer* GEN-FITC e concentração de MgCl₂. No entanto, nenhuma dessas tentativas se observou positiva quanto à amplificação de amostras quando utilizado o *primer* GEN-FITC.

A(s) causa(s) desta ocorrência, não chegaram, deste modo, a ser esclarecidas, no entanto irá continuar-se a trabalhar com a finalidade de alcançar uma resolução para este



problema. Esta situação pode dever-se a várias possibilidades e poderão ser realizadas mais ações de modo a tentar otimização da técnica: poderá ter ocorrido um defeito na produção do *primer* GEN-FITC, devendo realizar-se uma nova encomenda do *primer* GEN-FITC; deverão ser realizados também novos testes, com variações de temperatura de hibridização, concentração do *primer* GEN-FITC e concentração de MgCl₂ já testadas, mas em conjugação de todos os diferentes fatores; poderá também realizar-se testes com variações de outros fatores, como a concentração de Taq polimerase, que pode estar a ser insuficiente ou em excesso (inibindo a amplificação); e, por último, a hipótese de o fluorocromo FITC estar de algum modo a impedir a correta hibridização do *primer* à sequência alvo por estar demasiado próximo da sequência de nucleótidos do *primer*, sendo, deste modo, importante reavaliar o local onde é adicionado FITC ao *primer*, talvez através da adição de um par de nucleótidos (como guaninas ou citosinas) ao *primer* na posição 5', local onde se iria adicionar o fluorocromo, dando assim mais espaço para o *primer* hibridizar corretamente com a sequência alvo.

Estudo do *Composto E*

De um modo geral, houve uma diminuição da densidade parasitária após as 16h de incubação, sendo esta mais acentuada quanto maior a concentração de *Composto E* administrada nas culturas, atribuindo a ideia de que o *Composto E* contribui para a morte dos parasitas. Foi notável, devido a uma maior percentagem de anéis em relação às culturas noutras condições, um ligeiro atraso na maturação da fase de anéis para a de trofozoítos na cultura submetida a uma concentração de 0,2μM de *Composto E*, que se especula indicar que, dentro das concentrações testadas, esta deverá ser a concentração mais indicada para retardar a atividade natural do desenvolvimento do parasita.

Aquando da quantificação de hemozoína, é possível verificar que, tal como esperado, as amostras sincronizadas em fase de trofozoítos, independentemente da concentração de *Composto E*, possuem valores mais elevados de hemozoína, em relação às amostras sincronizadas em fase de anéis. Isto acontece essencialmente por dois motivos: em geral, devido a ser na fase de trofozoítos que ocorre maioritariamente a processo de degradação da hemoglobina pelo parasita, que origina a hemozoína; e, em especial na relação quantidade de hemozoína por RBC, dado que a quantidade de hemozoína total está a ser subtraída pela quantidade total de RBCs, que, no caso das amostras sincronizadas em fase



de anéis, por consequência do método de extração utilizado, não engloba somente RBCs infetados, mas sim também RBCs não parasitados, e, portanto, o valor obtido é inferior ao valor real.

Verifica-se, em todas as amostras que sofreram lise, quando considerada a quantidade de hemozoína por unidade de volume, a diminuição da quantidade de hemozoína com o aumento da concentração de *Composto E* aplicado.

Os resultados das amostras sincronizadas em fase de anéis que não sofreram lise, quando analisada a quantidade de hemozoína por unidade de volume, são discrepantes dos restantes valores sendo estes tanto maiores quanto maior a concentração de *Composto E* aplicado. No entanto, o resultado esperado seria de quantidades semelhantes entre as várias amostras que não sofreram lise, uma vez que, ao contrário do que acontece com as amostras que sofreram extração de hemozoína, com passo de lise e de dissolução em *heme* (hemozoína não cristalizada), em que apenas se encontra disponível para medição, o *heme* que advém da hemozoína, as amostras que não sofreram extração da hemozoína têm disponível para quantificação todo o *heme* original do parasita e todo o *heme* resultante da dissolução da hemozoína. Isto ocorre porque o método de quantificação de *heme* (hemozoína não cristalizada), aqui aplicado, não discrimina se este se encontra de forma livre ou agarrado às membranas. Este resultado inesperado pode dever-se ao facto de, uma vez que estas amostras não sofreram o processo de extração da hemozoína, mais concretamente o passo de lavagem, poderão ter existido artefactos que influenciem a leitura pelo luminómetro.

Quando considerada a relação de quantidade de hemozoína por RBC, é observável, nas amostras em fase de anéis, a diminuição da quantidade de hemozoína em todas as amostras sujeitas ao *Composto E*, com valores mais baixos na concentração 0,2 μ M. No caso das amostras em fase de trofozoítos, ocorre também uma diminuição da quantidade de hemozoína nas amostras sujeitas a 0,2 μ M de *Composto E*. Considerando a hipótese da interferência do *Composto E* na cristalização do *heme* em β -hematina/hemozoína (Dell'Agli *et al.*, 2003), esta menor quantidade de hemozoína nas amostras sujeitas a 0,2 μ M de *Composto E*, poderá indicar que esta será, dentro das concentrações testadas, a concentração mais eficaz ao nível do efeito antimalárico.

O notório aumento da quantidade de hemozoína nas amostras sincronizadas em fase de trofozoítos e sujeitas a 2 μ M de *Composto E* poderá, entre outras hipóteses, estar



relacionado com o número de RBCs calculado nesta amostra ser efetivamente muito reduzido e, portanto, ter algum erro associado, sendo que, nesta experiência, o valor mais confiável para a quantificação de hemozoína deverá ser o valor que se refere ao volume de suspensão de células (RLU/mL).

Em função disso, e de forma a ser válida a nível estatístico, é essencial a otimização dos diferentes procedimentos realizados, repetição da experiência e o teste de outras concentrações do *Composto E*, para que se possa realizar um estudo mais completo sobre este composto e a compreender todo o seu potencial e aplicabilidade como tratamento de malária.



V. Conclusões e Considerações

Finais



Este estudo foi realizado de modo a contribuir para os três aspetos-chave no controlo da malária: diagnóstico rápido, tratamento precoce e a escolha adequada do tratamento antimalárico (WHO, 2018a).

Plataforma de diagnóstico

Todas as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos apresentaram-se como específicas e em geral, todas as técnicas apresentaram valores de sensibilidade muito favoráveis ao nível do diagnóstico, sendo que a técnica mais sensível ao nível da identificação de *P. falciparum* foi o *multiplex* PCR e quanto ao nível da identificação de *P. vivax* e *P. malariae* foi o *nested* PCR.

O LAMP apresentou uma sensibilidade inferior à expectável, no entanto, sendo esta uma técnica com grande valor e potencial ao nível do diagnóstico, quer pela sua rápida reação, quer por ser a técnica mais económica (ao não necessitar de termociclador para a fase de amplificação), e por tal, esta deverá continuar a ser otimizada no futuro, de forma a potencializar a sua sensibilidade.

A técnica selecionada para a adaptação a LFD foi *multiplex* PCR, essencialmente pela sua elevada sensibilidade a *P. falciparum*, pela capacidade de deteção de múltiplas sequência alvo em simultâneo e pelo facto de ser uma técnica bem estabelecida, o que facilita a adaptação para a deteção de novos alvos moleculares importantes para o perfil de caracterização do diagnóstico (Padley *et al.*, 2003). Os resultados de *multiplex* PCR - LFD revelaram a incapacidade de amplificação aquando a utilização de um dos *primers* marcados (*primer* GEN – FITC) mesmo após variadas tentativas de otimização. No entanto, existem mais hipóteses de possíveis testes de otimização, que deverão ser tidas em conta no futuro, de forma a tornar este projeto de diagnóstico operacional e útil ao nível do diagnóstico.

Como perspectivas futuras, o presente projeto de diagnóstico, usado para identificar as duas espécies de *Plasmodium* mais comuns e perigosas (*P. falciparum* e *P. vivax*), pode ainda ser útil na identificação das restantes três espécies de *Plasmodium* infetantes de humanos: *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No entanto, esta plataforma tem mais potencial para além da deteção e identificação de espécies de *Plasmodium*. Existe a oportunidade de tentar desenvolver este projeto de diagnóstico para a deteção e



identificação de alvos moleculares específicos relacionados com características que podem influenciar o tratamento.

Este género de diagnóstico teria de ser correlacionado com (ou ter como base) a espécie de *Plasmodium* infetante. Em casos de infeção por *P. falciparum*, seria interessante realizar um estudo para a identificação de marcadores moleculares associados a fatores relacionados com a severidade da doença, indicadores da possibilidade de desenvolvimento de malária grave, possivelmente utilizando como alvo os genes *var*, em especial o *pfemp1*, uma vez que a proteína PfEMP1, codificada por este gene, é responsável por uma parte das propriedades adesivas dos eritrócitos infetados, mediando a citoadesão a várias moléculas nas células hospedeiras e o sequestro de parasitas em tecidos, incluindo o cérebro (provocando malária cerebral) (Marchiafava & Bignami, 1894; Jensen *et al.*, 2004; Flick & Chen, 2004; Kyriacou *et al.*, 2006; Rottmann *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2009; Lavstsen *et al.*, 2012; Bartoloni & Zammarchi, 2012; Bull & Abdi, 2016; Warimwe *et al.*, 2016; Abdi *et al.*, 2017; Shabani *et al.*, 2017; Mkumbaye *et al.*, 2017). Seria também importante a deteção de resistência a antimaláricos, que se encontram atualmente em situações mais alarmantes, como por exemplo, as resistências a sulfadoxina-pirimetamina, tendo como hipótese da utilização da mutação *pfdhps-K540E* como alvo (Nkoli Mandoko *et al.*, 2018) e as resistências parciais à artemisina, utilizando como alvo, tal como recomendado pela OMS, uma das já várias mutações conhecidas de *pfK13* (White *et al.*, 2014; Chenet *et al.*, 2017; Menard & Dondorp, 2017; WWARN, 2018). Para todas as restantes espécies, seria importante analisar a possibilidade de resistência a cloroquina, usando como alvo o gene *crt* (transportador de resistência à cloroquina) ou *mdr-1* (Huang *et al.*, 2016; Chenet *et al.*, 2017), uma vez que, este é ainda um dos tratamentos aconselhado pela OMS (WHO, 2015a). Nos casos de infeção por espécies que formam hipnozoítos, e que estão propensas a ter um relapso da infeção mais tarde, como *P. vivax* e *P. ovale*, e nas quais se utiliza primaquina para o seu tratamento, poder-se-ia avaliar o estado de deficiência em G6PD do indivíduo infetado, através da utilização como alvo de uma das mutações conhecidas no gene *g6pd*, uma vez que a primaquina provoca hemólise dos eritrócitos quando em indivíduos com deficiência em G6PD (Li *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013; Howes *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015; WHO, 2015a).

Em termos de adaptação de todos estes alvos moleculares à plataforma, seria necessário o desenho e realização de novos *primers* marcados. Esta teria uma certa limitação no



número de alvos detetáveis através da tira LFD, sendo apenas possível a deteção a pares, ou seja, de dois alvos diferente por cada tira LFD. Esta condição não é, no entanto, condicionante em relação ao tempo da técnica, uma vez que as várias reações de *multiplex* PCR poderão ser realizadas simultaneamente em paralelo e utilizadas diversas tiras, obtendo-se um padrão de bandas ao conjugar-se todas as tiras LFD, obtendo-se o diagnóstico final.

Esta plataforma, estando disponível em centros de saúde e hospitalares a nível de POC, relacionados com centros de apoio a refugiados, assim como em consultas de apoio a viajantes e migrantes, iria permitir a realização de um diagnóstico célere logo após os primeiros sintomas. Este diagnóstico seria bastante completo dando um perfil de informações importantes para o tratamento, possibilitando, desde logo, o início do tratamento mais adequado, ao nível da medicina personalizada. Reforçando, uma vez mais, que um diagnóstico e tratamento precoce, não só evita complicações e avanços da infeção, como evita a possibilidade de transmissão para outros indivíduos (não-imunes).

Em zonas de elevada endemicidade, esta plataforma de diagnóstico, para além de um diagnóstico completo e informativo, englobaria também a oportunidade de monitorização imediata de marcadores de perfis de resistência a fármacos antimaláricos, que são de extrema importância para o possível controlo e elaboração de mapas desses mesmos perfis, apoiando estratégias de controlo, eliminação e erradicação da malária (WHO, 2015b; WHO, 2018a).

Estudo do *Composto E*

Relativamente ao terceiro aspeto-chave no controlo da malária, devido ao aumento de perfil de resistências a fármacos antimaláricos, realizou-se o estudo, cada vez mais urgente, de um composto com potencial efeito antimalárico - *Composto E* -, para possível futura integração num novo fármaco (Benoit-Vical, 2005; WHO, 2015b; WHO, 2018a).

Com este estudo, constatou-se que a diminuição da densidade parasitária (morte do parasita) diminui com o aumento do *Composto E* aplicado. Relativamente ao efeito de retardar o normal desenvolvimento do parasita, a concentração do *Composto E* que apresentou efeitos mais notórios foi a concentração de 0,2 μ M.



Em geral, ocorreu inibição da produção de hemozoína nas culturas sujeitas ao *Composto E*, sendo esta, em alguns casos, maior quando sujeita a maiores concentrações de composto.

Apesar de ser fundamental a otimização e repetição desta experiência no futuro, para continuação do estudo do efeito do *Composto E* em *P. falciparum in vitro*, é possível, desde já, concluir o seu potencial antimalárico, muito provavelmente relacionada com a inibição da formação de β -hematina/hemozoína (que leva à intoxicação e morte do parasita), apoiando a hipótese baseada nos estudos de cristalização *in vitro* (Dell'Agli *et al.*, 2003).



VI. Referências Bibliográficas



- Abdi A.I., Hodgson S.H., Muthui M.K., Kivisi C.A., Kamuyu G., Kimani D., Hoffman S.L., Juma E., Ogotu B., Draper S.J., Osier F., Bejon P., Marsh K. & Bull P.C. (2017). *Plasmodium falciparum* malaria parasite var gene expression is modified by host antibodies: longitudinal evidence from controlled infections of Kenyan adults with varying natural exposure. *BMC infectious diseases*, 17(1):585 (DOI:10.1186/s12879-017-2686-0).
- Antony H.A. & Parija S.C. (2016). Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical Parasitology*, 6(1):30-41 (DOI: 10.4103/2229-5070.175081).
- Banzouzi J.T., Prado R., Menan H., Valentin A., Roumestan C., Mallie M., Pelissier Y. & Blache Y. (2002). In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 81:399-401 (DOI: 10.1016/S0378-8741(02)00121-6).
- Bartoloni A. & Zammarchi L. (2012). Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1):e2012026 (DOI: 10.4084/MJHID.2012.026).
- Becla L., Lunshof J.E., Gurwitz D., Schulte In den Baumen T., Westerhoff H.V., Lange B.M. & Brand A. (2011). Health technology assessment in the era of personalized health care. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, 27:118–126 (DOI: 10.1017/S026646231100002X).
- Benoit-Vical F. (2005). Ethnomedicine in malaria treatment. *IDrugs*, 8:45-52 (PMID: 15650942).
- Boyce R.M., Muiru A., Reyes R., Ntaro M., Mulogo E., Matte M. & Siedner M.J. (2015). Impact of rapid diagnostic tests for the diagnosis and treatment of malaria at a peripheral health facility in Western Uganda: an interrupted time series analysis. *Malaria Journal*, 14: 203 (DOI: 10.1186/s12936-015-0725-0).
- Bronner U., Divis P.C., Farnert A. & Singh B. (2009). Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malaria Journal*, 8:15 (DOI: 10.1186/1475-2875-8-15).
- Bruce-Chwatt L.J. (1984). DNA probes for malaria diagnosis. *Lancet*, 1(8380):795 (PMID: 6143111).



- Bull P.C. & Abdi A.I. (2016). The role of PfEMP1 as targets of naturally acquired immunity to childhood malaria: prospects for a vaccine. *Parasitology*, 143(2):171-86 (DOI: 10.1017/S0031182015001274).
- Castelli F. & Sulis G. (2017). Migration and infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(5):283-289 (DOI: 10.1016/j.cmi.2017.03.012).
- CDC (2018a). Malaria Parasites, <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html> (Acedido em 22.03.2018).
- CDC (2018b). Choosing a drug to prevent malaria (<https://www.cdc.gov/malaria/travelers/drugs.html>, acedido em 11/12/2018).
- Chen I., Clarke S.E., Gosling R., Hamainza B., Killeen G., Magill A., O’Meara W., Price R.N & Riley E.M. (2016). “Asymptomatic” Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Medicine*, 13(1):e1001942 (DOI: 10.1371/journal.pmed.1001942).
- Chenet S.M., Okoth S.A., Kelley J., Lucchi N., Huber C.S., Vreden S., de Oliveira A.C., Barnwell J.W., Udhayakumar V & Adhin M.R. (2017). Molecular Profile of Malaria Drug Resistance Markers of *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 61(7): e02655-16 (DOI: 10.1128/AAC.02655-16).
- Chotivanich K., Silamut K., Day N.P.J. (2006). Laboratory diagnosis of malaria infection - A short review of methods. *Australian Journal of Medical Science*, 27(1):11-15.
- Ciceron L., Jaureguiberry G., Gay F. & Danis M. (1999). Development of *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1):35-8 PMID: 9854060).
- Cordray M.S. & Richards-Kortum R.R. (2015). A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of *Plasmodium* DNA. *Malaria Journal*, 14:472 (DOI: 10.1186/s12936-015-0995-6).
- Coronado L.M., Nadovich C.T. & Spadafora C. (2014). Malarial Hemozoin: From target to tool. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(6):2032–2041 (DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.009).



Costa P. (2014). Improved nucleic acid testing strategies to detect and discriminate veterinary relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex members. Dissertação de doutoramento, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

de Gier B., Suryapranata F.S., Croughs M., van Genderen P.J., Keuter M., Visser L.G., van Vugt M. & Sonder G.J. (2017). Increase in imported malaria in the Netherlands in asylum seekers and VFR travellers. *Malaria Journal*, 16(1):60 (DOI: 10.1186/s12936-017-1711-5).

Dell'Agli, Parapini S., Basilico N., Verotta L. Taramelli D., Berry C. & Bosisio E. (2003). *In vitro* studies on the mechanism of action of two compounds with antiplasmodial activity: E substance and 3,4,5-Trimethoxyphenyl (6'-O-Galloyl)- β -D-glucopyranoside. *Planta Medica*, 69(2):162-164 (DOI: 10.1055/s-2003-37706).

Despommier D., Gwadz R., Hotez P. & Knirsch C. (2005). The malarias. In: Parasitic Diseases. *Apple Trees Productions*, New York, 5ª edição, 9:50-68 (DOI: 10.1017/S001182006210072).

Dinzouna-Boutamba S.D., Yang H.W., Joo S.Y., Jeong S., Na B.K., Inoue N., Lee W.K., Kong H.H., Chung D.I., Goo Y.K. & Hong Y. (2014). The development of loop-mediated isothermal amplification targeting alpha-tubulin DNA for the rapid detection of *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal*, 13:248 (DOI: 10.1186/1475-2875-13-248).

Direção Geral de Saúde (2017). Orientação: Malária ou Paludismo. Lisboa, Nº 008/2017 (<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n0082017-de-17052017-pdf.aspx>, acessado em 01.10.2018).

Draghia-Akli R. (2012). Enabling personalized medicine in Europe: a look at the European Commission's funding activities in the field of personalized medicine research. *Personalized Medicine*, 9:151–155 (DOI: 10.2217/pme.11.91).

Egan T.J., Mavuso W. & Ncokazi K. (2001). The mechanism of β -hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. *Biochemistry*, 40:204-213 (DOI: 10.1021/bi0013501).

Einken GENOME SITE (2005). The principle of LAMP method: Design of primers (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>, acessado em 20.08.2018).



English M., Waruiru C., Amukoye E., Murphy S., Crawley J., Mwangi I., Peshu N. & Marsh K (1996). Deep breathing in children with severe malaria: indicator of metabolic acidosis and poor outcome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(5): 521-4 (DOI: 10.4269/ajtmh.1996.55.521).

Eperon G., Durieux-Paillard S., Mauris A., Chappuis F. & Gysin N. (2017). Malaria cases in Switzerland from 2005 to 2015 and recent rise of imported *Plasmodium vivax* malaria. *Swiss Medical Weekly*, 147:w14510 (DOI: 10.4414/smw.2017.14510).

Fair R.B. (2009). Digital Microfluidic Chips for Chemical and Biological Applications. *IEEE*, 6560-6564 (DOI: 10.1109/IEMBS.2009.5334498).

Flick K. & Chen Q. (2004)- *var* genes, PfEMP1 and the human host. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(1):3-9 (PMID: 14747137).

Foundation for innovative new diagnostics FIND (2012) Manual of Standard Operating Procedures for malaria LAMP. Geneva, Tokyo, London.

Gajbhiye S., Patra P.K. & Yadav M.K. (2017). New insights into the factors affecting synonymous codon usage in human infecting *Plasmodium* species. *Acta Tropica*, 176:29-33 (doi: 10.1016/j.actatropica.2017.07.025 surface membrane of hepatocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 177(5):1287-98.

Gendrot M., Fawaz R., Dormoi J., Madamet M. & Pradines B. (2018). Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, pii: S1198-743X(18)30631-1 (DOI: 10.1016/j.cmi.2018.09.009).

Golberg D.E. (2013). Complex nature of malaria parasite haemoglobin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 110(17):7097 (DOI: 10.1073/pnas.1303299110).

Goldberg D.E., Slater A.F., Cerami A. & Henderson G.B. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(8):2931-2935 (PMID: 2183218).

Goo Y.K., Ji S.Y., Shin H.I., Moon J.H., Cho S.H., Lee W.J. & Kim J.Y. (2014). First Evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency in Vivax Malaria



Endemic Regions in the Republic of Korea. *PloS One*, 9(5):e97390 (doi: 10.1371/journal.pone.0097390).

Guinovart C., Navia M.M., Tanner M. & Alonso P.L. (2006). Malaria: burden of disease. *Current Molecular Medicine*, 6(2):137-40 (PMID: 16515506).

Hanscheid T. (1999). Diagnosis of malaria: A review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and Laboratory Haematology*, 21(4):235-45 (DOI: 10.1046/j.1365-2257.1999.00220.x).

Hansen K.S., Grieve E., Mikhail A., Mayan I., Mohammed N., Anwar M., Baktash S.H., Drake T.L., Whitty C.J., Rowland M.W. & Leslie T.J. (2015). Cost-effectiveness of malaria diagnosis using rapid diagnostic tests compared to microscopy or clinical symptoms alone in Afghanistan. *Malaria Journal*, 14:217 (DOI: 10.1186/s12936-015-0696-1).

Hay S.I., Sinka M.E., Okara R.M., Kabaria C.W., Mbithi P.M., Tago C.C., Benz D., Gething P.W., Howes R.E., Patil A.P., Temperley W.H., Bangs M.J., Chareonviriyaphap T., Elyazar I.R., Harbach R.E., Hemingway J., Manguin S., Mbogo C.M., Rubio-Palis Y., Godfray H.C. (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Medicine*, 7(2):e1000209 (DOI: 10.1371/journal.pmed.1000209).

Howes R.E, Dewi M., Piel F.B., Monteiro W.M., Battle K.E., Messina J.P., Sakuntabhai A., Satyagraha A.W., Williams T.N., Baird J.K. & Hay S.I. (2013). Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malaria Journal*, 12:418 (DOI: 10.1186/1475-2875-12-418).

Huang B., Wang Q., Deng C., Wang J., Yang T., Huang S., Su X-Z., Liu Y., Pan L., Li G., Li D., Zhang H., Bacar A., Abdallah K.S., Attoumane R., Mliva A.M.S.A., Zheng S., Xu Q., Lu F., Guan Y. & Song J. (2016). Prevalence of crt and mdr-1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine. *Malaria Journal*, 15:414 (DOI: 10.1186/s12936-016-1474-4).

Huang H.-L., Zhu P., Zhou C.-X., He S. & Yan X.-J. (2017a). The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Karlodinium veneficum*. *Harmful Algae*, 62:20–29 (DOI: 10.1016/j.hal.2016.11.022).

Huang H.-L., Zhu P., Zhou C.-X., Yan X.-J., Zou Y.-X. & Lv P.-W. (2017b). Detection of *Skeletonema costatum* based on loop-mediated isothermal amplification combined



with lateral flow dipstick. *Molecular and Cellular Probes*, 36:36e42 (DOI: 10.1016/j.mcp.2017.08.003).

Imwong M., Pukrittakayamee S., Looareesuwan S., Pasvol G., Poirreiz J., White N.J. & Snounou G. (2001). Association of genetic mutations in *Plasmodium vivax dhfr* with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine: geographical and clinical correlates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11):3122-3127 (DOI: 10.1128/AAC.45.11.3122-3127.2001).

Imwong M., Pukrittayakamee S., Rénia L., Letourneur F., Charlieu J.P., Leartsakulpanich U., Looareesuwan S., White N.J. & Snounou G. (2003). Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5):1514-1521 (DOI: 10.1128/AAC.47.5.1514-1521.2003).

Infante R., Contador L., Rubio P., Aros D. & Peña-Neira A. (2011). Postharvest sensory and phenolic characterization of ‘Elegant Lady’ and ‘Carson’ peaches. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3):445-451 (DOI: 10.4067/S0718-58392011000300016).

Jani D., Nagarkatti R., Beatty W., Angel R., Slobodnick C., Andersen J., Kumar S. & Rathore D. (2008). HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLOS Pathogens*, 4(4):e1000053 (DOI: 10.1371/journal.ppat.1000053).

Jensen A.T., Magistrado P., Sharp S., Joergensen L., Lavstsen T., Chiacchiuini A., Salanti A., Vestergaard L.S., Lusingu J.P., Hermsen R., Sauerwein R., Christensen J., Nielsen M.A., Hviid L., Sutherland C., Staalsoe T. & Theander T.G. (2004). *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(9):1179–90 (DOI: 10.1084/jem.20040274).

Johnston S.P., Pieniasek N.J., Xayavong M.V., Slemenda S.B., Wilkins P.P. & da Silva A.J. (2006). PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3):1087-1089 (DOI: 10.1128/JCM.44.3.1087-1089.2006).

Kamphée H., Chairprasert A., Prammananan T., Wiriyaichaiyorn N., Kanchanatavee A. & Dharakul T. (2015). Rapid Molecular Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *PLoS One*, 10(9):e0137791 (DOI: 10.1371/journal.pone.0137791).



- Kasetsirikul S., Buranapong J., Srituravanich W., Kaewthamasorn M. & Pimpin A. (2016). The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. *Malaria Journal*, 15(1):358 (DOI: 10.1186/s12936-016-1400-9).
- Kersting S., Rausch V., Bier F.F. & von Nickisch-Roseneck M. (2014). Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malaria Journal*, 13:99 (DOI: 10.1186/1475-2875-13-99).
- Kliegman R., Stanton B., Geme J.S. & Schor N.F. (2017). NELSON. Tratado de pediatria. Elsevier, 20ª Edição, vol. 1-2 (ISBN: 9788535284669)
- Knell A.J. (1991). Malaria. Oxford, New York: Oxford University Press (DOI: 10.1016/0169-4758(92)90268-7).
- Kongkasuriyachai D., Yongkiettrakul S., Kiatpathomchai W. & Arunrut N. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification and LFD Combination for Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Methods in Molecular Biology*, 1572: 431-443 (DOI: 10.1007/978-1-4939-6911-1_28).
- Kyriacou H.M., Stone G.N., Challis R.J., Raza A., Lyke K.E., Thera M.A., Kone A.K., Doumbo O.K., Plowe C.V. & Rowe J.A. (2006). Differential *var* gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 150(2):211-8 (DOI: 10.1016/j.molbiopara.2006.08.005)
- Laishram D.D., Sutton L.P., Nanda N., Sharma V.L., Sobti C.R., Carlton J.M & Joshi H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, 11:29 (DOI: 10.1186/1475-2875-11-29).
- Lalle M., Possenti A., Dubey J.P. & Pozio e. (2018). Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiology*, 137-142 (DOI: 10.1016/j.fm.2017.10.001).
- Lavstsen T., Turner L., Saguti F., Magistrado P., Rask T.S., Jespersen J.S., Wang C.W., Berger S.S., Baraka V., Marquard A.M., Seguin-Orlando A., Willerslev E., Gilbert M.T., Lusingu J. & Theander T.G. (2012). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 109(26):E1791–1800 (DOI: 10.1073/pnas.1120455109)

Li L., Zhou Y.Q., Xiao Q.Z., Yan T.Z. & Xu X.M. (2008). Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism. *Blood Cells Molecules & Diseases*, 41(1):17-21 (DOI: 10.1016/j.bcmd.2008.01.007).

Lillehoj P.B., Huang M-C., Truongc N. & Hod C-M. (2013). Rapid electrochemical detection on a mobile phone. *The Royal Society of Chemistry*, 13:2950–2955 (DOI: 10.1039/c3lc50306b).

Lim C., Hansen E., DeSimone T.M, Moreno Y., Junker K., Bei A., Brugnara C., Buckee C.O. & Duraisingh M.T. (2013). Expansion of host cellular niche can drive adaptation of a zoonotic malaria parasite to humans. *Nature Communications*, 4:1638 (DOI: 10.1038/ncomms2612).

Lindblade K.A., Steinhardt L., Samuels A., Kachur S.P., Slutsker L. (2013). The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(6):623-639 (DOI: 10.1586/eri.13.45).

Lu X., Hua L., Zhang T., Li S., Fan X., Peng Q., Li W., Ye J., Long J. & He X. (2013) A reverse dot blot assay for the expanded screening of eleven Chinese G6PD mutations. *Clinica Chimica Acta*, 418:45-9 (DOI: 10.1016/j.cca.2012.12.023).

Mackintosh C.L., Beeson J.G. & Marsh K. (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology*, 20(12):597-603 (DOI: 10.1016/j.pt.2004.09.006).

Maitland K., Levin M., English M., Mithwani S., Peshu N., Marsh K. & Newton C. (2003). Severe *P. falciparum* malaria in Kenyan children: evidence for hypovolaemia. *The Quarterly Journal of Medicine*, 96(6):427-34 (DOI: 10.1093/qjmed/hcg077).

Makler M.T. & Piper R.C. (2009). Perspectives - Rapid Malaria Tests: Where Do We Go After 20 Years?. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6):921–926 (DOI: 10.4269/ajtmh.2009.09-0202).

Malaria Vaccine Initiative (2018a). Life cycle of the malaria parasite (<http://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development/life-cycle-malaria-parasite>, acedido em 05.02.2018).



Malaria Vaccine Initiative (2018b). RTS,S. Ghana, Kenya, and Malawi to take part in WHO malaria vaccine pilot programme (<https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/first-generation-vaccine/rtss>, acessado em 18.09.2018).

Marchiafava E. & Bignami A. (1894). On summer-autumn malaria fevers, in *Two Monographs on Malaria and the Parasites of Malarial Fevers. New Sydenham Society*, London, 1–232 (<https://archive.org/details/b24399917/page/n5>, acessado em 31.12.2018).

Marsh K., Forster D., Waruiru C., Mwangi I., Winstanley M., Marsh V., Newton C., Winstanley P., Warn P., Peshu N., Pasvol G. & Snow R. (1995). Indicators of life-threatening malaria in African children. *New England Journal of Medicine*, 332(21):1399-404 (DOI: 10.1056/NEJM199505253322102).

McQueen P.G. & McKenzie F.E. (2004). Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 101(24):9161–9166 (DOI: 10.1073/pnas.0308256101).

Menard D. & Dondorp A. (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(7):pii:a025619 (DOI: 10.1101/cshperspect.a025619).

Milenia Biotec GmbH (2010). HybriDetect 2T[®] (<https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/twistflow-manuals/milenia-hybridetect-2t.pdf?sfvrsn=4>, acessado a 10.12.2018).

Millet P., Collins W.E., Monken C.E. & Brown B.G. (1990). *In vitro* maturation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium knowlesi* observed under phase contrast microscopy. *Journal of Parasitology*, 76(6):923-925 (DOI: 10.2307/3282816).

Mkumbaye S.I., Wang C.W., Lyimo E., Jespersen J.S., Manjurano A., Mosha J., Kavishe R.A., Mwakalinga S.B., Minja D.T., Lusingu J.P., Theander T.G. & Lavstsen T. (2017). The severity of *Plasmodium falciparum* infection is associated with transcript levels of *var* genes encoding endothelial protein C receptor-binding *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infection and Immunity*, 85(4):e00841–16 (DOI: 10.1128/IAI.00841-16)

Moody A. (2002). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(1):66–78 (DOI: 10.1128/CMR.15.1.66-78.2002).



Moody, A., Hunt-Cooke, A., Gabbett, E. & Chiodini, P. (2000). Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *British Journal of Haematology*, 109, 891–894 (PMID: 10929047).

Morata P., Queipo-Ortuño M.I. & Colmenero J.D. (1998). Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9): 2443–2446 (PMID: 9705371).

Moreira B.G., You Y., Behlke M.A. & Owczarzy R. (2005). Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327:473–484 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.035).

Mori Y., Nagamine K., Tomita N. & Notomi T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1):150-4 (DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921).

Mota M.M. & Rodriguez A. (2008). New Pieces for the Malaria Liver Stage Puzzle: Where Will They Fit?. *Cell Host & Microbe*, 3(2):63-5 (DOI: 10.1016/j.chom.2008.01.004).

Najafabadi Z.G., Oormazdi H., Akhlaghi L., Meamar A.R., Nateghpour M., Farivar L. & Razmjou E. (2014). Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: Loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. *Acta. Tropica*, 139:44-49 (DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.03.029).

Neves, D. Melo, A., Linardi, P. & Vitor, R. (2005). *Plasmodium* – Malaria. In: Parasitologia Humana. *Atheneu*, São Paulo, 11ª edição, 17:143-161 (DOI: 10.1590/S0036-46651992000400018).

Niemz A., Ferguson T.A. & Boyle D.S. (2011). Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*, 29(5):240-50 (DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.01.007).

Nkoli Mandoko P., Rouvier F., Matendo Kakina L., Moke Mbongi D., Latour C., Losimba Likwela J., Ngoyi Mumba D., Bi Shamamba S.K., Tamfum Muyembe J.J., Muepu Tshilolo L., Parzy D. & Sinou V. (2018). Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in the Democratic Republic of the



Congo: emergence of highly resistant *pfdhfr/pfdhps* alleles. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(10):2704-2715 (DOI: 10.1093/jac/dky258).

Norman F.F., Monge-Maillo B., Martínez-Pérez À., Perez-Molina J.A. & López-Vélez R. (2015). Parasitic infections in travellers and immigrants: part I protozoa. *Future Microbiology*, 10(1):69-86 (DOI: 10.2217/fmb.14.105).

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. & Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12):e63 (DOI: 10.1093/nar/28.12.e63).

Nunes M. (2016). Unraveling of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies diversity in Portugal towards the development of more efficient diagnostic tools for Lyme disease. Dissertação de doutoramento, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Padley D., Moody A. H., Chiodini P. L. & Saldanha J. (2002). Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97(2):131-7 (doi: 10.1179/000349803125002977).

Padley D., Moody A.H., Chiodini P.L. & Saldanha J. (2003). Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97(2):131-7 (DOI: 10.1179/000349803125002977).

Parra Y., Ferrer R.E., Montero K. & Martínez M. (2011). Espectroscopía de las interacciones de drogas quinolónicas antimaláricas con Fe(III)PPIX. *Química Viva*, 10(3):154-186 (DOI: 86322531003).

Peng Q., Li S., Ma K., Li W., Ma Q., He X., He Y., He T. & Lu X. (2015). Large cohort screening of G6PD deficiency and the mutational spectrum in the Dongguan District in Southern China. *PLoS One*, 10(3):e0120683 (DOI: 10.1371/journal.pone.0120683).

Pertoft H., Laurent T.C., Laas T., Kagedal L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*, 88 (1): 271–282 (DOI:10.1016/0003-2697(78)90419-0).



Phillips-Howard P.A., Nahlen B.L., Kolczak M.S., Hightower A.W., ter Kuile F.O., Alaii J.A., Gimnig J.E., Arudo J., Vulule J.M., Odhacha A., Kachur S.P., Schoute E., Rosen D.H., Sexton J.D., Oloo A.J. & Hawley W.A. (2003). Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4):23-29 (PMID: 12749482).

Piera K.A., Aziz A., William T., Bell D., González I.J., Barber B.E., Anstey N.M. & Grigg M.J. (2017). Detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in a co-endemic area in Malaysia. *Malaria Journal*, 16:29 (DOI: 10.1186/s12936-016-1676-9).

Piperaki E.T. & Daikos G.L. (2016). Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance?. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6):487-493 (DOI: 10.1016/j.cmi.2016.04.023).

Plowe C.V., Djimde A., Bouare M., Doumbo O. & Wellems T. (1995). Pyrimethamine and Proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase Chain Reaction Methods for surveillance in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(6):565-8 (DOI: 10.4269/ajtmh.1995.52.565).

Polley S.D., González I.J., Mohamed D., Daly R., Bowers K., Watson J., Mewse E., Armstrong M., Gray C., Perkins M.D., Bell D., Kanda H., Tomita N., Kubota Y., Mori Y., Chiodini P.L. & Sutherland C.J. (2013). Clinical Evaluation of a Loop-Mediated Amplification Kit for Diagnosis of Imported Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 208:637–44 (doi: 10.1093/infdis/jit183).

Polley S.D., Mori Y., Watson J., Perkins M.D., González I.J., Notomi T., Chiodini P.L. & Sutherland C.J. (2010). Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8):2866-2871 (DOI: 10.1128/JCM.00355-10).

Posthuma-Trumpie G.A., Korf J. & Amerongen A. (2009). Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Annals of*



Tropical Medicine and Parasitology, 393(2):569-582 (DOI: 10.1007/s00216-008-2287-2).

Prudêncio M., Rodriguez A., & Mota M.M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews. Microbiology*, 4:849–856 (DOI: 10.1038/nrmicro1529).

QIAGEN® (2014). QIAxcel® DNA Handbook. 5ª edição.

Reddy, M. K., Gupta S.K., Jacob M.R., Khan S.I. & Ferreira D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73:461-467 (DOI: 10.1055/s-2007-967167).

Rottmann M., Lavstsen T., Mugasa J.P., Kaestli M., Jensen A.T., Muller D., Theander T., Beck H.P. (2006). Differential expression of *var* gene groups is associated with morbidity caused by *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian children. *Infection and Immunity*, 74(7):3904–11 (DOI: 10.1128/IAI.02073-05).

Rowe J.A., Claessens A., Corrigan R.A. & Arman M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11:e16 (DOI: 10.1017/S1462399409001082).

RTS,S Clinical Trials Partnership (2012). A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *New England Journal of Medicine*, 367:2284-2295 (DOI: 10.1056/NEJMoal208394).

RTS,S Clinical Trials Partnership (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*, 386 (9988):31-45 (DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60721-8).

Santos-Vega M., Bouma M.J., Kohli V. & Pascual M. (2016). Population Density, Climate Variables and Poverty Synergistically Structure Spatial Risk in Urban Malaria in India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12):e0005155 (DOI: 10.1371/journal.pntd.0005155).



- Schleiden S., Klingler C., Bertram T., Rogowski W.H. & Marckmann G. (2013). What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. *BMC Medical Ethics*, 14:55 (DOI: 10.1186/1472-6939-14-55).
- Schweitzer B. & Kingsmore S. (2001). Combining nucleic acid amplification and detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(1):21-7 (DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00172-5).
- Shabani E., Hanisch B., Opoka R.O., Lavstsen T. & John C.C. (2017). *Plasmodium falciparum* EPCR-binding PfEMP1 expression increases with malaria disease severity and is elevated in retinopathy negative cerebral malaria. *BMC Medicine*, 15:183 (DOI: 10.1186/s12916-017-0945-y).
- Shahinas D., Folefoc A. & Pillai D.R. (2013). Targeting *Plasmodium falciparum* Hsp90: Towards Reversing Antimalarial Resistance. *Pathogens*, 2:33-54 (DOI: 10.3390/pathogens2010033).
- Silumbe K., Yukich J.O., Hamainza B., Bennett A., Earle D., Kamuliwo M., Steketee R.W., Eisele T.P. & Miller J.M. (2015). Costs and cost-effectiveness of a large-scale mass testing and treatment intervention for malaria in Southern Province, Zambia. *Malaria Journal*, 14: 211 (DOI: 10.1186/s12936-015-0722-3).
- Singh B. & Daneshvarb C. (2013). Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2):165–184 (DOI: 10.1128/CMR.00079-12).
- Singh R., Savargaonkar D., Bhatt R. & Valecha N. (2013). Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Journal of Infection*, 67(3):245-7 (DOI: 10.1016/j.jinf.2013.04.016).
- Sinka M.E., Bangs M.J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., Mbogo C.M., Hemingway J., Patil A.P., Temperley W.H., Gething P.W., Kabaria C.W., Burkot T.R., Harbach R.E., Hay S.I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5:69 (DOI: 10.1186/1756-3305-5-69).
- Siraj A.S., Bouma M.J., Santos-Vega M., Yeshiwondim A.K., Rothman D.S., Yadeta D., Sutton P.C. & Pascual M. (2015). Temperature and population density determine reservoir regions of seasonal persistence in highland malaria. *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1820):20151383 (DOI: 10.1098/rspb.2015.1383).



Snounou G. & Singh B. (2002). Nested PCR Analysis of *Plasmodium* Parasites. *Methods in Molecular Medicine*, 72:189-203 (DOI: 10.1385/1-59259-271-6:189).

Snounou G., Siripoon N., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. & Viriyakosol S. (1999). Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(4):369-74 (DOI: 10.1016/S0035-9203(99)90120-7).

Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pinheiro L., do Rosário V.E., Thaithong S. & Brown K.N. (1993a). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(2):315-320 (PMID: 8264734).

Snounou, G., Pinheiro, L., Goncalves, A., Fonseca, L., Dias, F., Brown, K. N. & do Rosario, V. E. (1993b). The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and mosquito hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87:649-653 (PMID: 8296364).

Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. & Brown, K. N. (1993c). Identification of the four human malaria species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58, 283-292.

Soh P.N., Witkowski B., Olnagier D., Nicolau M.-L., Garcia-Alvarez M.-C., Berry A. & Benoit-Vical F. (2008). *In vitro* and *In Vivo* Properties of Ellagic Acid in Malaria Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3):1100–1106 (DOI: 10.1128/AAC.01175-08).

Song Y., Fahs A., Feldman C., Shah S., Gu Y., Wang Y., Machado R.F., Wunderink R.G. & Chen J. (2003). A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. *Springerplus*, 2:616 (DOI: 10.1186/2193-1801-2-616).

Starzengruber P., Fuehrer H-P., Ley B., Thriemer K., Swoboda P., Habler V.E., Jung M., Graninger W., Khan W.A., Haque R. & Noedl H. (2014). High prevalence of asymptomatic malaria in south-eastern Bangladesh. *Malaria Journal*, 13:16 (DOI: 10.1186/1475-2875-13-16).



Steenkeste N., Incardona S., Chy S., Duval L., Ekala M.T., Lim P., Hewitt S., Sochantha T., Socheat D., Rogier C., Mercereau-Puijalon O., Fandeur T. & Ariey F. (2009). Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers. *Malaria Journal*, 8: 86 (DOI: 10.1186/1475-2875-8-86).

Sullivan D.J. (2002). Hemozoin: a Biocrystal Synthesized during the Degradation of Hemoglobin. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weinheim, 129-163 (DOI: 10.1002/3527600035.bpol9007).

Takken W., Lindsay S.W. (2003). Factors affecting the vectorial competence of *Anopheles gambiae*: a question of scale. In: Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2(7):75–90 (DOI: 10.1126/science.298.5591.117).

Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P. & Krudsood S. (2009). Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(2):93-102 (DOI: 10.3347/kjp.2009.47.2.93).

Tanner M. & Savigny D. (2008). Malaria eradication back on the table. *Bulletin of the World Health Organisation*, 86(2):82 (DOI: 10.2471/BLT.07.050633).

Tarun A.S., Baer K., Dumpit R.F., Gray S., Lejarcegui N., Frevert U. & Kappe S.H. (2006). Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *International journal for parasitology*, 36(12):1283-1293 (DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.06.009).

Taylor T.E., Borgstein A. & Molyneux M.E. (1993). Acid–base status in paediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *The Quarterly Journal of Medicine*, 86(2):99-109 (DOI: 10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068784).

Teel R.W. (1987). Distribution and metabolism of ellagic acid in the mouse following intraperitoneal administration. *Cancer Letters*, 34:165-171 (PMID: 3815327).

The Academy of Medical Sciences (2013). Realising the potential of stratified medicine (<https://www.acmedsci.ac.uk/viewFile/51e915f9f09fb.pdf>. Accessed 6 Jan 2015, acedido em 30.12.2018).

The Global Fund (2018). Malaria (<https://www.theglobalfund.org/en/malaria/>, acedido a 01.10.2018).



Usta C., Ozdemir S., Schiariti M. & Puddu P.E. (2013). The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(7):907–13 (DOI:10.3109/09637486.2013.798268).

Valcárcel M. & López-Lorente A.I. (2014). Comprehensive analytical chemistry: Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry. Lateral Flow Biosensors Based on Gold Nanoparticles. *Elsevier*, Amsterdam, vol. 66, 14:583 (ISBN: 9780444632869).

Vattem D.A. & Shetty K.(2005). Biological Function of Ellagic Acid: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3):234–266 (DOI:10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x.).

Verotta L., Dell'Agli M., Giolito A., Guerrini M., Cabalion P. & Bosisio E. (2001). *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Tristaniopsis* species and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6'-O-galloyl)-O-beta-D-glucopyranoside. *Journal of Natural Products*, 64:603-607 (DOI: 10.1021/np000306j).

Vogenberg F.R., Barash C.I. & Prusel M. (2010). Personalized medicine—part 1: evolution and development into theranostics. *Pharmacy & Therapeutics*, 35: 560-562 (PMID: 21037908).

Wang D.G., Brewster J.D., Paul M. & Tomasula P.M. (2015). Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 20(4):6048–6059 (DOI: 10.3390/molecules20046048).

Warimwe G.M., Abdi A.I., Muthui M., Fegan G., Musyoki J.N., Marsh K., Bull P.C. (2016). Serological conservation of parasite-infected erythrocytes predicts *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 gene expression but not severity of childhood malaria. *Infection and Immunity*, 84(5):1331–5 (DOI: 10.1128/IAI.00772-15)

Weiss W.R. (1990). Host-parasite interactions and immunity to irradiated sporozoites. *Immunology Letters*, 25(1-3):39-42 (DOI: 10.1016/0165-2478(90)90088-8).

White N.J., Qiao L.G., Qi G. & Luzzatto L. (2012) Rationale for recommending a lower dose of primaquine as a *Plasmodium falciparum* gametocytocide in populations where G6PD deficiency is common. *Malaria Journal*, 11(1):418 (DOI: 10.1186/1475-2875-11-418).

White N.J., Pukrittayakamee S., Hien T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A. & Dondorp A.M. (2014). Malaria. *Lancet*, 383(9918):723-735 (DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0).



World Health Organization (1983). *Statistics Annual*. Genève (https://www.who.int/malaria/publications/1962-1981_data_in_world_health_statistics_1983.pdf?ua=1 , acessado em 11.12.2018).

World Health Organization (2012). Updated WHO policy recommendation: Single dose primaquine as a gametocytocide in *Plasmodium falciparum* malaria. Geneva: World Health Organization (https://www.who.int/malaria/pq_updated_policy_recommendation_en_102012.pdf?ua=1, acessado em 11.12.2018).

World Health Organization (2013). Seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in children: a field guide. Geneva: World Health Organization. (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85726/9789241504737_eng.pdf?sequence=1, acessado em 11.12.2018).

World Health Organization (2015a). *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva: World Health Organization, 3ª edição.

World Health Organization (2015b). *Global technical strategy for malaria 2016–2030*. Geneva: World Health Organization (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991_eng.pdf?sequence=1, acessado em 11.12.2018).

World Health Organization (2016). *Global Fund – Funding proposal development WHO policy brief*. Geneva: World Health Organization (http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who-policy-brief-dec2016.pdf, acessado em 11.12.2018).

World Health Organization (2017). *A framework for malaria elimination*. Geneva: World Health Organization (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254761/9789241511988-eng.pdf?sequence=1, acessado em 27.12.2018).

World Health Organization (2018a). *World Malaria Report 2018*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (2018b). *World Migration Report 2018*, Geneva: World Health Organization.



World Health Organization (2018c). Malaria: Key facts (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>, acessado a 17.04.2018).

World Health Organization (2018d). Malaria: Antimalarial drug efficacy and drug resistance (http://www.who.int/malaria/areas/treatment/drug_efficacy/en/, acessado a 25.01.2018).

World Health Organization (2018e). Malaria: Microscopy (<http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/microscopy/en/>, acessado a 20.08.2018).

World Health Organization (2018f). Malaria: Rapid diagnostic tests (http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid_diagnostic_tests/en/, acessado a 20.08.2019).

World Health Organization (2018g). Malaria: Nucleic acid amplification-based diagnostics (<http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/nucleic-acid-amplification-tests/en/>, acessado a 20.08.2019).

World Health Organization (2018h). Intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp). Geneva: World Health Organization (http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/en/, acessado em 20.10.2018).

World Health Organization, FIND & CDC (2014). Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 5 (2013). Geneva: World Health Organization (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/128678/9789241507554_eng.pdf?sequence=1, acessado em 11.12.2018).

World Tourism Organization (2018). UNWTO Tourism Highlights. UNWTO, Madrid, Edição de 2018 (DOI: 10.18111/9789284419876).

WWARN (2018). ACT Partner Drug Molecular Surveyor (<http://www.wwarn.org/explorer/app/#filter=1&Date=2007-2017&Drug=AM--AS--DHA&TreatmentType=all;mapset=1&lat=13.971&long=101.50&zoom=5>, acessado a 25.01.2018).

WWARN, Clinical Group (2015). Molecular Testing for Malaria Standard Operating Procedure DNA extraction by Chelex v1.1. University of Maryland School of Medicine,



Mahidol

University

(<http://www.wwarn.org/sites/default/files/attachments/procedures/ext02-dna-extraction-by-chelex-v1.1.doc>, acessado a 25.05.2018).

Xu C., Feng Y., Chen Y., Gao J. & Lu Y. (2016). Rapid detection of measles virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification coupled with a disposable lateral flow device. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85:168–173 (DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.023).

Yagi N., Satonaka K., Horio M., Shimogaki H., Tokuda Y. & Maeda S. (1996). The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotech Histochemistry*, 71(3):123-129 (DOI: 10.3109/10520299609117148).

Yang Y., Li Q., Wang S., Chen X. & Du A. (2016). Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Veterinary Parasitology*, 219:71–76 (DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.02.004).

Yongkiettrakul S., Jaroenramb W., Arunrut N., Chareanchima W., Pannengpetch S., Suebsing R., Kiatpathomchai W., Pornthanakasema W., Yuthavong Y. & Kongkasuriyachai D. (2014). Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology International*, 63:777–784 (DOI: 10.1016/j.parint.2014.06.004).