



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS PARA BLOQUEIO DE
TRANSMISSÃO EM *Plasmodium vivax***

CAMILA FABBRI

MANAUS

2021

CAMILA FABBRI

**BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS PARA BLOQUEIO DE
TRANSMISSÃO EM *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção grau de *Doutora em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador (a): Professora Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Co-orientador (a): Professor Dr. Wuelton Marcelo Monteiro

MANAUS

2021

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade do Amazonas

F113 Fabbri, Camila
2021 Busca de novos fármacos para bloqueio de transmissão em
plasmodium vivax/ Camila Fabbri. – Manaus (AM): [s.n], 2021.
xiii,141 p.: 30 em.

Tese (Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas.) – Universidade
do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
Orientador: Prof Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes
Co-orientador (a): Prof Dr. Wuelton Marcelo Monteiro

1. Bloqueio de transmissão. 2. Malaria. 3. Gametócitos. I. Lopes,
Stefanie Costa Pinto (Orient.). II. Monteiro, Wuelton Marcelo (Co-
orient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título.

CDU 1997 – 616.936 (043.2)

FOLHA DE JULGAMENTO**BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS PARA BLOQUEIO
DE TRANSMISSÃO EM *Plasmodium vivax*****CAMILA FABBRI**

“Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Dr. Daniel Youssef Bargieri

Dra. Isabela Penna Ceravolo

Dr. Gustavo Capatti Cassiano

Dedico aos meus queridos pais Celso Fabbri
e Telma Virginia Fabbri.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos ao meu suporte diário, o ser humano que Deus enviou para ser meu companheiro de vida, me guiar nos momentos mais difíceis, presente na alegria e na tristeza, e que com seu apoio incondicional a todos os meus sonhos, me ajudou a chegar até aqui. Marco Antonio Brasil, meu amor e meu melhor amigo, obrigada por tudo!

Aos meus pais, Celso Fabbri e Telma Fabbri, por todo o suporte educacional desde o ensino fundamental ao superior. O conhecimento é a maior riqueza que podemos adquirir e sem o amor incondicional e todo esse apoio de vocês eu nunca teria me tornado a pessoa que sou.

À minha orientadora, Stefanie Lopes, por ter aceitado me orientar quando alguns disseram não. Nunca duvidou da minha capacidade e, inclusive, acredita mais em mim do que eu mesma. Obrigada por todos esses anos de convívio, pela amizade, repreensões quando necessárias e por ter me passado um pouco do seu conhecimento em malária. Você é inspiração!

Ao Rogério Amino, por ter aberto as portas de seu laboratório no Institut Pasteur. Foi uma experiência que levarei por toda a minha vida. Cresci e aprendi muito nesses seis meses que passei em Paris, onde fui desafiada constantemente a buscar sempre o meu melhor. Obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha “Camila, você precisa ler mais” e pela experiência trocada.

Aos meus alunos de iniciação científica, Macejane Ferreira e Alexandre Trindade. Vocês foram peças fundamentais nessa tese de doutorado. Obrigada pelas coletas sanguíneas, pelos experimentos realizados e pelo companheirismo na correria do dia a dia. Tenho orgulho em ver vocês seguindo a carreira científica com tanto afinco e dedicação.

Ao Eduardo Aliprandini, pelo companheirismo no Institut Pasteur. Pesquisador exemplar com seu modo extremamente organizado e metódico. Aprendi muito com você!

Aos colegas de laboratório na FMT-HVD: Glenda Ramos, Najara Bittencourt, João Conrado, Dayanne Oliveira e Francys Saraiva pelo apoio, risadas na correria do dia a dia e todo o aprendizado compartilhado.

Aos colegas de laboratório no Institut Pasteur: Franz, Pauline Formaglio, Vanessa Lagal, Sabine Thiberge e Jean Michel Thiberge. Fui muito bem recepcionada por todos, sempre dispostos a ajudar e retirar minhas dúvidas nesses meses inesquecíveis em Paris e no Institut Pasteur. Merci por tout!

Às amigas que a PPGMT me proporcionou: Elijane Redivo, Rosa Santana e Tatiana Pinilla. Obrigada pelo ombro amigo, por me escutarem, pelo conhecimento compartilhado e por terem me impulsionado naqueles momentos difíceis. Vocês foram meus presentes de doutorado!

Ao Dr. Marcus Lacerda e Dr. Wuelton Monteiro pelas sugestões, por todo o ensinamento ao longo desses anos, conselhos e suporte técnico-financeiro desde minha iniciação científica.

À Dra. Claudia Maria Rios-Velasquez pelos ensinamentos na técnica de alimentação por membrana e a disponibilização da estrutura da Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia quando necessário.

Aos funcionários da Gerência de Entomologia, em especial o Sr. Nelson Fé; e aos funcionários da Gerência de Malária, em especial Dona Marta, Ericilda, Dra. Mônica Costa e Beбето.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa de estudos para o projeto realizado no Institut Pasteur.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES – pela concessão da bolsa de estudos durante os dois primeiros anos de doutorado.

À Universidade do Estado do Amazonas por oportunizar a formação de profissionais qualificados na região norte deste país.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado por todos esses anos de tanto aprendizado: da iniciação científica ao doutorado. Cresci, aprendi e serei eternamente grata a este local!

Ao Institut Pasteur por ter me recebido como estagiária remunerada e ter contribuído tanto para o meu crescimento como pesquisadora. Reconnaissant pour toutes les connaissances acquises dans cet institut. Merci pour tout!

Ao ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical Dr. Wuelton Monteiro, aos professores do curso pelos seus conhecimentos e experiências

transmitidas e as secretárias Conceição Tufic e Iza Freitas por estarem sempre dispostas a ajudar.

E de forma especial, a todos os pacientes com malária que participaram dessa tese de doutorado. Obrigada por contribuírem para ciência!

Com toda certeza não citei todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada acadêmica. O doutorado nunca é feito por uma única pessoa e durante todos esses anos contei com a ajuda de muitas. Minha gratidão eterna a todos que fizeram essa tese se tornar realidade.

Obrigada!!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Oswaldo Cruz (Programa INOVA Novos Talentos), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta de dados e análise, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

“É preciso ter um caos dentro de si para
dar à luz uma estrela cintilante.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A malária é uma doença com caráter infeccioso, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, o qual é transmitido pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Na região amazônica a doença é endêmica e a espécie predominante é o *Plasmodium vivax*. Nos últimos anos, a OMS tem trabalhado de forma sinérgica com os países endêmicos visando a eliminação dos focos ativos desta doença. Dessa forma, diversas estratégias têm sido utilizadas, como os fármacos candidatos ao bloqueio de transmissão, os quais são medicamentos capazes de eliminar efetivamente os gametócitos (forma infectante para o mosquito vetor), interrompendo o ciclo da doença e assim novos casos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo geral investigar a eficácia de compostos no bloqueio de transmissão de *P. vivax*, e como objetivos específicos, padronizar uma plataforma de triagem para o *P. vivax* por meio do *P. berghei*, investigar a atividade antimalárica de compostos da *Malaria for Medicines Venture* (MMV) e do fármaco azul de metileno contra *P. vivax* em oocinetos e gametócitos, além de verificar a eficácia do fármaco azul de metileno em formas assexuadas. As metodologias envolvendo o *P. berghei* foram realizadas no Institut Pasteur, Paris, França e as de *P. vivax* nas dependências da FMT-HVD, Manaus, Amazonas, Brasil. No *P. berghei*, todos os oito compostos MMV selecionados foram testados em gametócitos utilizando-se a citometria de fluxo e em oocinetos através de microscopia de fluorescência. Em *P. vivax*, a inibição das formas assexuadas frente ao azul de metileno foi mensurada por cultura de até 48h, contagem do amadurecimento em esquizontes em lâmina e posterior cálculo de IC50. A eficácia dos compostos MMV e azul de metileno foi verificada por meio da inibição da transformação de zigotos a oocinetos em cultura por até 24 horas com posterior contagem de oocinetos em 1.000 hemácias e através do ensaio de alimentação direta por membrana (DMFA) para verificar o bloqueio de transmissão. Após a análise dos resultados dos compostos MMV em *P. berghei* e *P. vivax* foi possível verificar uma correlação positiva ($r=0,659$; $p=0,042$) apontando similaridades entre as espécies. Dos oito compostos MMV testados em *P. vivax*, três merecem destaque: os compostos MMV665830, MMV665878 e MMV665941, por terem apresentado baixas taxas de infecção na metodologia DMFA e alta taxa de inibição na transformação de zigotos para oocinetos. O fármaco azul de metileno apresentou IC50 menor que a droga padrão (cloroquina) e demonstrou ser eficaz contra formas assexuadas de *P. vivax*. Além disso, o fármaco azul de metileno também inibiu a transformação de zigotos a oocinetos, mas a porcentagem de inibição na metodologia DMFA foi muito baixa e o fármaco não foi capaz de realizar o bloqueio de transmissão em *P. vivax* nos testes realizados. Concluindo, o *P. berghei* parece ser uma alternativa de triagem inicial para o *P. vivax*. Os compostos MMV665830, MMV665878 e MMV665941 são promissores para o bloqueio de transmissão. O azul de metileno demonstrou ser eficaz como um possível esquizonticida. Entretanto, mais experimentos com diferentes estratégias de incubação são necessários para verificar a eficácia deste medicamento como possível gametocida.

Palavras chaves: bloqueio de transmissão, malária, gametócitos, *P. berghei* e *P. vivax*

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by the *Plasmodium* protozoan, which is transmitted by the bite of *Anopheles* mosquito. In the Amazon region, the disease is endemic and the predominant species is *Plasmodium vivax*. In recent years, WHO has worked synergistically with endemic countries to eliminate active outbreaks of this disease. Hence, several strategies have been used, such as drugs that are candidates for transmission blocking, which are capable of effectively eliminating gametocytes (infective form for the mosquito), interrupting the cycle disease and thus new cases. This study aimed to investigate the effectiveness of transmission blocking compounds in *P. vivax*. For specific objectives to standardize a screening platform for *P. vivax* using the *P. berghei*, to investigate the antimalarial activity of MMV compounds and methylene blue against *P. vivax* ookinetes and gametocytes; and to verify the effectiveness of the methylene blue in asexual forms. The methodologies involving *P. berghei* were carried out at the Institut Pasteur, Paris, France and those of *P. vivax* at the FMT-HVD facilities, Manaus, Amazonas, Brazil. In *P. berghei*, all eight selected MMV compounds were tested on gametocytes using flow cytometry and on ookinetes using fluorescence microscopy. In *P. vivax*, the inhibition of asexual forms against methylene blue was measured by a culture up to 48 hours, microscope schizont count and subsequent IC50 calculation. The effectiveness of the MMV and methylene blue compounds was verified by inhibiting the transformation of zygotes to ookinetes in culture for up to 24 hours with subsequent count of ookinetes in 1000 red blood cells and through the DMFA methodology to verify the transmission blocking. After analyzing the results of the MMV compounds in *P. berghei* and *P. vivax*, a positive correlation ($r = 0.659$; $p = 0.042$) was found, which six compounds with similar results and two discrepancies between the two species. From the eight MMV compounds tested in *P. vivax*, three are noteworthy: the the compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941, for demonstrated low infection rates in the DMFA methodology and high-rate inhibition in the transformation of zygotes to ookinetes. The methylene blue drug showed an IC50 lower than the standard drug (chloroquine) and demonstrated be effective against asexual forms of *P. vivax*. Besides, the methylene blue drug also inhibited the transformation of zygotes to ookinetes, however the percentage of inhibition in the DMFA was very low and the drug haven't the ability to block transmission. In this way, *P. berghei* seems to be an alternative to the initial screening for *P. vivax*. The compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 were denominated hit compounds and are promising for transmission blocking. The methylene blue demonstrated a schizonticidal action. However, further experiments with different incubation strategies are needed to verify its effectiveness as a possible gametocidal drug.

Key words: transmission blocking, malaria, gametocytes, *P. berghei* and *P. vivax*

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença infecciosa, transmitida por mosquitos. Na região amazônica a espécie *Plasmodium vivax* é a que mais causa a doença. Nos últimos anos, órgãos internacionais juntamente com os governos nacionais têm trabalhado de forma conjunta para eliminar a doença. Dessa forma, muitas estratégias têm sido utilizadas, como medicamentos que quando administrado nas pessoas doentes possam impedir que o mosquito fêmea se contamine e transmita para outra pessoa. Esses medicamentos são classificados em drogas de bloqueio de transmissão. Dessa forma, este estudo teve como objetivo geral investigar a eficácia de medicamentos de bloqueio de transmissão em *P. vivax*, como também verificar a possibilidade de criar uma plataforma de triagem para *P. vivax* por meio de outra espécie de malária, de melhor desenvolvimento em laboratório, o *P. berghei*. Os estudos envolvendo o *P. berghei* foram realizados no Institut Pasteur, Paris, França, e os de *P. vivax* nas dependências da FMT-HVD, Manaus, Amazonas, Brasil. Foram selecionadas 8 drogas para testar nas duas espécies. No *P. berghei*, as drogas foram testadas contra duas fases desta espécie: a que transmite a doença para o mosquito e uma outra forma que fica dentro do intestino do mosquito. Em *P. vivax*, além das drogas MMV, o azul de metileno também foi utilizado. Ambas as drogas foram testadas contra as duas fases citadas acima. Além disso, também foi verificado se o azul de metileno conseguia eliminar as formas que ficam no sangue e que causa os sintomas da doença. Após a análise dos resultados das oito drogas MMV testadas em *P. berghei* e *P. vivax* foi possível verificar que os resultados foram muito parecidos em seis, contra apenas duas diferentes entre as espécies. Dos oito compostos MMV testados em *P. vivax*, três merecem destaque: os compostos MMV665830, MMV665878 e MMV665941, por terem apresentado excelente resultado no bloqueio de transmissão. O medicamento azul de metileno demonstrou ser eficaz contra as formas do parasito que causam os sintomas da doença e também conseguiu impedir a formação das formas que ficam dentro do intestino dos mosquitos. Porém, não conseguiu eliminar de forma eficaz as formas que transmitem a doença. Dessa forma, *P. berghei* pode ser uma alternativa para selecionar as melhores drogas, dentre muitas, para uma posterior testagem em *P. vivax*. Os compostos MMV665830, MMV665878 e MMV665941 são os melhores dentre os oito testados e são promessas de futuros medicamentos para bloqueio de transmissão. Entretanto, mais experimentos são necessários para verificar se de fato o azul de metileno não é capaz de eliminar as formas que transmitem a doença.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países endêmicos e o índice de aumento, queda ou estagnação de mortalidade por malária baseados nos números a partir de 2015 - <i>Global technical strategy for malaria 2016–2030 (GTS)</i>	02
Figura 2 - Número de casos de malária confirmado por 1.000 habitantes na região das américas em 2019.....	03
Figura 3 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019.....	04
Figura 4 - Ciclo da malária.....	05
Figura 5 - Manifestações clínicas durante a malária grave causada por <i>P. falciparum</i> em diferentes faixas etárias.....	10
Figura 6 - Esquema demonstrando a eficácia de um fármaco com ação de bloqueio de transmissão.....	23
Figura 7 - Metodologia de ensaio em membrana.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro resumo: características do ciclo e processo patológico por <i>P. vivax</i> e a possível contribuição para o desenvolvimento complicações ou doença grave.....	11
Tabela 2 - Quadro resumo de fármacos antimaláricos utilizados no Brasil e seus mecanismos de ação.....	14
Tabela 3 - Principais metodologias utilizadas no sistema <i>high throughput screening</i> para drogas de bloqueio de transmissão.....	24
Tabela 4 - Fármacos com atividade acima de 50% para bloqueio de transmissão em <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> utilizando a metodologia MFA.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Antimaláricos derivados da artemisinina
AM	Azul de metileno
BRI	Borrifação residual intradomiciliar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CQ-R	Resistência à cloroquina
DAC	Detecção ativa de casos
DMFA	Ensaio de alimentação direta por membrana (do inglês <i>Direct membrane feeding assay</i>)
DPC	Detecção passiva de casos
FBT	Ferramentas de bloqueio de transmissão
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
G6PD	Enzima glicose-6-fostato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Green fluorescent protein</i>)
GTS	<i>Global technical strategy for malaria 2016–2030</i>
HTS	<i>High throughput screening</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
MDA	<i>Mass drug administration</i>
MC	Malária cerebral
MFA	<i>Membrane feeding assay</i>
MILD	Mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RFP	Proteína vermelho fluorescente (do inglês <i>Red fluorescent protein</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SARA	Síndrome da angústica respiratória aguda
SMFA	Ensaio padrão de alimentação por membrana (do inglês, <i>Standard membrane feeding assay</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCAMS	<i>Tres Cantos Antimalarial Set</i>
TCLE	Termo de compromisso livre e esclarecido
TDR	Testes de diagnóstico rápido

TLRs Receptores toll-like
WHO *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

g	Gramas
M	Molar
mg/mL	Miligramas por mililitro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
°C	Graus celsius
μL	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária: conceito e epidemiologia	1
1.2 Ciclo biológico	4
1.3 Imunologia e Patogenia	7
1.3.1 <i>Plasmodium falciparum</i>	8
1.3.2 <i>Plasmodium vivax</i>	10
1.4 Tratamento e resistência a antimaláricos	13
1.5 Eliminação da malária	18
1.6 Bloqueio de transmissão	22
1.6.1 Metodologias <i>ex vivo</i>	24
1.6.2 Metodologia <i>in vivo</i> : ensaio de membrana	25
1.6.3 Drogas e Fármacos candidatos ao bloqueio de transmissão	27
1.7 Relevância do estudo	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Geral	32
2.2 Específico	32
3. PRODUTO DA TESE	33
3.1 Manuscrito científico 1	34
3.2 Manuscrito científico 2	66
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	87
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7. ANEXOS E APÊNDICES	102
7.1 Procedimentos operacionais padrões	102
7.1.1 Protocolo de preparação para coluna de celulose – CF 11	102
7.1.2 Protocolo de preparação de meios incompletos: RPMI, MCCOY E IMDM.....	104
7.1.3 Protocolo de preparação de percoll 45%	107
7.1.4 Protocolo de cultura de oocineto	110
7.1.5 Protocolo de manutenção da colônia	114
7.1.6 Protocolo de infecção experimental de mosquitos anofelinos - DMFA.....	121
7.1.7 Protocolo para dissecação de intestino médio e detecção microscópica da infecção de anofelinos por <i>Plasmodium</i> spp.	126

	xiii
7.1.8 Protocolo para cultivo de formas assexuadas e testagem de drogas – IC50 ..	128
7.2 Procedimentos do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	132
7.2.1 Parecer de aprovação do projeto	132
7.2.2 Termo de compromisso livre e esclarecido (TCLE).....	138
7.2.3 Questionário	140
7.3 Produção Científica como colaborador no período do doutorado.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária: conceito e epidemiologia

Malária é uma doença de caráter endêmico, infecciosa, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* e transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (1,2). São espécies causadoras da doença: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale curtis* e *P. ovale wallikeri*. Dentre as espécies originalmente de primatas, as espécies *P. knowlesi* e *P. cynomolgi* têm causado a doença em humanos na região do sudoeste asiático (2–4). A espécie *P. simium* também tem sido relacionada a casos de infecção em humanos (5).

Em 2019 foram estimados 229 milhões de casos de malária em 87 países endêmicos para a doença, mostrando uma queda quando comparado com os 238 milhões de casos no ano 2000. O continente Africano, o qual a espécie predominante da doença é o *P. falciparum*, permanece com o maior número de casos e mortes (Figura 1), cerca de 94%, embora tenha tido uma redução de 44% (de 680.000 para 384.000) de mortes quando comparado com o ano 2000. Fora do continente Africano, a espécie predominante causadora da doença é o *P. vivax*, a qual é responsável por 3% dos casos mundialmente. Esta espécie é mais comum no continente Asiático, Região do Pacífico Ocidental, Região do Leste Mediterrâneo e na América do Sul, onde os índices de prevalência para a espécie chega a 76%, atingindo principalmente os países Venezuela, Brasil, Colômbia e Peru (1,6) (Figura 2).

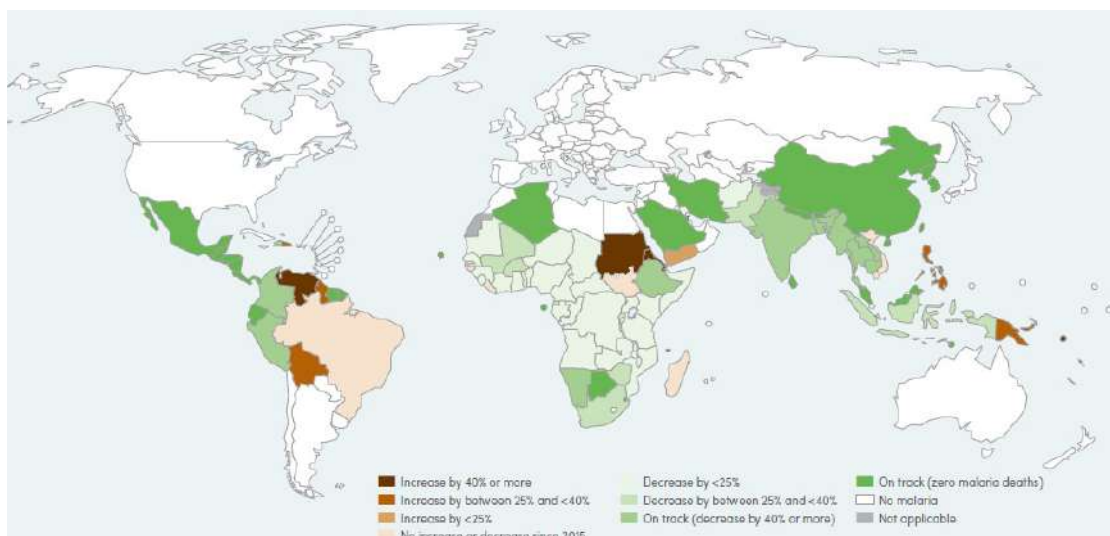


Figura 1. Países endêmicos e o índice de aumento, queda ou estagnação de mortalidade por malária baseados nos números a partir de 2015 - *Global technical strategy for malaria 2016–2030 (GTS)*. Fonte: World Malaria Report, 2020.

No Brasil, a transmissão da malária é em grande parte afetada por questões políticas, condições sanitárias, instabilidades socioeconômicas e ambientais. 99,9% da doença está concentrada na região da Amazônia Legal, composta por nove estados: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e 808 municípios (7,8). As características peculiares dessa região composta por florestas densas, numerosos rios, desmatamento desenfreado e o difícil acesso, somando ainda com a ausência de campanhas sólidas para o controle da doença, influencia no maior número de transmissão. Mais de 60% dos casos são provenientes de áreas rurais ou periféricas nas grandes cidades, com um número baixo de transmissões em áreas urbanas desde 2010 (7,9).

Os outros 0,1% da malária no Brasil denomina-se região extra-amazônica que é representada pelos outros 17 estados e o Distrito Federal. As transmissões estão ligadas a áreas da mata atlântica ou ainda de casos importados da África ou Ásia (8). Em 2019, foram notificados 43 casos importados, com maior ocorrência nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio de Janeiro (7). Ainda neste ano, a letalidade na região extra-amazônica foi cerca de 2%, enquanto, na região amazônica foi de apenas 0,02%. A causa

para tamanha discrepância deve-se a demora pela suspeita da doença e consequentemente diagnóstico rápido e tratamento adequado (7,8).

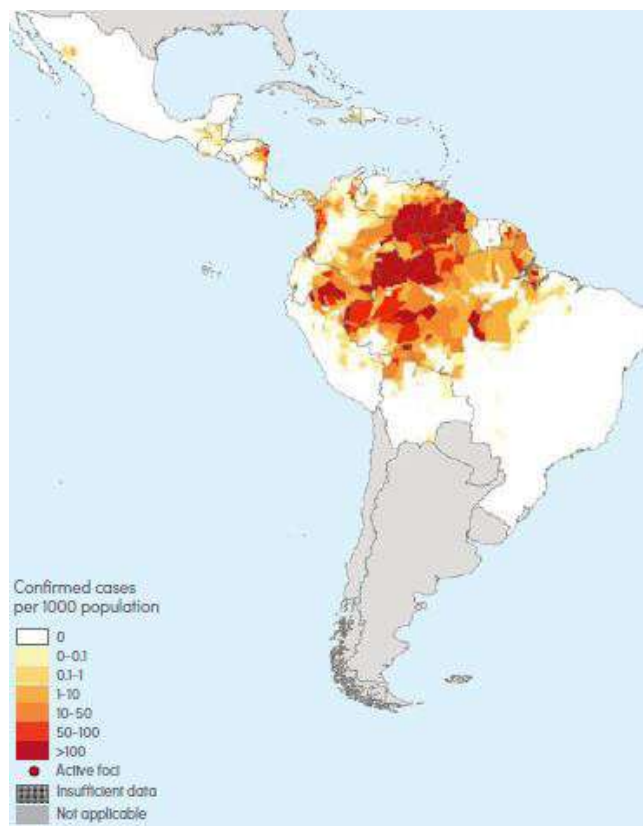


Figura 2. Número de casos de malária confirmado por 1000 habitantes na região das américas em 2019. Fonte: World Malaria Report, 2020.

O Brasil notificou, em 2019, 157.454 casos de malária, uma redução de 19,1% quando comparado com 2018 (Figura 3). 89,3% dos casos foram causados por *P. vivax*, seguindo o padrão da região. Trinta e nove por cento dos casos de malária concentrou-se no estado do Amazonas, em segundo no Pará (19,5%) e em terceiro em Roraima (17,1%). Dessa forma, os três municípios que apresentaram os maiores números de casos entre 2019 a agosto de 2020 são todos do estado do Amazonas: Barcelos (8.794), São Gabriel da Cachoeira (8.605) e Manaus (6.532). Ainda durante esse período, houve um aumento de malária em algumas áreas denominadas especiais, ou seja, locais com perfis sociodemográfico e epidemiológico distintos: aumento de 24,6% em garimpos e

2,4% em áreas indígenas quando comparado com anos anteriores, demonstrando assim a vulnerabilidade e a importância de ações nesses ambientes (1,7).

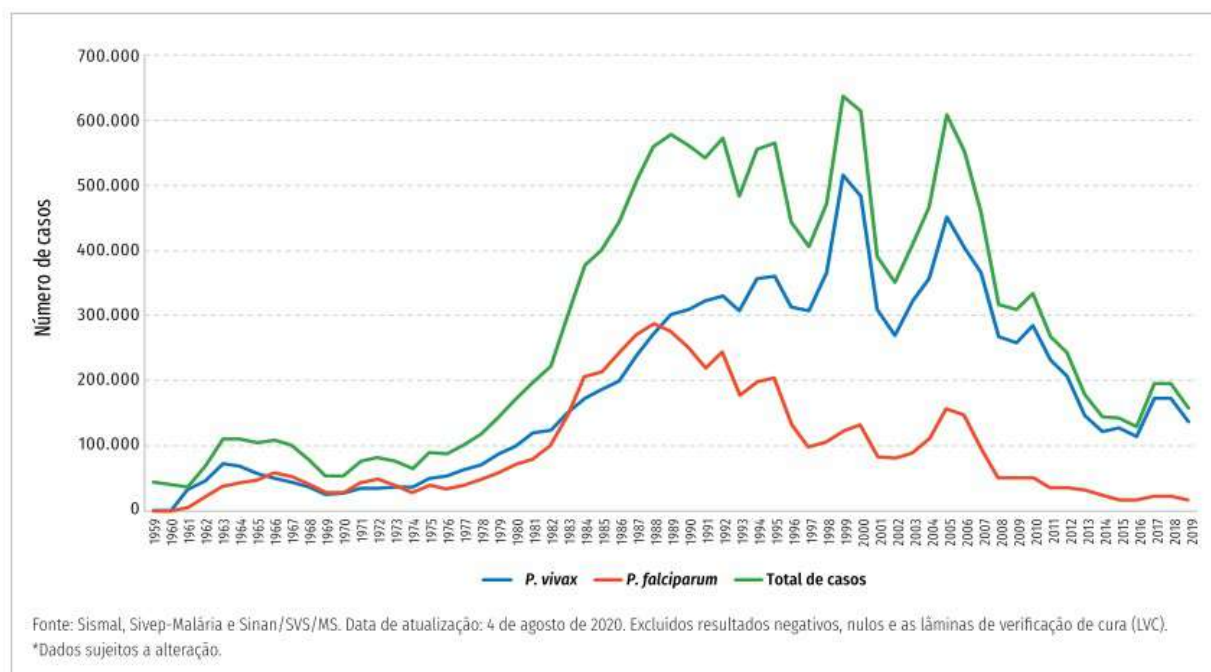


Figura 3. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019. Fonte: Boletim Epidemiológico Malária, 2020.

1.2 Ciclo biológico

O protozoário da malária possui um ciclo complexo, apresentando as seguintes fases: ciclo hepático (exo-eritrocítico, esquizogonia hepática), ciclo eritrocítico (esquizogonia sanguínea) e o ciclo esporogônico, sendo que este último, ocorre no vetor da doença (2,10) (Figura 4).

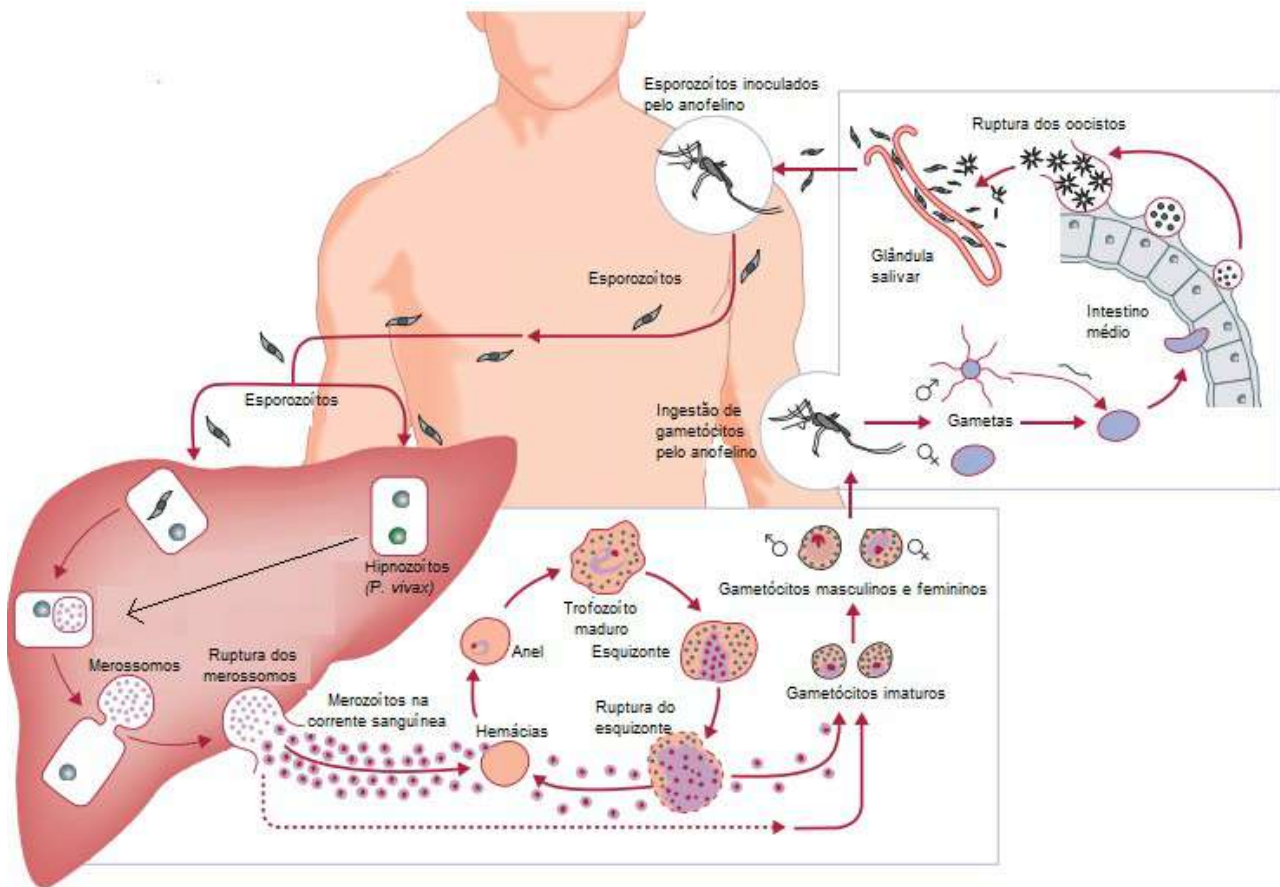


Figura 4. Ciclo da malária. Fonte: Mueller et al, 2009 (modificado).

O ciclo exo-eritrocitário, que possui duração média 5 a 16 dias dependendo da espécie, inicia no momento do repasto sanguíneo do mosquito *Anopheles*, onde esporozoítos são simultaneamente inoculados sob a pele do hospedeiro humano, atingindo a corrente sanguínea e migrando para o fígado em poucos minutos, invadindo os hepatócitos e se desenvolvendo em esquizontes, os quais após diversas divisões mitóticas liberam as formas arredondadas, denominadas merozoítos. Estes conseguem atingir a corrente sanguínea por meio dos merossomos, estruturas vesiculares que garantem a integridade dos merozoítos durante a passagem do fígado até a corrente sanguínea. Ainda nessa fase, nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos podem se diferenciar em hipnozoítos, formas dormentes que podem ser responsáveis por

episódios de recaída da doença (tópico que será abordado no item 1.3.2 – *P. vivax*) (2,10–12).

Durante o ciclo eritrocítico, fase esta que dura entre 48 a 72 horas dependendo da espécie, os merozoítos invadem as hemácias e se reproduzem de forma assexuada no processo denominado esquizogonia. Esta interação merozoíto-hemácia envolve receptores específicos como glicoforinas para *P. falciparum* e a glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy para *P. vivax*. Ademais, é importante frisar que o *P. vivax* invade somente reticulócitos, enquanto *P. falciparum* não possui predileção e consegue se reproduzir em hemácias de diversos estágios de maturação. Os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens (comumente chamados de anéis) a trofozoítos maduros até a formação de um esquizonte sanguíneo, momento onde há o rompimento das hemácias e liberação de novos merozoítos que perpetuarão o ciclo eritrocítico (10,11).

Ainda na fase sanguínea, os merozoítos podem se diferenciar em formas sexuadas, denominadas gametócitos. O pico de produção destas formas diferencia entre as espécies: no *P. falciparum* ocorre tardiamente, após diversos ciclos de esquizogonia sanguínea, enquanto no *P. vivax* o pico de produção de gametócitos pode ser verificado precocemente. Estes, quando ingeridos pelos anofelinos no momento do repasto sanguíneo, iniciam o ciclo esporogônico. Assim, a gametogênese é iniciada. Cada gametócito masculino libera 8 microgametas por meio do processo de exflagelação com o objetivo de fecundar os macrogametas femininos, formando assim o zigoto. Através do processo de meiose, o zigoto dá origem ao oocineto, forma móvel que migra até o intestino do anofelino e atinge a parede do intestino médio, onde se diferencia em oocistos, formas arredondadas que iniciam o processo de divisão esporogônica gerando centenas de esporozoítos. Após cerca de 14 dias, ocorre a ruptura dos oocistos liberando os esporozoítos na hemolinfa, os quais invadem as glândulas salivares do anofelino, que está apto novamente a iniciar o ciclo no próximo repasto sanguíneo (10–12).

1.3 Imunologia e Patogenia

O sistema imune atua em diversos mecanismos na malária. A resposta imune inata está relacionada ao controle inicial da doença e é fundamental para iniciar o processo de formação da imunidade adquirida. Sabe-se que células dendríticas, macrófagos, células natural *killers* e células T $\gamma\delta$ estão envolvidas nesse processo primário. Os receptores Toll-like (TLRs) são responsáveis em reconhecer os metabólitos do parasito e gerar a liberação de citocinas importantes no controle da infecção. Por exemplo, a interleucina IL-10 parece estar fortemente associada a resposta inflamatória em infecções por *P. vivax*. Outras moléculas liberadas durante a infecção aguda são TNF- α (responsável pela febre) e o interferon γ (10,13–15).

Na imunidade adquirida observa-se um grande papel das células T no controle da infecção nos estágios hepáticos e sanguíneos. Células T CD8+ estão relacionadas a imunidade no estágio hepático, enquanto células T CD4+ estão relacionadas ao controle de parasitemia no estágio sanguíneo da doença, agindo conjuntamente com a imunidade humoral (14,16). Entretanto, a produção de anticorpos na malária é ineficiente e rapidamente perdida se o hospedeiro não for continuamente exposto a doença. Assim, apenas adultos que residem em áreas endêmicas geralmente apresentam novas infecções assintomáticas (17).

Durante a fase hepática do ciclo biológico do parasito não há manifestações clínicas da doença. A sintomatologia inicia durante a esquizogonia sanguínea, em decorrência da destruição dos eritrócitos parasitados (18). A maioria dos pacientes desenvolvem um quadro de malária não complicada, que se define com uma sintomatologia clássica, mas sem evidências de gravidade ou disfunção de órgãos vitais. Estes sintomas geralmente são: cefaleia, mal-estar, cansaço, mialgia e febre (19).

Quando há complicação da doença por um ou diversos fatores, a enfermidade é denominada malária grave. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença recebe essa denominação quando apresenta um ou mais das seguintes

manifestações clínicas: coma (malária cerebral – causada exclusivamente em humanos por *P. falciparum*), acidose metabólica, anemia grave, hipoglicemia, falha renal aguda ou edema agudo pulmonar (19).

Em casos de complicações da doença, a anemia é a manifestação mais comum na malária grave, tanto na forma aguda quanto na forma crônica, entre as espécies *P. falciparum* e *P. vivax*. Entretanto, as taxas de mortalidade aumentam em se tratando de infecções causadas por *P. falciparum*. A anemia hemolítica que alguns pacientes podem apresentar é gerada por diversos fatores e não pode ser somente associada a destruição das hemácias parasitadas. Sabe-se que esta é também a consequência da ação do sistema imune na destruição de eritrócitos não parasitados, mas sensibilizados por antígenos, e pela disfunção da medula óssea em decorrência da ação de citocinas (11,18,20).

A seguir, será brevemente descrito as características distintas da patogenia da malária nas principais espécies causadoras da doença em seres humanos: *P. falciparum* e *P. vivax*.

1.3.1 *Plasmodium falciparum*

Esta espécie do plasmódio possui características biológicas responsáveis em modificar a superfície de eritrócitos parasitados, removendo estas células da circulação e permitindo a sua adesão à parede endotelial dos capilares, plaquetas ou ainda eritrócitos não infectados independente da gravidade da doença – seja ela assintomática, branda ou grave. Esse fenômeno é denominado sequestro de eritrócitos, e é mediado por proteínas do parasito expressas na superfície dos eritrócitos infectados – PfEMP1, as quais se ligam a moléculas como o CD36, que estão presentes nas plaquetas e na parede endotelial. (15,21) .

A habilidade de adesão a parede endotelial, faz do *P. falciparum* o principal plasmódio humano a gerar um quadro grave de malária cerebral (MC). Em regiões

endêmicas, como o continente Africano, crianças de até cinco anos de idade estão no grupo de maior risco, com uma taxa de mortalidade entre 10 a 20%. Isso deve-se principalmente a má nutrição, que conseqüentemente afeta o sistema imune, o qual não produz anticorpos específicos de forma eficaz. Assim, as manifestações clínicas da MC podem iniciar com um quadro clínico típico de malária e rapidamente o paciente pode evoluir para um estado de coma. A patologia da MC ainda não está completamente esclarecida. Entretanto, sabe-se que moléculas como TNF- α estimula o aumento de moléculas de aderência no endotélio do cérebro, como a ICAM-1, facilitando assim o sequestro de eritrócitos para os capilares cerebrais (15,20). Além disso, as últimas descobertas relacionam que certas variantes da PfEMP1 expressas nos eritrócitos infectados contêm domínios da molécula EPCR, as quais estão intimamente ligadas às manifestações clínicas graves na patogenia desta espécie (22).

Também como manifestação grave da doença, duas síndromes podem acometer o pulmão durante a malária causada por *P. falciparum*: edema pulmonar e a Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). O edema pulmonar é definido pelo acúmulo de líquido dentro dos pulmões, enquanto a SARA é uma inflamação pulmonar difusa, que atinge inclusive os alvéolos pulmonares, esta última, mais comum em adultos em quadros com malária. O paciente tem quadro de hipóxia e radiografia evidenciando envolvimento difuso do parênquima pulmonar (20,23).

Entretanto, assim como a MC, o desenvolvimento da SARA também é pouco esclarecido na malária. Sabe-se que ela geralmente é tardia, ocorrendo mesmo após o tratamento antimalárico. Há formação de um grande infiltrado de neutrófilos e macrófagos – estes últimos contendo pigmento malárico – que juntamente com a estrutura de fibrina, plaquetas e hemácias constituem a formação de trombos, mecanismo este ligado ao sequestro de eritrócitos infectados pelo *P. falciparum*, já mencionado anteriormente (20). A Figura 5 traz um resumo sobre as principais manifestações clínicas na malária grave causada por *P. falciparum*.

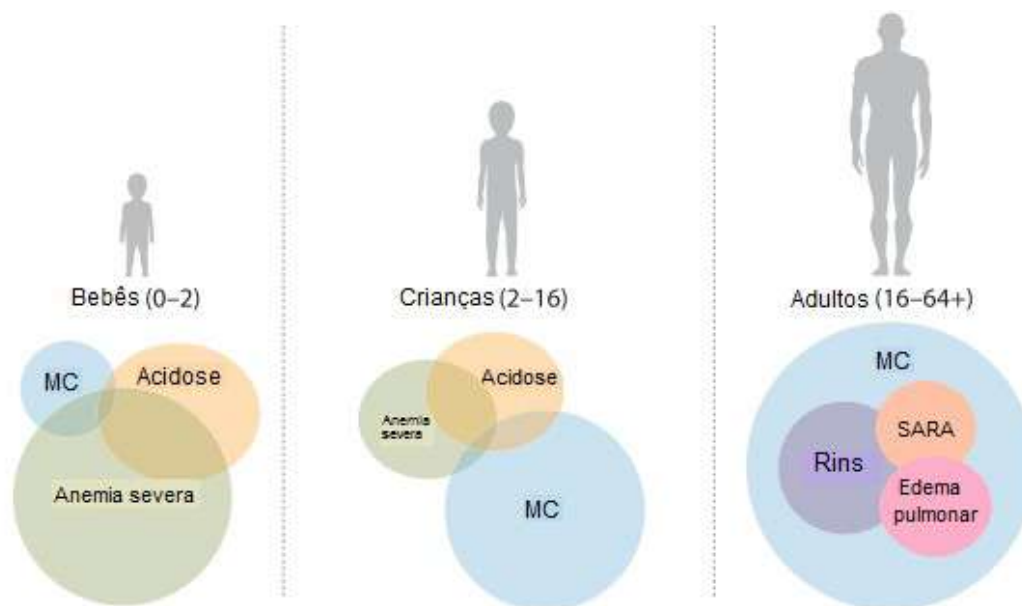


Figura 5. Manifestações clínicas durante a malária grave causada por *P. falciparum* em diferentes faixas etárias. Fonte: Moxon et al, 2019 (modificado).

1.3.2 *Plasmodium vivax*

De forma geral, esta espécie origina uma doença com prognóstico positivo na maioria dos indivíduos infectados, com a sintomatologia já descrita na introdução deste item. Entretanto, sabe-se que o *P. vivax* também pode ser responsável por ocasionar uma doença com quadro clínico mais grave. Diversos estudos apontam pacientes que manifestaram disfunção hepática, falha renal, hemorragia, ruptura esplênica, dificuldade respiratória e anemia grave (Tabela 1). Porém, como mencionando anteriormente, a anemia grave é a manifestação clínica mais comum em quadros graves por *P. vivax*, seguida por problemas respiratórios (11,24). Estas duas serão discutidas com mais detalhes a seguir.

Tabela 1. Características do ciclo e processo patológico por *P. vivax* e a possível contribuição para o desenvolvimento de complicações ou uma doença grave

Características do ciclo e processo patológico	Possível contribuição para complicações ou malária <i>vivax</i> grave
Destrução de hemácias não infectadas	- Anemia grave
Invasão e destruição de reticulócitos	- Anemia grave
Recaídas	- Hemólise; - Anemia grave.
Alta resposta inflamatória – grande produção de citocinas em comparação com <i>P. falciparum</i>	- Alto processo inflamatório no baço; - Desitropoiese; - Hemólise; - Anemia grave; - Ativação endotelial; - Dano agudo no pulmão.
Citoaderência	- Dano agudo no pulmão; - Estresse respiratório; - SARA.
Trombocitopenia	- Ruptura esplênica
Estresse oxidativo	- Anemia grave; - Icterícia; - Disfunção hepática.

Fonte: (24–28)

Diferente do *P. falciparum*, esta espécie geralmente ocasiona uma doença com baixa parasitemia (devido a predileção por infectar reticulócitos, já mencionado no item 1.2). Todavia, sabe-se que a parasitemia não está diretamente ligada a gravidade da doença (25). Estudos apontam que os níveis de citocinas produzidos durante uma infecção causada por *P. vivax* são maiores quando a carga parasitária é semelhante em ambas as espécies, gerando assim uma resposta inflamatória maior que em *P. falciparum* (29). E embora o mecanismo da anemia grave em pacientes com baixa parasitemia em *P. vivax* ainda não esteja completamente elucidado, estudos apontam que esta resposta

inflamatória parece ser um importante fator no desenvolvimento desta anemia (30). O baço, responsável por remover hemácias senescentes, é fortemente impactado por essa resposta inflamatória. Além disso, a razão de hemácias não infectadas removidas por este órgão em uma infecção por *P. vivax* é 4,3 vezes maior que em *P. falciparum*. Ademais, os altos níveis de moléculas oxidantes geradas na infecção malárica também geram um estresse oxidativo nos eritrócitos (26,31).

Outro fator importante no processo de anemia por *P. vivax* são os episódios de recaídas, ocasionados pelas formas dormentes denominadas hipnozoítos localizadas no fígado, que podem reiniciar o ciclo eritrocítico. Pacientes com episódios de recaídas recorrentes podem conseqüentemente desenvolver uma anemia grave devido a hemólise e a diseritropoiese, antes que ocorra a recuperação hematológica da infecção anterior (30).

Ainda relacionado a fatores de gravidade em infecções por *P. vivax*, é necessário discorrer sobre o fenômeno de citoaderência. Por muito tempo acreditou-se que *P. vivax* era incapaz de ocasionar a fixação de hemácias infectadas ao endotélio em decorrência da visualização de todos os estágios do parasito na circulação periférica (24). Entretanto, a literatura aponta o fenômeno de citoaderência nesta espécie há mais de 60 anos quando se verificou uma diminuição de esquizontes na circulação periférica (32,33).

Estudos recentes demonstraram a citoadesão em *P. vivax* em modelos *ex vivo*. Hemácias infectadas foram capazes de aderir em células endoteliais de pulmão humano em condições estáticas e de estresse, e mesmo que a citoaderência demonstrada tenha atingido níveis dez vezes mais baixos do que quando comparado com o *P. falciparum*, a força de interação foi semelhante (27). Ademais, outro estudo do mesmo grupo também verificou que a escassez de esquizontes na circulação periférica em pacientes com *P. vivax* está intimamente ligada ao aumento do potencial citoadesivo do parasito (28). Não há evidências de proteínas homólogas a PfEMP1 que estejam envolvidas nesse processo em *P. vivax*. Entretanto, as proteínas VIR foram associadas a citoadesão neste parasito, uma vez que anticorpos específicos contra esta proteína inibiram a interação de hemácias

infectadas com o endotélio (27,28). Além disso, outras moléculas também foram associadas a este fenômeno. Hemácias infectadas por *P. vivax* também se ligam a glicosaminoglicanos, como sulfato de condroitina A e ácido hialurônico (34).

Dessa forma, os problemas respiratórios decorrentes de uma infecção por *P. vivax* estão fortemente ligados a citoaderência (30). Um estudo sugeriu invasão e sequestro de hemácias parasitadas no pulmão, gerando um comprometimento dos capilares pulmonares (35). Outro estudo mais recente, apontou que o estresse respiratório estava associado a 15 de 17 causas de morte por *P. vivax* em autópsias realizadas no Brasil. As autópsias ainda revelaram que pacientes os quais evoluíram para a SARA possuíam hemácias parasitadas dentro dos alvéolos capilares, mesmo após a negatificação da gota espessa (diagnóstico padrão-ouro para *P. vivax*) realizada no sangue periférico, e o tratamento com antimaláricos. Também foi reportada a presença de infiltrado de neutrófilos e células mononucleares nos capilares, indicando uma infecção causada por mediadores inflamatórios (30,36).

Além dos aspectos citados acima, diversos estudos apontam outros fatores que levam uma infecção por *P. vivax* ocasionar uma doença grave: a intensidade da transmissão, gravidez e a presença de fatores econômicos em localizações endêmicas, como gênero, idade e má nutrição em crianças. Algumas comorbidades também podem agravar o quadro, como crianças que apresentam quadro de pneumonia, indivíduos com problemas cardíacos, diabetes, pacientes com beta e alfa talassemia e parasitoses intestinais são as principais (25,37–39). A resistência a antimaláricos e a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), também são fatores de agravamento da malária por *P. vivax*. Estas serão discutidas no tópico a seguir.

1.4 Tratamento e resistência a antimaláricos

No Brasil, o tratamento da malária é distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e faz parte da Relação Nacional de Medicamentos (Rename) dentro do componente estratégico. Isso significa que a malária é classificada como doença

endêmica com impacto socioeconômico no país e o controle e tratamento dependem de um protocolo e normas padronizadas (7).

Os medicamentos só podem ser dispensados com a confirmação do diagnóstico por malária, o qual geralmente é feito por gota espessa, técnica padrão-ouro. Em localidades distantes (tribos indígenas e comunidades ribeirinhas) e sem acesso a profissionais treinados ou sem disponibilidade de exame por microscopia, os testes de diagnóstico rápido (TDR) são utilizados. Caso o exame seja negativo e os sintomas persistirem após 48 horas, recomenda-se realizar uma nova coleta e testagem (7,8).

O tratamento tem como objetivo interromper a esquizogonia sanguínea (responsável pelos sintomas da doença), destruir as formas latentes, responsáveis por recaídas em *P. vivax* e *P. ovale* e ainda impedir a transmissão para o vetor, a partir de medicamentos que eliminem as formas sexuadas (gametócitos) (Tabela 2) (40). É importante que sempre que possível, as doses sejam ajustadas de acordo com o peso do paciente, a fim de evitar toxicidade (8).

Tabela 2. Quadro resumo de fármacos antimaláricos utilizados no Brasil e seus mecanismos de ação.

Fármaco antimalárico	Espécie	Mecanismo de ação
Artemeter	<i>P. falciparum</i> , menores de 11 meses para <i>P. vivax</i> e recorrência de <i>P. vivax</i>	esquizonticida sanguíneo
Artesunato	<i>P. falciparum</i> , menores de 11 meses para <i>P. vivax</i> e recorrência de <i>P. vivax</i>	esquizonticida sanguíneo
Mefloquina	<i>P. falciparum</i> , menores de 11 meses para <i>P. vivax</i> e recorrência de <i>P. vivax</i>	esquizonticida sanguíneo
Cloroquina	<i>P. vivax</i>	esquizonticida

		sanguíneo
Lumefantrina	<i>P. falciparum</i> , menores de 11 meses para <i>P. vivax</i> e recorrência de <i>P.</i> <i>vivax</i>	esquizotocida sanguíneo
Primaquina	<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	esquizotocida teciduais e gametocida (comprovado para <i>P.falciparum</i>)

Fonte: (8,40,41)

Para *P. falciparum*, o tratamento no Brasil segue o recomendado pela OMS e consiste em uma farmacoterapia combinada com derivados de artemisinina (ACT) (1). Assim, recomenda-se o uso de artemeter + mefloquina ou artesunato + mefloquina. Para eliminar os gametócitos e assim impedir a transmissão para os vetores, a primaquina deve administrada no primeiro dia de tratamento, exceto em gestantes e menores de seis anos. No total, o tratamento com os derivados de artemisinina conclui-se em três dias (8).

Para *P. vivax*, o tratamento baseia-se na administração de cloroquina e primaquina. A cloroquina é utilizada para eliminar as formas sanguíneas enquanto, a primaquina tem por objetivo eliminar as formas latentes e assim evitando os episódios de recaídas (8,40). Entretanto, é importante ressaltar que a primaquina também tem ação nas formas assexuadas sanguíneas. O uso separado da cloroquina mostrou ser menos eficaz na eliminação das formas assexuadas diferentemente quando associada com a primaquina. Assim, a probabilidade de recrudescência (recorrência da doença a partir das formas sanguíneas) é menor (42).

O tratamento integral consiste em três dias de cloroquina e simultaneamente sete dias de primaquina (8). Diferente da recomendação da OMS, que desde 2012 preconiza 14 dias de tratamento para primaquina (43). A justificativa deve-se a maior adesão do paciente a um tratamento mais curto. Crianças até 11 meses não devem ser tratadas com cloroquina. O esquema dessa faixa etária consiste em artemeter + lumefantrina e doses baixas de primaquina. Ao contrário, gestantes não podem usar primaquina e caso

contraíam malária por *P. vivax*, o tratamento deve ser exclusivamente com cloroquina, estendendo-se a até o primeiro mês de lactação com doses profiláticas para prevenção de recaída (8).

Outro grupo que merece atenção no tratamento da malária *vivax* são os pacientes com deficiência em G6PD, uma enzima responsável em prevenir o dano oxidativo causado por radicais livres (44). Oito por cento da população mundial propensa a contrair malária *vivax* possui a deficiência desta enzima (45); na Amazônica Brasileira, isso representa 5% da população (46). Por consequência, esses indivíduos ao realizarem o tratamento com primaquina, podem desenvolver uma anemia hemolítica grave e manifestações clínicas como urina escura, fadiga e icterícia (45). Sendo assim, é recomendável que se disponível, seja realizado o teste para detecção de deficiência de G6PD antes do uso de primaquina (47). Assim, o paciente com atividade enzimática abaixo de 30% deve usar, após quatro dias de tratamento com cloroquina, uma dose semanal de primaquina por oito semanas, a fim de realizar um tratamento seguro (8).

Embora a maioria dos pacientes evoluem para uma cura eficaz por meio dos tratamentos supracitados, diversos estudos apontam a resistência de antimaláricos. Dados revelaram resistência a cloroquina (CQ-R) em *P. falciparum* há mais de 22 anos, principalmente na América do Sul e na região sudeste da Ásia (41), que também aponta casos mais recentes de resistência à artemisinina (48). Em 2020, a OMS relatou uma taxa na falha terapêutica para os ACTs em torno de 10% no continente Africano, acima de 10% em diversos países do continente Asiático e reconheceu diversos marcadores para resistência de artemisinina no gene *pfkelch13* (1). Para cloroquina, os marcadores que envolvem resistência são nos genes *pfprt-o and pfmdr1* (49).

Relatos de CQ-R para o tratamento de *P. vivax* tem sido recorrente em diversos países. O primeiro caso foi reportado 1989 na Papua Nova Guiné (50), e atualmente a literatura aponta CQ-R em diversos países: Bolívia, Etiópia, Guiana Francesa, Indonésia, Malásia, Peru e Tailândia (1,51,52). No Brasil, o primeiro relato para CQ-R em *P. vivax* datou-se em 1990, no estado de Rondônia (53). Em 1999, o primeiro caso foi reportado

no estado do Amazonas (54). Desde então, a taxa de CQ-R em *P. vivax* no estado já atingiu 10% (55); porém, outro estudo de 2014 apontou uma taxa de 5,2% (56). Da mesma forma que *P. falciparum*, a CQ-R em *P. vivax* também parece estar associada aos genes *pvcr1-o* e *pvmdr1* (52,57,58). Ademais, existem pequenas evidências que o aminoácido F1076L seja um possível marcador para CQ-R no gene *pfmdr1* (58).

Como descrito na tabela 2, tratamentos alternativos são realizados para pacientes com recorrência em *P. vivax* no Brasil. Contudo, apenas por diagnóstico molecular é possível afirmar se a recorrência é caso de CQ-R (51,57), pois outro fator que também acarreta recorrência é a falta de adesão ao tratamento pelo paciente (8). Para casos de CQ-R, estudos clínicos mostraram eficácia comprovada dos antimaláricos mefloquina, atovaquona + proguanil, halofantrina, piperaquina, artesunato e pironaridina (40).

Em se tratando de resistência à primaquina, poucos estudos relatam falha terapêutica em *P. vivax* (59). Além disso, ainda é confusa a diferença entre falha terapêutica e a resistência ao medicamento de fato. Um estudo verificou que a maioria dos casos reportados como resistência eram de fato de pacientes com uma potencial subdosagem de 15 mg/dia de primaquina por cinco dias, enquanto que a dose preconizada pela OMS é de 15mg/dia por 14 dias (60). Outro estudo demonstrou que mesmo utilizando uma alta dose de primaquina sem a adição de um fármaco esquizonticida sanguíneo, a probabilidade de ter uma recaída aumenta em mais de 80%. Por isso, a importância de associar a droga com um esquizonticida para diminuir as chances de recidiva, como preconizado pelos protocolos nacionais e internacionais (59,61).

Estudos retrospectivos, relatos de casos e ensaios clínicos realizados entre 1997 a 2014 apontam possíveis casos de resistência à primaquina, após os pacientes terem apresentado recaída. Contudo, alguns são estudos com vieses, doses baixas de primaquina ou ainda sem a adição de um esquizonticida sanguíneo. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias sobre o mecanismo exato de resistência à primaquina por *P.*

vivax. Porém há uma hipótese que as diversas cepas desta espécie podem variar quanto a sensibilidade a este medicamento (59).

Frente a esta problemática de possíveis casos de resistência à primaquina, a tafenoquina surgiu como uma nova promessa para o *P. vivax*. Ponsa e colaboradores (2003) (62) já haviam demonstrado significativa atividade esporontocida. Ademais, outros estudos reportam que a tafenoquina é menos tóxica e mais eficaz (63,64). Corroborando com esses achados, um estudo clínico multicêntrico conduzido na Etiópia, Peru, Brasil, Camboja, Tailândia e Filipinas reportou que a tafenoquina é capaz de gerar a cura radical nesta espécie, eliminando as formas hipnozoítas do fígado com apenas uma única dose (65).

Por todo o exposto, pelo surgimento de CQ-R em muitas regiões endêmicas, a problemática da recaída em malária *vivax* e a primaquina ser a única droga licenciada a ser administrada como esquizontocida tecidual e gametocida, o desenvolvimento de novos fármacos que promovam a cura radical, o bloqueio de transmissão, além de novas estratégias para o controle e eliminação da doença são de extrema importância e serão discutidos no tópico a seguir.

1.5 Eliminação da malária

A eliminação da malária é definida como a interrupção da transmissão autóctone de uma determinada espécie da doença em uma área definida. Para um país receber a certificação de área livre de malária, é preciso que ocorra a interrupção total de todas as espécies circulantes por um período mínimo de três anos (1,7).

Segundo a OMS, é possível eliminar a malária com base nas experiências adquiridas ao longo de todos os anos de implementação de protocolos desde a década de 60, além das recentes estratégias utilizadas aliadas com as pesquisas em constante desenvolvimento. Assim, desde 2016, com uma data base de 2015, foi criada a *Global Technical Strategy for Malaria* (GTS) que possui como metas diminuir a incidência e a taxa de mortalidade em pelo menos 40% até 2020, 75% até 2025 e 90% até 2030. Para

o alcance das metas a GTS prevê o estabelecimento de três pilares: Garantir acesso universal à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento da malária; acelerar os esforços para a eliminação e obtenção do *status* livre de malária e transformar a vigilância de malária em intervenção essencial (1,66).

De acordo com a Figura 1, o Brasil está estagnado, não houve crescimento nem diminuição dos casos de malária desde 2015. Ademais, o Plano Nacional de Eliminação tem como meta até 2035: registrar menos de 14 mil casos em 2030; eliminar os casos de *P. falciparum* até 2030; eliminar a transmissão de malária até o ano de 2035 e reduzir o número de óbitos para zero até o ano de 2030 (7,67).

No Brasil, a queda de casos entre 2019 e 2020 foi de 14%. Entretanto, em decorrência da pandemia do COVID-19, os planos de eliminação da malária sofreram algumas interferências negativas em diversos países. Nas Américas a situação foi especialmente preocupante nas áreas indígenas entre as comunidades residentes no Peru e no Amazonas. Devido à prioridade no atendimento desde a prevenção ao tratamento de COVID-19, houve uma redução nos profissionais de saúde atuantes na malária e, por consequência, diminuição de diagnósticos. Dessa forma, a OMS recomenda que as ações voltadas a eliminação da malária continuem por meio de articulação entre os setores governamentais responsáveis por ambas as doenças e medidas de proteção aos trabalhadores da saúde para que as ações continuem de forma segura (1,67).

Sendo assim, a OMS publicou um guia com estratégias para a eliminação da malária. De forma geral, são elas: estratificação geográfica por meio da intensidade de transmissão da doença, controle do vetor através de inseticidas, otimização da detecção de casos de forma passiva e ativa e vigilância. Em estratificação geográfica, os órgãos responsáveis pelo município devem estratificar as regiões classificando-as em propensas ou não a malária e dentro da área categorizada como propensa a malária, dividir em subcategorias com focos ativos, baixa transmissão e alta transmissão. O objetivo da

estratificação é focar nas áreas com malária ativa maximizando esforços para diminuir ou inibir a transmissão (68).

Um dos esforços utilizados e mencionado anteriormente é o uso de inseticidas. No Brasil, os mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração (MILD) juntamente com a borrifação residual intradomiciliar (BRI) são ferramentas utilizadas. Possui uma boa aceitação pelo público de regiões endêmicas. Os tipos mais utilizados são o de rede (com alfa cipermetrina a 0,67%) e os de cama (permetrina a 2%) (69). Entretanto, nas Américas, dados da literatura apontam resistência do vetor a inseticidas principalmente na classe piretróide, grupo químico dos inseticidas supracitados (1).

Outra estratégia utilizada quando os casos já estão controlados para aumentar a detecção de casos novos e impedir um novo surto na área, é utilizando as técnicas de detecção ativa e passiva de casos (DAC e DPC). Segundo a OMS, ambas são satisfatórias quando utilizadas de forma apropriada (68). A DAC é utilizada em localização de difícil acesso e com alto risco para malária, com busca ativa de pacientes positivos para a doença, testando tanto pacientes assintomáticos quanto sintomáticos, enquanto a DPC deve ser introduzida em áreas de fácil acesso e sem alto risco de malária, testando apenas indivíduos sintomáticos. Em ambas as técnicas, é necessário um diagnóstico preciso. Caso a microscopia não seja possível, testes rápidos de qualidade devem ser utilizados para que a eficácia seja garantida (70).

E por fim, a última e mais importante estratégia para eliminação da malária recomendada pela OMS é a vigilância constante da doença em regiões endêmicas. Para isso, é importante que todas as ferramentas supracitadas sejam realizadas de forma eficaz. São atividades-chaves de uma vigilância de sucesso: testagem de alta cobertura e rápida, assegurando que toda a área endêmica esteja em constante vigilância e seja notificada pelos órgãos responsáveis; participação ativa de trabalhadores de saúde, e tratamento eficaz, gerando a cura radical (68).

Outras ferramentas não citadas pelo guia da OMS também podem ser utilizadas, como o tratamento medicamentoso em massa de pessoas que vivem em área de risco, denominado, em inglês, de *mass drug administration* (MDA). Embora não seja recomendado pela OMS realizar MDA para *P. vivax* (71), em *P. falciparum* a estratégia tem sido utilizada de forma eficaz, com o objetivo de reduzir as taxas de mortalidade e as taxas de transmissão. Contudo, é importante que o MDA seja realizado de forma segura principalmente se tratando na administração da primaquina (72,73).

Como um planejamento futuro, diversos laboratórios estudam a implementação da vacina como forma de eliminação da malária. Geralmente, elas são classificadas em três tipos: vacinas pré-eritrocíticas, com o objetivo de prevenir o ciclo eritrocítico; vacinas eritrocíticas, com objetivo de eliminar as formas sanguíneas; e a vacina bloqueio de transmissão, que visa impedir a infecção dos mosquitos pela doença e assim impedir a transmissão para novos indivíduos. A maioria das vacinas ainda estão em fases de testes e a grande maioria é voltada para *P. falciparum*. Porém, a vacina RTS'S, comercialmente denominada Mosquirix™ já possui parecer positivo por órgãos regulatórios em crianças da África Subsaariana. Quatro doses da vacina reduziram os casos de malária em 36% ao longo de quatro anos de acompanhamento. A vacina age na fase esporogônica do ciclo, gerando uma produção de anticorpos IgG específicos para proteína circunsporozoíta (CSP), induzindo assim uma proteção contra malária (73,74).

Algumas vacinas em fase Ia já estão sendo testadas para *P. vivax*, como a ChAd63/MVA PvDBP (73,75). Porém, a hipótese é que o uso sinérgico de diversos tipos de vacinas terá uma eficácia maior na eliminação da doença, pois a ação será em diversas fases de desenvolvimento do protozoário e impactará na transmissão da doença (73).

Outras estratégias relacionadas ao bloqueio de transmissão podem ser utilizadas. Sendo assim, o tópico a seguir explana sobre o desafio do desenvolvimento de fármacos para bloqueio de transmissão, uma estratégia promissora e fundamental dentre os esforços globais para a eliminação da malária (76).

1.6 Bloqueio de transmissão

Nos últimos anos, novas estratégias têm surgido para a eliminação da malária. Assim, as ferramentas para o bloqueio de transmissão (FBT) tem sido utilizada neste contexto. Como mencionado anteriormente, diversos estudos clínicos estão em desenvolvimento para vacinas de bloqueio de transmissão (77). Outro grande foco nas FBT é o desenvolvimento de fármacos com ação gametocida. Assim, fármacos que eliminem o gametócito ao serem administrados para o paciente, impedirão a infecção do vetor e bloqueará a transmissão da doença (12).

Birkholtz e colaboradores (2016) (76) descreveram a importância do uso de fármacos que realizem o bloqueio de transmissão. A Figura 6 esquematiza o que ocorre quando um paciente utiliza apenas fármacos com ação esquizonticidas, perpetuando a transmissão para o vetor. Entretanto, quando o paciente utiliza a combinação de fármacos esquizonticida e outro com ação de bloqueio de transmissão, ocorre a quebra do ciclo, beneficiando a comunidade como um todo.

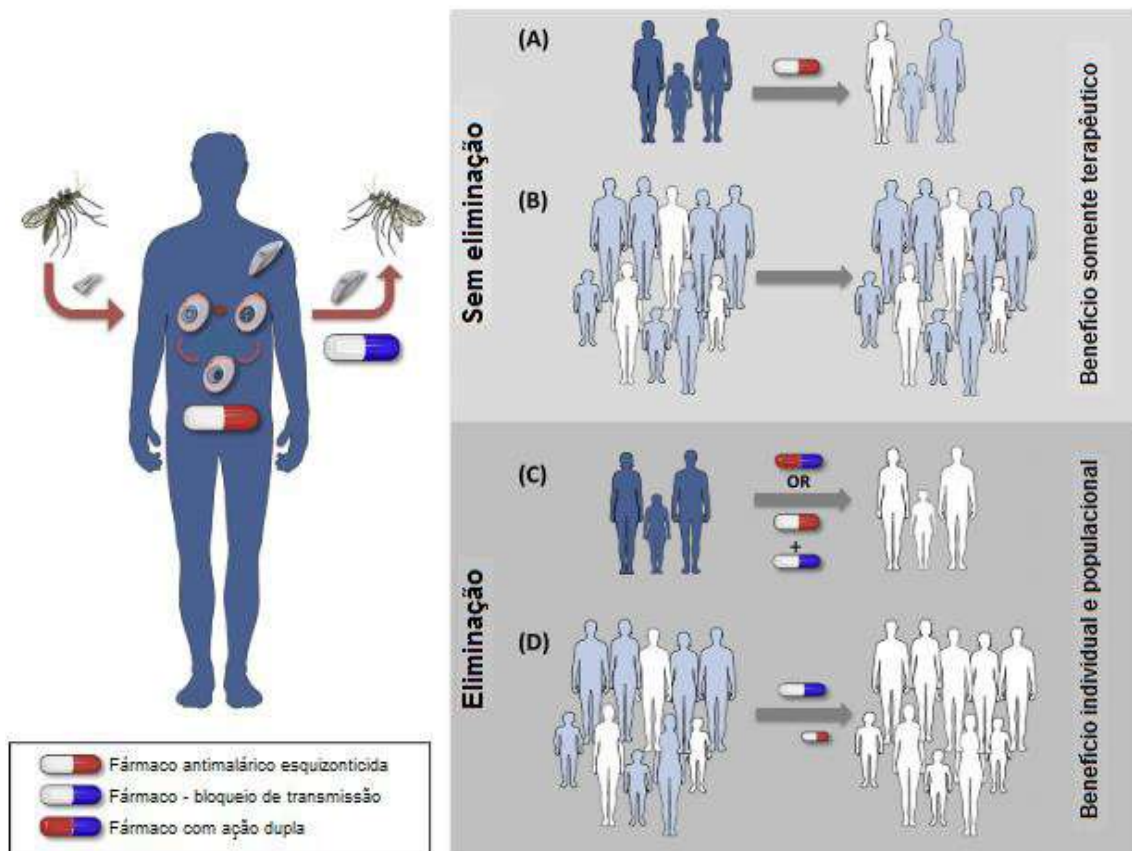


Figura 6. Esquema demonstrando a eficácia de um fármaco com ação de bloqueio de transmissão. (A) Pacientes sintomáticos (azul escuro) que utilizaram apenas fármaco esquizonticida, podendo ser um paciente assintomático e carreadores de gametócitos (azul claro), perpetuando o ciclo da doença, como demonstrado em (B). (C) Pacientes sintomáticos que utilizaram combinação de fármacos esquizonticida e com ação de bloqueio de transmissão ou um único fármaco com ambas as ações, eliminando todas as formas do protozoário. (D) Pacientes assintomáticos utilizando a combinação de fármacos e consequentemente interrompendo o ciclo da doença, beneficiando a população local. Fonte: Birkholtz et al, 2016 (modificado).

A seguir, será explanado detalhes sobre as metodologias utilizadas para testagem, assim como drogas e fármacos candidatos ao bloqueio de transmissão

1.6.1 Metodologias *ex vivo*

Há diversas metodologias *ex vivo* em sistemas como *high throughput screening* (HTS), onde centenas de drogas pode ser triadas de uma única vez para verificar a eficácia na eliminação de gametócitos. A tabela abaixo lista os principais métodos e espécies utilizadas. Com protocolos de cultivo padronizados e a facilidade de possuir cepas modificadas com fluorescência em todos os estágios ou somente em um único (78–80), diversas triagens já foram realizadas em *P. falciparum* e *P. berghei*. Como exemplo de grandes bibliotecas de fármacos triados por esse sistema, pode-se citar os compostos da *Medicine for Malaria Venture* (MMV) e GlaxoSmithKline Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) (79–83).

Tabela 3. Principais metodologias utilizadas no sistema *high throughput screening* para drogas de bloqueio de transmissão

Método	Espécie	Estágio	Referência
Luciferase	<i>P. falciparum</i>	Gametócitos expressando o gene CBG99 luciferase	(84)
Lactato desidrogenase	<i>P. falciparum</i>	Gametócitos	(84)
Fluorescência – alamar blue	<i>P. falciparum</i>	Gametócitos	(85,86)
Luciferase	<i>P. falciparum</i> NF54	Gametócitos	(87–89)
SYBR Green I based DNA	<i>P. falciparum</i> NF54	Gametócitos	(80)
Fluorescência	<i>P. falciparum</i> NF54	Gametas e zigoto	(79)
Fluorescência	<i>P. berghei</i> expressando GPF	Oocinetos	(78,79)

P. berghei é uma espécie murina que também é utilizada para triagens em áreas não endêmicas ou de difícil acesso. Além disso, por ser uma espécie amplamente conhecida em seu cultivo, infecção em camundongos e de fácil manejo em infecções experimentais, é possível desenvolver e validar protocolos eficazes para uma triagem inicial no sistema HTS (90,91). Atualmente, já existem diversas cepas desta espécie modificadas para metodologias HTS. Por exemplo, o *P. berghei Ookluc*, o qual permite a fluorescência apenas no gene promotor dos oocinetos (83). Também é possível citar a cepa *P. berghei* 820 cl1m1cl1, a qual somente os gametócitos são fluorescente: gametas femininos expressam RFP (vermelho) enquanto que os masculinos expressam GFP (verde) (92).

Em *P. vivax* não há publicações na literatura com estes compostos e isso deve-se a dificuldade de cultivo desta espécie; ausência de protocolos de HTS padronizados (justamente pela ausência de cultura em gametócitos); uso limitado em modelos animais como os primatas e além da mesma ser negligenciada em decorrência do grande problema de saúde pública que a espécie *P. falciparum* proporciona ao continente africano (11,93).

1.6.2 Metodologia *in vivo*: ensaio de membrana

Após a triagem inicial, é importante verificar se a droga ou fármaco também possui eficácia em experimentos *in vivo*. Assim, utiliza-se a metodologia padrão ouro denominada ensaio de membrana, em inglês, *membrane feeding assay* (MFA). Esta, pode ser realizada de duas formas: quando o sangue de um paciente com malária é coletado e logo em seguida a droga adicionada. Então, a mistura é prontamente acondicionada em um sistema de alimentação por membrana, onde anofelinos farão o repasto sanguíneo (Figura 7A); ou ainda quando o sangue coletado é colocado por horas em cultura com a droga e posteriormente adicionado no mesmo sistema de alimentação. A primeira é denominada *direct membrane feeding assay* (DMFA), enquanto a segunda é denominada *standard membrane feeding assay* (SMFA) (76,94).

DMFA é mais utilizada para o *P. vivax* em áreas endêmicas, pois esta espécie não é facilmente cultivada. Contudo, o SMFA é amplamente utilizado em *P. falciparum* devido ser uma espécie com protocolos de cultivo padronizados (76,93,95). Assim, após sete a nove dias da infecção inicial, os anofelinos são dissecados e por meio de microscopia é possível visualizar o intestino com a presença ou não dos oocistos (Figura 7B). Quanto menos oocistos presentes no intestino do anofelino, maior é a eficácia da droga no bloqueio de transmissão (95).

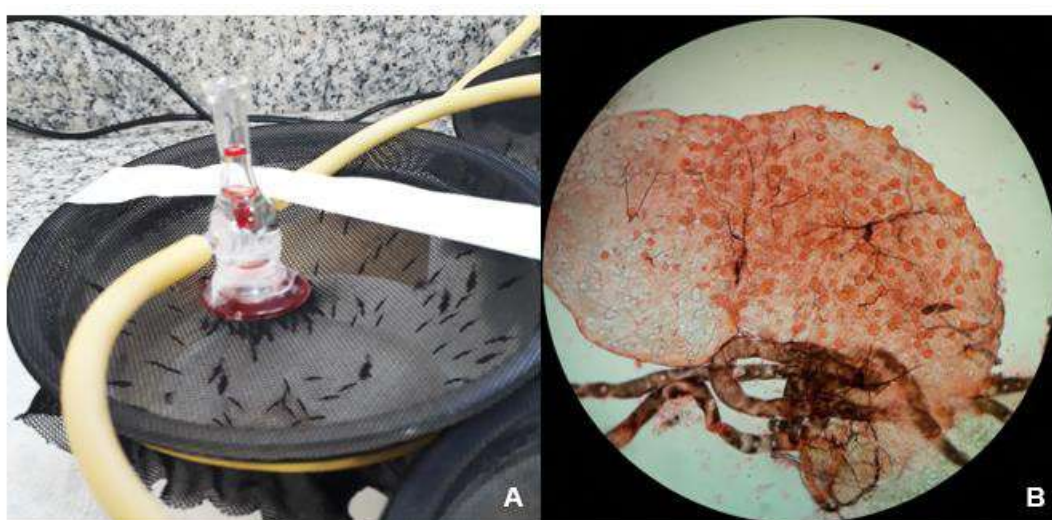


Figura 7. Metodologia de ensaio em membrana. (A) Sistema de alimentação por membrana. (B) Intestino de um anofelino dissecado e corado por meio de mercurocromo. No interior é possível visualizar os oocistos em formas arredondadas em cor laranja escuro. Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Há diversos estudos na literatura utilizando a técnica de SMFA em *P. falciparum* (79,81,82,96), inclusive com a primaquina, já mencionada anteriormente no item 1.4 por sua ação gametocida (97). Contudo, em *P. vivax* não há estudos que comprovem a eficácia deste medicamento. Um único estudo publicado em 2003 demonstrou que a primaquina não realizava bloqueio de transmissão nesta espécie (62).

1.6.3 Drogas e fármacos candidatos ao bloqueio de transmissão

A Tabela 4 apresenta diversos estudos realizados nos últimos anos com diversos fármacos candidatos ao bloqueio de transmissão utilizando a metodologia MFA. É possível verificar que a maioria dos estudos, da mesma forma que nas metodologias *ex vivo*, também são em *P. falciparum*. Além de alguns fármacos já disponibilizados no mercado como antimaláricos e com outras indicações, é possível verificar que alguns compostos do MMV também já foram testados *in vivo* para *P. falciparum*.

Tabela 4. Fármacos com atividade acima de 50% para bloqueio de transmissão em *P. falciparum* e *P. vivax* utilizando a metodologia MFA.

Fármacos	Espécie de plasmódio	Tipo de alimentação	Concentração Efetiva	Referência
Artesunato			0,2, 1,0 e 5,0 ng/mL	(97)
Atovaquona			16,2 e 35,3 nM	(98)
Azul de metileno			38 nM, 0,5 uM e 5 µM	(80,96)
Clotrimazol			0,5 e 5 µM	(80)
Deferoxamina			25 µM	(99)
FBS0701			12,5 e 25 µM	(99)
Ivermectina			10,7 ng/mL	(100)
Lumefantrina			50, 500 e 500 nM	(101)
MMV000448			10 µM	(102)
MMV007116			1 µM	(79)
MMV085203			1 µM	(79)
MMV019881			10 µM	(102)
MMV019918			10 µM	(102)
MMV665827			10 µM	(102)
MMV665941			10 µM	(102)
MMV665980			10 µM	(102)
MMV666021			10 µM	(102)
MMV667491			1 µM	(79)
Monensina			1,3 nM (IC50)	(84)
NITD609			500, 50 e 5 nM	(101)
OZ439			100 e 1000 nM	(103)
Pamoato de Pirvíneo			0,5 e 5 µM	(80)
Partenina			25, 50 e 100 ug/mL	(104)
Pirimetamina			154,7 ng/mL	(105)
Pironaridina			1000 nM	(103)
Primaquina	<i>P. falciparum</i>	SMFA	100, 300 e 900 ng/mL	(97)

Quinina			900 ng/mL	(97)
Salinomicina			18 nM (IC50)	(84)
Sulfadoxina			33,8 and 61 ug/mL	(105)
Sulfadoxina-Pirimetamina			61 ug/mL (S) + 154,7 ng/mL (P) e 33,8 ug/mL (S) + 66,6 ng/mL (P)	(105)
TCMDC - 123475			1,17 µM	(82)
TCMDC - 123767			1 µM	(81)
TCMDC - 125114			0,67 µM	(82)
TCMDC - 125133			0,54 µM	(82)
TCMDC - 125345			1 µM	(81)
TCMDC - 125487			0,27 µM	(82)
TCMDC - 125849			0,12 µM	(82)
TCMDC - 137453			0,31 µM	(82)
TCMDC - 141070			2 µM	(81)
TCMDC - 141154			1 µM	(81)
TCMDC - 141698			1 µM	(81)
Ivermectina			10, 20 and 40 ng/mL	(106)
WR-250547	<i>P. vivax</i>	DMFA	100 mg/kg do camundongo – droga primeiramente metabolizada	(62)
Diidroartemisinina - piperaquina			n/a	(107)

O MMV é uma fundação sem fins lucrativos que tem por objetivo descobrir e desenvolver novos e eficazes fármacos antimaláricos contra cepas resistentes de *P. falciparum* que possam ser administradas com segurança em grávidas, bebês e crianças menores de seis anos, além de desenvolver fármacos contra *P. vivax* para eliminar formas assexuadas e sexuadas da doença (108).

Dessa forma, o MMV criou *The Malaria Box*, um conjunto de drogas previamente testadas contra estágios assexuados de *P. falciparum* (*ex vivo*) e distribuídas gratuitamente contendo mais de quatrocentos diferentes compostos com atividade antimalárica (109). Destes quatrocentos, duzentos são “droga-like”, com propósito de serem pesquisados e desenvolvidos como medicamentos por via oral; já a outra metade são compostos *probe-like* com o intuito de serem utilizados como ferramentas biológicas em pesquisas sobre a doença (108).

Dentre as drogas disponibilizadas pelo MMV, várias possuem características para atividade gametocida, ou seja, são fortes candidatas para o bloqueio de transmissão. Algumas já foram testadas para o *P. falciparum* e obteve-se sucesso, como por exemplo os compostos citados na Tabela 4, todos com bloqueio de transmissão acima de 50%. (79,80).

Outro fármaco com atividade conhecida em *P. falciparum*, mas com poucos estudos para *P. vivax* é o azul de metileno (AM). Um corante solúvel em água e sintetizado pela primeira vez em 1876, o AM foi utilizado como antimalárico pela primeira vez em 1891 por Guttman e Ehrlich, os quais reportaram a cura de dois pacientes tratados com o medicamento (110). Antes e durante a segunda guerra mundial, o AM teve um grande papel como antimalárico que perdurou até o fim da década de 50 (111).

Atualmente, o AM é registrado em diversos países com indicações para diversos tipos de doenças desde infecções do trato urinário a câncer (112). Contudo, a volta do interesse neste fármaco para o tratamento da malária advém da descoberta do seu mecanismo de ação. O AM em *P. falciparum* atua inibindo a enzima glutatona redutase (111). Além disso, o fármaco também é capaz de aumentar os níveis de moléculas oxidantes que agem diretamente nos estágios assexuados e sexuados desta espécie (96,113–115).

Como resultado, diversos estudos têm sido realizados contra o *P. falciparum*. O fármaco mostrou-se eficaz nas formas assexuadas e também assexuadas, como mencionado na Tabela 4. Ademais, estudos clínicos randomizados conduzidos na África demonstraram que o AM é capaz de reduzir a transmissão, além de ter se mostrado seguro para ser administrado em pacientes deficientes da enzima G6PD (116–119). Destaque para o estudo de fase II realizado em Bamako, Mali, o qual associou AM 15mg/kg com diidroartemisinina-piperquina por três dias e teve 100% de bloqueio de transmissão na metodologia DMFA (118).

Contudo, pouco se sabe da ação do AM em *P. vivax*. Atualmente, há dois trabalhos com experimentos *ex vivo* demonstrando eficácia contra as formas assexuadas. Suwanarusk e colaboradores (2015) (120) demonstraram que isolados de *P. vivax* sensíveis à cloroquina são suscetíveis ao AM. Entretanto, quando o AM foi associado à cloroquina houve redução da sua eficácia. O outro estudo conduzido por Wirjanata e colaboradores (2015) (121) apresentou excelente resultado do AM contra isolados de *P. vivax* de uma região da Indonésia com prevalência de cepas multirresistentes a antimaláricos.

1.7 Relevância do estudo

O *P. vivax*, espécie endêmica na região amazônica, assola diversos estados do Brasil. Somente no ano de 2019 foram 157.454 casos de malária. Com a pandemia do COVID-19, a população de comunidades endêmicas ficaram parcialmente desassistidas pelas autoridades de saúde pública local e nacional (1,7,8).

É uma espécie de difícil manejo laboratorial, com grande dificuldade da implementação de uma cultura a longo termo. Sendo assim, não é viável para geração de cepas geneticamente modificadas com promotores fluorescentes, como em *P. falciparum* e *P. berghei*, o que facilita o desenvolvimento de metodologias HTS. Ademais, o modelo animal (primatas) é limitado e dispendioso (11,93).

Nos últimos anos, a OMS vem trabalhando para a eliminação da malária no mundo. No Brasil, a meta primária é eliminar o *P. falciparum*, que não é a espécie predominante nas áreas endêmicas. Entretanto, é fundamental que a vigilância em *P. vivax* mantenha-se constante, principalmente em localizações de difícil acesso como comunidades ribeirinhas e indígenas (1,7,68).

Dessa forma, a sinergia de ferramentas para a eliminação da malária é essencial, e a pesquisa e implementação de fármacos que bloqueiam a transmissão são de suma

importância principalmente quando dados da literatura atual apontam para a resistência a diversos medicamentos antimaláricos (42,52,57).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a eficácia de drogas no bloqueio de transmissão de *P. vivax*.

2.2 Específico

- Padronizar uma plataforma de triagem para testagem de compostos em *P. vivax*;
- Estimar o efeito dos compostos MMV selecionados na infectividade de mosquitos por *P. vivax*;
- Analisar o efeito dos compostos MMV selecionados contra oocinetos de *P. vivax*;
- Analisar o efeito do composto azul de metileno contra formas assexuadas e sexuadas de *P. vivax*;

3. PRODUTO DA TESE

Os resultados dessa tese são apresentados na forma de artigo científico.

Manuscrito 1 - Submetido e aceito pela revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz sob o título: Transmission-blocking compound candidates against *Plasmodium vivax* using *P. berghei* as an initial screening

Manuscrito 2 - A ser submetido sob o título: Methylene blue antimalarial activity against asexual and sexual stages of *Plasmodium vivax*

3.1 Manuscrito científico 1

Title: Transmission-blocking compound candidates against *Plasmodium vivax* using *P. berghei* as an initial screening

Camila Fabbri^{1,2,3}, Alexandre Oliveira Trindade¹, Francys Sayara Andrade^{1,2}, Macejane Oliveira Ferreira^{1,2}, Claudia María Ríos-Velásquez⁴, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda^{1,2,4}, Wuelton Marcelo Monteiro^{1,2}, Fabio Trindade Maranhão Costa^{4,5}, Rogerio Amino⁶, Stefanie Costa Pinto Lopes^{1,2,4*}

¹Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³Centro Universitário Fametro, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil

⁵Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁶Unit of Malaria Infection & Immunity, Department of Parasites and Insect Vectors, Institut Pasteur, Paris, Île-de-France, France

Corresponding author: Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia. Instituto Leônidas & Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Rua Terezina, 476.

Adrianópolis. 69057-070. Manaus – Amazonas – Brazil. Phone: (+55) 92-3621-2334. E-mail: stefaniecplopes@gmail.com

Orcid number: <https://orcid.org/0000-0002-6981-2192>

ABSTRACT

BACKGROUND: Different strategies for improvement of malaria control and elimination are based on the blockage of malaria parasite transmission to the mosquito vector. These strategies include the drugs that target the plasmodial sexual stages in humans and the early developmental stages inside mosquitoes. **OBJECTIVES:** Here we tested Malaria Box compounds in order to evaluate their activity against male and female gametocytes in *Plasmodium berghei*, mosquito infection in *P. vivax* and ookinete formation in both species. **METHODS/FINDINGS:** The membrane feeding assay and the development of ookinetes by a 24h *ex vivo* culture and the ookinete yield per 1000 erythrocytes were used to test transmission-blocking potential of the Malaria Box compounds in *P. vivax*. For *P. berghei* we used flow cytometry to evaluate male and female gametocyte time course and fluorescence microscopy to check the ookinete development. The two species used in this study showed similar results concerning the compounds' activity against gametocytes and ookinetes, which were different from those in *P. falciparum*. In addition, from the eight Malaria Box compounds tested in both species, compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 were selected as a hit compounds due the high inhibition observed. **CONCLUSION:** Our results showed that *P. berghei* is suitable as an initial screening system to test compounds against *P. vivax*.

Keywords: Malaria Box, membrane feeding assay and gametocytes

Sponsorship: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant 442849/2019-2), Fundação Oswaldo Cruz (Programa INOVA Novos Talentos), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM;

EDITAL N. 005/2019 - PAPAC). FTMC is supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant # 2017/18611-7. FTMC, MVGL and WMM are CNPq research fellows.

INTRODUCTION

Despite tremendous efforts, the global elimination of malaria is still a challenge for countries that have this endemic disease. *Anopheles* mosquitoes are responsible for the transmission and they became infected by ingesting *Plasmodium* gametocytes during a blood meal. These gametocytes undergo activation and a maturation process called gametogenesis and then disrupt the parasitophorous vacuole and the cell membrane to egress the host cell. Each male gametocyte forms eight microgametes by the exflagellation process, and then fertilizes the macrogamete (female gamete) giving birth to a zygote. The zygote undergoes meiosis and originates motile ookinetes that crosses the mosquito's midgut epithelial barrier to reach the basal lamina, where it develops an oocyst. After several multiplications, hundreds of sporozoites are formed and released to the hemolymph; thereafter they reach the salivary glands where it stay until being injected into another vertebrate host during a new mosquito blood-feeding. These five stages of *Plasmodium* spp cycle are targets for the development of new compounds and strategies to control parasite transmission. ⁽¹⁻⁴⁾

Considering the unique features of *Plasmodium vivax* biology (e.g. lack of a long-term *in vitro* culture and the early appearance of gametocytes in the blood circulation) novel strategies for screening platforms of control strategies against this species are urged. Medicines for Malaria Venture (MMV), a not-for-profit public/private partnership organization, created a box with 400 compounds with asexual antimalarial activity known for *P. falciparum*, namely 'the Malaria Box'

(MB). Among these compounds, 200 have the potential to be developed as oral drugs. The other 200 are compounds that failed to be classified as potential oral drugs due to their physicochemical properties and are potential tools for probing biological mechanisms for malaria research.⁽³⁻⁵⁾ The MB compounds have been studied as potential transmission-blocking (T-B) drugs, i.e. gametocytocidal drugs that may decrease the infectious size of the reservoir by reducing gametocyte carriage.⁽¹⁾ There is a need to look for compounds that target the activated and highly vulnerable gametocytes when they are undergoing gamete and ookinete formation in the mosquito midgut.⁽⁶⁾

The gold-standard methodology to assess the effectiveness of malaria T-B interventions *in vivo* is the membrane feeding assay (MFA), a methodology that estimates the infection (the presence of oocysts) and intensity (the quantity of oocysts) rates by dissecting the mosquito's midgut and observing oocysts under light microscopy.⁽⁷⁾ Several studies in *P. falciparum* used this assay to validate new *in vitro* methodologies to test compounds' efficacy, such as high-throughput assays, including the MB compounds.⁽⁸⁻¹⁰⁾ However, due to the considerable difference in biology between *P. falciparum* and *P. vivax*, compounds that show high activity in *P. falciparum* may not have the same effect on *P. vivax*.⁽²⁾ Furthermore, there are no reports of MB compound studies in *P. vivax*, possibly a result of several factors: (i) the lack of a long-term *in vitro* *P. vivax* culture system, (ii) the absence of a high-throughput assay to test a large number of compounds for *P. vivax*, (iii) the restriction of access to samples to endemic areas, since culture is not a viable alternative (iv) the expensive and limited access to animal models such as non-human primates, thus hampering experiments in non-endemic areas⁽¹¹⁾ and, (v) *P. vivax* disease burden is usually underestimated and dwarfed by the enormous disease burden caused by *P. falciparum* in sub-

Saharan Africa. ⁽²⁾ However, *P. vivax* is the predominant parasite in the Region of the Americas. In Brazil, about 99% of malaria transmission are concentrated in Legal Amazon region. ⁽¹²⁾

Here MB compounds were tested as a T-B's strategy for *P. vivax*. The direct membrane feeding assay methodology (DMFA) was used to check the ability of MB compounds to block the development of ookinetes *ex vivo*. We also investigated how the compounds specifically affected male and female gametocytes using a *P. berghei* rodent model.

MATERIALS AND METHODS

Malaria box compounds and reagents

To select the compounds to be tested in *P. vivax* T-B assays, since throughput assays are not feasible due to the lack of a continuous *in vitro* culture, we performed a literature review ^(8-10,13-15) (Supplementary file 1) regarding MB compounds with known activity against *P. falciparum* gametocytes. Eight compounds were found reported to have cytotoxicity/inhibition above 50% to gametocytes *in vitro* or standard membrane feeding assay (SMFA) as follows: MMV000248, MMV006172, MMV019555, MMV019881, MMV665830, MMV665878, MMV665941 and MMV667491. The majority of these compounds are in probe-like subset, except MMV000248 and MMV665878, which are in drug-like subset. The compounds were obtained from MolPort® and diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO) at 2.5 or 5 mg/mL as a solution stock and maintaining at -80°C. All reagents and medium were obtained from Sigma-Aldrich®.

Mice and P. berghei infection

P. berghei 820 c11m1c11, in which red fluorescent protein (RFP) is expressed by female gametocytes and green fluorescence protein (GFP) by male gametocytes⁽¹⁶⁾ were used to quantify male and female gametocytes by flow cytometry. *P. berghei* ANKA expressing GFP under the control of the hsp70 promoter⁽¹⁷⁾ were used for ookinete production. Four-week-old RjOrl:SWISS females (Elevage Janvier, France) were allocated to cages randomly with food (irradiated complete unique vegetable diet for rats, mice and hamsters Safe-diets) and water *ad libitum*. To infect mice, 100,000 to 150,000 parasites per microliter were inoculated by intraperitoneal injection. Parasites to be used in the *ex vivo/ in vitro* assays were obtained by tail blood or cardiac puncture 3 days after infection. Parasitemia and gametocytemia was checked by blood smear and/or by CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter).

Compounds activity against male and female P. berghei gametocytes - time course

To evaluate compound activity specifically against male and female *P. berghei* gametocytes, *P. berghei* 820 c11m1c11 parasites (final hematocrit of 2%, parasitemia ranging from 5 to 9%) were incubated *ex vivo* with MB compounds diluted in 245 μ L of gametocyte medium (RPMI1640 containing 25 mM HEPES, 20% fetal bovine serum and 10 mM sodium bicarbonate at pH 7.6) in a final concentration of 10 μ M in duplicates for a maximum of 24 hours using a humidity chamber with 5% CO₂ and 10% of O₂ at 36°C. Gametocytes viability was evaluated at 5 times points (1, 3, 6, 12 and 24 hours) by flow cytometry - CytoFLEX S. Data were analyzed by CytExpert 2.0 software.⁽¹⁸⁾

Production of P. berghei ookinetes and drug assay

To evaluate *P. berghei* male gametocyte exflagellation, 5 μ L of infected tail blood were obtained and mixed immediately with 20 μ L of ookinete medium (OokM) (RPMI1640 containing 25 mM HEPES, 20% fetal bovine serum, 10 mM sodium bicarbonate and 50 mM xanthurenic acid at pH 7.6). After 10 min, exflagellation centers were counted in 12-15 fields using 63x objective fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer). The same proportion of tail blood and OokM was used for ookinete formation. This solution was incubated for 2h at 21°C to allow completion of gametogenesis and fertilization in a well plate.⁽¹⁹⁾ Then, each culture was diluted with 225 μ L of OokM and MB compounds were added to a final concentration of 5 and 10 μ M. The plate was incubated at 21°C for a further 21–24 h to allow ookinete differentiation. Each compound was tested in 4 replicates. For ookinete measurement, 62.5 μ L of OokM was removed of each well plate and the blood pellet was mixed with OokM remaining. 10 μ L was added in a Glasstic slide 10 with grids (KOVA International) to count ookinetes in 27 fields using a 40x objective under fluorescence microscopy.

P. vivax - infected patients

Human participants were enrolled between October 2016 and May 2019. Patients diagnosed with *P. vivax* monoinfection by thick smears with parasitemia higher than 1,000 parasites/ μ l in the absence of antimalarial treatment in the last 60 days were invited to participate in the study. The ones that agree to participate signed the informed consent and a sample of 10 ml of blood was withdrawn before treatment. All patients received antimalarial treatment as established in the Brazilian Malaria Guidelines.⁽²⁰⁾

Anopheles spp. colony

Anopheles aquasalis females were reared at Laboratory of Medical Entomology at FMT-HVD in Manaus, Brazil. The colony was kept at a constant temperature (24–26°C) and relative humidity (70–80%). Larvae were hatched in room temperature water and fed with fish food (TetraMin®). The larvae were allowed to pupate and emerge into adults in an enclosed mesh-covered cage with water and 10% sucrose available. Female *An. aquasalis* used for experiments were 3–6 days old.

(21)

P. vivax Direct Membrane Feeding Assay (DMFA)

Blood samples collected in heparinized tubes were centrifuged to remove plasma. In a lamina flow chamber with a control temperature with 32–37°C, erythrocytes were washed twice with RPMI-1640 and resuspended in inactivated human serum to 40% hematocrit. One milliliter of this solution was offered to three groups: control (with no compound included), 5 µM and 10 µM of each MB compound in groups of 120-150 female mosquitoes via membrane feeder devices at 37°C until two hours as previously described. ⁽²¹⁾ The fully engorged mosquitoes were separated into different cages and kept until 7 days post-feeding with available water and sucrose solution (10%). At day 7-post infection, mosquitoes were frozen; their midguts were dissected and stained with mercurochrome in order to determine infection rate (percentage of mosquitoes with one or more oocyst(s) in the midgut) and intensity (mean number of oocysts/ dissected mosquitoes). The percentage drug inhibition of each compound was calculated by: [(mean of infection rate percentage control – mean of infection rate percentage MB compound) / mean of infection rate percentage control] x 100. For a consistent statistical analysis, only mosquitoes with at least one (1) oocyst in the midgut were considered in the infection intensity. Mosquitoes' survival was

monitored every day and mortality on day 7. The activity of each compound was evaluated in 5 (five) different *P. vivax* patient isolates (biological replicates).

Production of P. vivax ookinetes and drug assay

The production of *P. vivax* ookinetes was evaluated as previously described ⁽²²⁾, with few modifications. Briefly, parasites (hematocrit 20% and parasitemia between 130-860 parasites per 200 leucocytes) were incubated for one hour in exflagellation medium at 24-25°C. The resultant pellet of this incubation was resuspended in a 1:1 proportion with RPMI 1640 medium, followed by a purification using with 45% percoll (percoll diluted in 50% of Milli-Q® water and 5% of 10X RPMI 1640) in order to separate sexually mature stages of the parasite. Then, the resultant pellet was washed and resuspended in ookinete medium (IMDM medium, 50 mg/litre of hypoxanthine and 20% heat-inactivated AB human serum, pH 8,0) to a 20% hematocrit. The MMV019881, MMV665941, MMV665830 and MMV665878 compounds were added at a final concentration of 10 µM and incubated at 24-25°C for 24 hours in order to evaluate the inhibition of zygotes to ookinetes development. The ookinete yield was determined per 1000 erythrocytes while percentage drug inhibition was calculated by: $[(\text{Control yield} - \text{MB compound yield}) / \text{Control yield}] \times 100$. Three different *P. vivax* isolates (biological replicates) were evaluated for each compound.

Statistical analysis

Normality was evaluated by Shapiro-Wilk test. The comparison between two groups was performed by Mann Whitney test and multiple groups'. The comparison between three groups was performed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons posttest. All

correlations used the Spearman's correlation coefficient (r). All analyses were performed using GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software).

ETHICS

All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Institut Pasteur (CETEA Institut Pasteur 2013-0093, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche MESR 01324) and were performed in accordance with European guidelines and regulations (directive 2010/63/EU). All patients with *P. vivax* infection included in the project gave a written informed consent in protocols approved by FMT-HVD ethical board committee (CAAE: 50812815.0.0000.0005, approval number 1.358.054).

RESULTS

MB compounds have different activity in male and female P. berghei gametocytes

Eight MB compounds identified in the literature (chemical properties are described in Table S1) were chosen to be evaluated regarding their T-B activity against *P. berghei* and *P. vivax* malaria parasites.

Seven of the eight tested compounds showed activity against male and female *P. berghei* gametocytes after 24 hours of exposure, with the exception of compound MMV019881 that did not show any activity against male and female gametocytes (Table S2). In male gametocytes the MB compounds MMV000248, MMV019555, MMV665830, MMV665878, MMV665941 and MMV667491 demonstrated activity start-up time after 6 hours of exposure. In female

gametocytes, MMV665830 showed activity after 1 hour of exposure, MMV665941 after 3 hours of exposure, MMV000248, MMV019555, MMV665878 and MMV667491 after 6 hours of exposure.

Compound antimalarial activity at 10 μ M against male and female *P. berghei* gametocytes was calculated at 24 hours of exposure. Compounds MMV665830, MMV665878, MMV665941 and MMV667491 demonstrated cytotoxicity higher than 50% in both male and female gametocytes (Figure 1). In contrast, the compounds MMV000248 (59.9%) and MMV019555 (63.6%) were more active against female gametocytes.

Interestingly, when the cytotoxicity percentage was compared between male and female gametocytes for the same compound, MMV665830 (p -value <0.050) demonstrated higher activity in female gametocytes in comparison to MMV665941 (p -value <0.050), which showed higher activity against male gametocytes.

MB compounds are able to impair zygote to ookinete transformation in P. berghei

To evaluate the capacity to block the zygote to ookinete transformation, the eight MB compounds were tested against *P. berghei* in an *ex vivo* ookinete culture (Table I). The compounds MMV019555, MMV665830, MMV665878 and MMV665941 showed a decrease in the number of ookinetes after 24 hours of incubation when compared to the control group in both concentrations tested. Importantly, at the highest concentration, treatment with compounds MMV019555 and MMV665941 completely abrogated ookinete formation. Indeed, these compounds were effective even at the lowest concentration (5 μ M) tested. Other compounds also showed high inhibition rates at both concentrations: MMV665830 and MMV665878.

MB compounds have activity against P. vivax sexual stages in vivo

To evaluate the eight MB compounds activity in blocking the transmission of *P. vivax* to mosquitoes the gold standard DMFA was used in five independent assays with different isolates and a total of 7,482 *Anopheles aquasalis* mosquitoes.

No compounds were able to reduce the infection rate significantly at the lowest concentration. However, there was an effect on infection intensity, with compounds MMV006172, MMV665941 and MMV667491 showing a decrease in the number of oocysts per midgut when compared to the control group (Table II).

At the highest concentration the compounds MMV00248, MMV006172, MMV665830, MMV665878, MMV665941 and MMV667491 showed a decreased infection rate when compared to the control. Only the compounds MMV006172, MMV665941 and MMV667491 affected infection intensity, with a reduced the number of oocysts per midgut compared to the control (Table II). The compounds MMV019555 and MMV019881 did not show any significant activity concerning infection and intensity rate at both concentrations tested.

MMV665941 caused more than 50% inhibition at 5 μ M and 10 μ M concentrations, while MMV00248, MMV006172, MMV665830 and MMV665878 showed inhibition only at the highest concentration used. No MB compounds here evaluated showed any impact in mosquito mortality and survival when compared to the control group (Table S3 e Figure S1).

MB compounds have activity against zygote to ookinete transformation in P. vivax

Compounds showing higher than 60% inhibition were considered as primary hits, with a second *ex vivo* methodology performed to confirm these findings. The compounds MMV665830,

MMV665878 and MMV665941 (inhibition higher than 60% on DMFA methodology) and MMV019881 (negative control) were selected to evaluate the capacity to inhibit the zygote to ookinete transformation *ex vivo*.

After standardization of the method, which was conducted using the methodology described ⁽²²⁾, the four MB compounds were tested (Table III). The compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 showed a reduction in ookinete development when compared with the control group that was higher than 60%. The low activity of MMV019881 compound showed by DMFA was confirmed with this methodology, with no statistic difference when compare to the control group.

Hence, the compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 have presented an inhibitory tendency profile resembling the DMFA.

DISCUSSION

The eight MB compounds evaluated in this study demonstrated higher than 50% activity against gametocytes than the majority of *P. falciparum* studies available in the literature. ^(9,10,13-15,23)

However, here after T-B activity evaluation using two different parasite species (*P. berghei* and *P. vivax*) we found different results depending on the methodology and parasite stages evaluated.

For example, the compound MMV019881, which demonstrated 88.2% of inhibition ⁽¹⁰⁾ in a SMFA in *P. falciparum*, did not show any T-B activity in any assay performed in both species assessed in this study at the same concentration (10 μ M). However, previous studies have demonstrated this compound's activity against *P. berghei* in liver stage and in ookinetes. ⁽⁴⁾

Previously, using a thermal shift assay a possible MMV019881 mechanism of action in *P. falciparum* was demonstrated involving the PfHSP90 protein ⁽⁴⁾, which is essential for parasite growth in human erythrocytes.

The compounds MMV019555 and MMV667491 exhibited contrasting results between *P. berghei* and *P. vivax* (Figure 2). MMV019555 impaired zygote to ookinete transformation in *P. berghei* (100% of inhibition) and showed activity start-up time of 6 hours in male and female gametocytes presenting 63.6% cytotoxicity rate in female gametocytes at 24 hours of incubation. In contrast, in *P. vivax* DMFA this compound did not reach 30% of infection rate inhibition, and thus we did not evaluate its effect on *P. vivax* zygote to ookinete transformation. The compound MMV667491 showed high inhibition in male and female *P. berghei* gametocytes, only moderately active against *Pb* ookinete and low inhibition in *P. vivax* DMFA, showing a slight decrease in infection rate and intensity at the two concentrations tested. Since *P. vivax* gametocytes are only incubated shortly with the drug during the DMFA (2 hours maximum) this compound effect could be restricted to gametocyte stage and a longer incubation may be necessary to see its effect. Therefore this assay could miss gametocitocida's activity once there is no previous incubation; and also since the fact that the compound is ingested by the mosquitoes, which takes into account the indirect antiparasitic effect, for example, the effect on mosquitoes microbiota and/or immune system that could favors or impairs *Plasmodium* sporogony. ⁽²¹⁾

Interestingly, the compounds MMV000248 and MMV006172 (Figure 2) showed similar activity in *P. berghei* ookinete transformation assay and *P. vivax* DMFA. However, MMV006172 demonstrated low inhibition in male and female *P. berghei* gametocytes.

All compounds mentioned above have been classified as hit compounds in *P. falciparum* T-B assays by two different studies impairing parasite transmission (inhibition of 100%) in assays using late gametocytes: MMV000248 and MMV019555 ⁽¹³⁾; MMV006172 and MMV667491. ⁽²⁴⁾ Furthermore, the latter compound (MMV667491) may have an effect in *P. falciparum* phosphoethanolamine N-methyltransferase (PfPMT) activity. ⁽⁴⁾ The physiological role of PfPMT seems to be in parasite membrane lipid biogenesis and in the development and survival of intraerythrocytic *P. falciparum*. ⁽²⁵⁾ Furthermore, this compound and others MMV compounds were tested against yeast growing in either fermentative or respiratory conditions. ⁽⁴⁾ This effect could be non-specific in some cases (e.g. a growth-rate effect), but the results indicate that at least some MMV drugs are likely to have a respiratory target (the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as a proxy for *P. falciparum*, because of killing similarities - the disruption of normal mitochondria function through membrane potential depolarization). ⁽²⁶⁾

The MB compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 exhibited inhibition higher than 60% in all assays and in both species tested (Figures 2 and 3). Hence, these three compounds were classified as hit compounds in this study. Indeed, MMV665830 reached the higher inhibition in female gametocytes and in *P. berghei* ookinete transformation. In *P. vivax*, this compound showed the second-best inhibition rate in DMFA and in ookinete inhibition.

The MMV665941 showed a higher inhibition against male gametocytes in comparison to female gametocytes, whereas MMV665830 showed the opposite profile. In addition, the compound MMV665941 was able to block the zygote to ookinete transformation (100% of inhibition) in *P. berghei*, showed the highest inhibition in infection rate and decreased infection intensity in both concentrations tested in *P. vivax* DMFA. In ookinete transformation, MMV665941 showed the third best inhibition rate. This compound, which is also called methylrosaniline, has a

dermatological topical use⁽²⁷⁾, and may target a sterol-dependent function. *Plasmodium* parasites require sterol lipids, which they can scavenge from the host.⁽²⁸⁾ In a previous study, out of seven MMV665941-sensitive yeast mutants to this compound, two were defective for sterol synthesis (*erg2Δ* and *erg6Δ*) revealing the importance of this metabolic pathway for this compound's action.⁽⁴⁾

Lastly, MMV665878 showed an inhibition higher than 90% in *P. berghei*. In *P. vivax*, this compound exhibited the third best DMFA inhibition rate and the best inhibition in ookinete rate. Two possible mechanisms of action are described in the literature for this compound. MMV665878 inhibits PfATP4 activity – a membrane plasmatic protein which functions as a sodium/potassium pump – increasing the sodium concentration and the pH of the cytosol.⁽²⁹⁾ The second mechanism is related to a possible respiratory target.⁽⁴⁾

Limitations of this study were the result of *P. vivax* assay. It was not possible to evaluate a large number of MB compounds in *P. vivax* due mostly to the absence of an *in vitro* long-term culture. The MFA methodology, the gold standard assay for T-B drug activity evaluation, requires laborious dissection of anophelines' midgut and thus did not allow studying several compounds. Moreover, there are no positive control drugs described in literature until now, which therefore limit the standardization of this assay. Our research group has already studied the effect of ivermectin in T-B⁽³⁰⁾, demonstrating that only the drug's metabolite is highly effective, which makes its use as a control drug in this methodology unfeasible.

However, the *P. vivax* ookinete methodology presented here may offer an alternative to evaluating T-B activity in studies with a large number of compounds, since it has demonstrated an inhibitory tendency profile resembling the DMFA in all four compounds herein evaluated,

including the useful addition of MMV019881 as a negative control. The methodology could be used as a primary screening followed by the gold standard method in order to avoid the hard work on mosquitoes' dissection.

In spite of the limitations mentioned above, the eight MB compounds tested here demonstrated that *P. berghei* is suitable as an initial screening for testing compounds against *P. vivax*. Indeed, we found a correlation between *P. berghei* and *P. vivax* T-B data; which we have not encountered for *P. falciparum* and *P. vivax* (Figure 2) and for *P. falciparum* and *P.berghei* (Figure S2).

The literature show that *P. falciparum* remains a good approach for screening a large number of compounds^(8-10,24), but due to differences in parasite biology between *P. vivax* and other species, this screening may miss some potential candidates or show false positives that must then be validated in *P. vivax*. In contrast, *P. berghei* seems to be even more promising as a screening for *P. vivax* demonstrating a very similar phenotype.

Here similarities are demonstrated concerning *P. vivax*. and *P. berghei* cytotoxicity and inhibition of conversion rates of gametocytes and ookinetes for three MMV compounds with high levels of inhibition. *P. berghei* proved an alternative for initial screening focusing on compounds with T-B activity against *P. vivax*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CF wrote the original draft and performed project administration, all methodologies, and formal data analyses. AOT supported the ookinete methodology for *P. vivax*. FSA and MOF supported the DMFA methodology. CMRV, MVGL, WMM, RA and FTMC were responsible for reviewing and editing the final manuscript. MVGL, FTMC and SCPL supported funding acquisition. SCPL was responsible for supervision, project administration, formal analysis, data curation, validation and review and editing of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Gonçalves D. & Hunziker P. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malar. J.* 2016; 15 (1): 1–13.
2. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9 (9): 555–566.
3. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLoS One.* 2013; 8 (6):1–8.
4. Van Voorhis WC, Adams JH, Adelfio R, Ahyong V, Akabas MH, Alano P, et al. Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS Pathog.* 2016; 12 (7): 1–23.

5. mmv.org [homepage on the internet]. Switzerland: Medicines for Malaria Venture [cited 2019 Jun 9]. Available from: <http://www.mmv.org/>.
6. Sinden RE. Developing transmission-blocking strategies for malaria control. *PLoS Pathog.* 2017; 13 (7): 1–12.
7. Churcher TS, Blagborough AM, Delves M, Ramakrishnan C, Kapulu MC, Williams AR, et al. Measuring the blockade of malaria transmission - An analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int. J. Parasitol.* 2012; 42 (12): 1037–1044.
8. Ruecker A, Mathias DK, Straschil U, Churcher TS, Dinglasan RR, Leroy D, et al. A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay To Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58 (12): 7292–7302.
9. Plouffe DM, Wree M, Du AY, Meister S, Li F, Patra K, et al. High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host Microbe.* 2016; 19 (1): 114–12.
10. Vos MW, Stone WJR, Koolen KM, Van Gemert G-J, Van Schaijk B, Leroy D, et al. A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Sci. Rep.* 2105; 5(11): 1–13.
11. Galinski MR., Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*. Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. *In: Advances in Parasitology.* Elsevier; 2013. 1–26.
12. World Malaria Report 2019 [internet]. 2019 [cited 2019 dez 15]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019>
13. Bowman JD, Merino EF, Brooks CF, Striepen B, Carlier PR, Cassera MB. Antiapicoplast and gametocytocidal screening to identify the mechanisms of action of compounds within the malaria box. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(2): 811–819.

14. Sanders NG, Sullivan DJ, Mlambo G, Dimopoulos G, Tripathi AK. Gametocytocidal Screen Identifies Novel Chemical Classes with *Plasmodium falciparum* Transmission Blocking Activity. *PLoS One*. 2014; 9(8): 1–13.
15. Lucantoni L, Silvestrini F, Signore M, Siciliano G, Eldering M, Dechering KJ, et al. A simple and predictive phenotypic High Content Imaging assay for *Plasmodium falciparum* mature gametocytes to identify malaria transmission blocking compounds. *Sci. Rep.* 2015; 5 (10): 1–14.
16. Ponzi M, Sidén-kiamos I, Bertuccini L, Currà C, Kroeze H, Camarda G, et al. Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1 / PEG3 protein. *Cell. Microbiol.* 2009; 11 (5): 1272–1288.
17. Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol. Microbiol.* 2006; 59 (4): 1175–1184.
18. Boisson B, Lacroix C, Bischoff E, Gueirard P, Bargieri DY, Franke-fayard B, et al. The novel putative transporter NPT1 plays a critical role in early stages of *Plasmodium berghei* sexual development. *Mol. Microbiol.* 2011; 81 (5): 1343–1357.
19. Guttery DS, Poulin B, Ferguson DJP, Wickstead B, Carroll PL, Ramakrishnan C, et al. A Unique Protein Phosphatase with Kelch-Like Domains (PPKL) in *Plasmodium* Modulates Ookinete Differentiation , Motility and Invasion. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (9): 1–15.
20. Guia de Tratamento da Malária no Brasil [internet]. 2019 [cited 2019 dez 15]. Available from: www.saude.gov.br/bvs
21. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110 (2): 23–47.

22. Bounkeua V, Li F, Chuquiyauri R, Abeles SR, Mcclean CM, Neyra V, et al. Lack of Molecular Correlates of *Plasmodium vivax* Ookinete Development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85 (2): 207–213.
23. Lucantoni L, Avery V. Whole-cell in vitro screening for gametocytocidal compounds. *Future Med. Chem.* 2012; 4 (18): 2337–2360.
24. Duffy S, Avery VM. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malar. J.* 2013; 12: 1–15.
25. Witola WH, Bissati K El, Pessi G, Xie C, Roepe PD, Mamoun C Ben. Disruption of the *Plasmodium falciparum* PfPMT Gene Results in a Complete Loss of Phosphatidylcholine Biosynthesis via the Pathway and Severe Growth and Survival Defects *. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 2008; 283 (41): 27636–27643.
26. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li Y, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. *PLoS One.* 2010; 5 (3): 1–12.
27. Gloor M, Wolnicki D. Anti-irritative effect of methylrosaniline chloride (gentian violet). *Dermatology.* 2001; 203 (4): 325–328.
28. Coppens I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013;11(12): 823–835.
29. Lehane AM, Ridgway MC, Baker E, Kirk K. Diverse chemotypes disrupt ion homeostasis in the malaria parasite. *Mol. Microbiol.* 2014; 94 (2): 327–339.
30. Pinilla YT, C. P. Lopes S, S. Sampaio V, Andrade FS, Melo GC, Orfanó AS, et al. Promising approach to reducing Malaria transmission by ivermectin: Sporontocidal effect against *Plasmodium vivax* in the South American vectors *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12 (2): 1–23.

Table I. *P. berghei* ookinete inhibition assay

MB compounds	Ookinete (μL of blood)				Inhibition (%)	
	Control	5 μM	Control	10 μM	5 μM	10 μM
MMV000248	8546.9 \pm	5718.8 \pm	7437.5 \pm	2843.8 \pm		
	3145.2	2144.1	3111.0	976.9	33.1	61.8
MMV006172	9703.1 \pm	4671.9 \pm	7906.3 \pm	2203.1 \pm		
	2216.0	2011.1	2188.4	1536.7	51.9	69.2
MMV019555	8546.9 \pm	1500.0 \pm	7437.5 \pm			
	3145.2	1047.9 ^b	3111.0	0 \pm 0 ^a	82.5	100.0
MMV019881	9703.1 \pm	7656.3 \pm	7906.3 \pm	5796.9 \pm		
	2216.0	3089.9	2188.4	2420.1	21.1	31.2
MMV665830	8546.9 \pm	458.3 \pm	7437.5 \pm	62.5 \pm		
	3145.2	423.3 ^a	3111.0	104.6 ^a	94.6	99.2
MMV665878	9703.1 \pm	1640.6 \pm	7906.3 \pm	671.9 \pm		
	2216.0	1310.1 ^b	2188.4	353.2 ^b	83.1	91.5
MMV665941	9703.1 \pm	1500 \pm	7906.3 \pm			
	2216.0	923.4 ^b	2188.4	0 \pm 0 ^a	84.5	100.0
MMV667491	8546.9 \pm	4890.6 \pm	7437.5 \pm	2312.5 \pm		
	3145.2	2165.5	3111.0	1095.9	42.8	68.9

Ookinete per microliter of blood assay and inhibition rate in *P. berghei* GFP@Hsp70 using fluorescence microscope. *P* values were calculated using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple

comparisons posttest. ^a*p* value < 0.001 and ^b*p* value < 0.01 when compared to the control group.

Results are the average of four independent biological replicates.

Table II. *P. vivax* DMFA

MB compounds	Infection rate % (mosquitoes examined)			Infection intensity mean ± SD			Inhibition %	
	Control	5 μM	10 μM	Control	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM
MMV000248	80.0 (145)	54.3 (152)	37.9 ^c (152)	19.6 ± 18.7	16.1 ± 14.1	20.5 ± 16.9	32.2	52.6
MMV006172	82.9 (288)	50.7 (222)	35.5 ^b (216)	36.1 ± 32.9	6.1 ± 12.8 ^a	6.3 ± 12.2 ^a	38.9	57.2
MMV019555	74.9 (180)	77.1 (203)	53.2 (167)	25.5 ± 33.5	35.6 ± 43.9	25.5 ± 36.8	-2.9	29.0
MMV019881	76.5 (168)	75.3 (142)	61.3 (132)	22.6 ± 25.8	17.0 ± 19.1	13.2 ± 17.2	1.6	19.8
MMV665830	70.4 (165)	40.7 (179)	19.7 ^b (154)	3.9 ± 4.2	3.8 ± 5.9	2.5 ± 1.6	42.1	72.1
MMV665878	78.5 (254)	43.9 (193)	29.4 ^b (193)	28.7 ± 33.3	24.6 ± 32.3	30.9 ± 31.3	44.0	62.5
MMV665941	72.2 (234)	26.1 (206)	10.5 ^b (214)	13.1 ± 15.5	3.1 ± 2.5 ^a	1.7 ± 1.0 ^a	63.9	85.5
MMV667491	92.9 (190)	79.7 (240)	72.3 ^c (181)	38.4 ± 40.0	24.8 ± 36.2 ^a	16.3 ± 21.3 ^a	14.3	22.2

Infection rate indicates the presence or absence of oocyst per midgut, infection intensity was the mean of oocysts per midgut, and inhibition rate was calculated using the infection rate data of each compound compared to the control. *P* values were calculated using Kruskal-Wallis and Dunn's

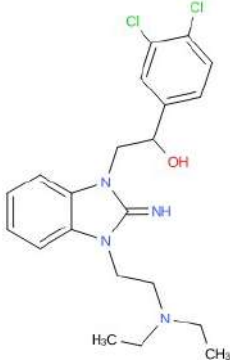
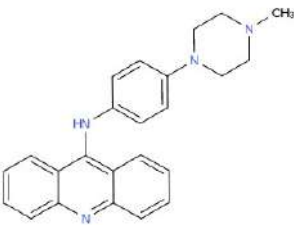
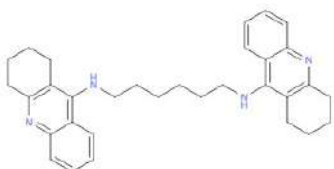
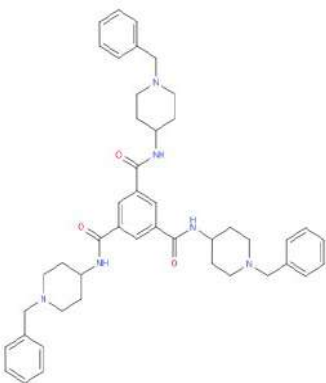
multiple comparisons posttest. ^a*p* value < 0.001, ^b*p* value < 0.01 and ^c*p* value < 0.05 when compared to the control group. Results are the average of five independent biological replicates.

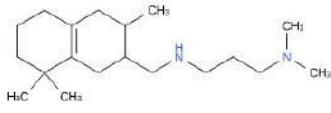

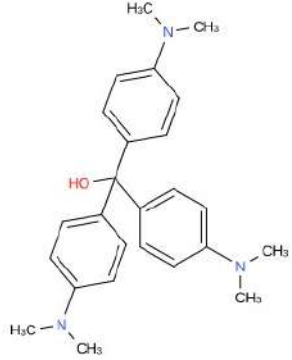
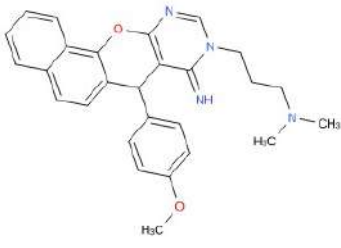
Table III. *P. vivax* ookinetes assay

MB compounds	Ookinetes/10 ³ erythrocytes		Inhibition (%)
	Control	10 μ M	
MMV019881	37.7 \pm 4.9	34.2 \pm 6.2	9.3
MMV665830	72.3 \pm 23.6	15.0 \pm 2.8 ^b	79.3
MMV665878	88.8 \pm 17.7	3.83 \pm 3.3 ^b	91.5
MMV665941	70.0 \pm 25.8	25.0 \pm 8.4 ^b	64.3

Ookinetes per 10³ erythrocytes assay in *P. vivax* using optical microscope. *P* values were calculated using Mann Whitney test and multiple groups'. ^b*p* value < 0.01 when compared to the control group. Results are the average of three independent biological replicates.

Table S1. Malaria Box compounds

COMPOUNDS	CHEMBLID	STRUCTURE	CHEMICAL PROPERTIES
MMV000248	CHEMBL394283		Name: no data Molecular species: BASE Molecular weight: 421.37 g/mol Molecular formula: C ₂₁ H ₂₆ Cl ₂ N ₄ O
MMV006172	CHEMBL106525		Name: no data Molecular species: BASE Molecular weight: 368.48 g/mol Molecular formula: C ₂₄ H ₂₄ N ₄
MMV019555	CHEMBL73800		Name: no data Molecular species: BASE Molecular weight: 478.68 g/mol Molecular formula: C ₃₂ H ₃₈ N ₄
MMV019881	CHEMBL546799		Name: no data Molecular species: NEUTRAL Molecular weight: 726.97 g/mol Molecular formula: C ₄₅ H ₅₄ N ₆ O ₃

<p>MMV665830</p>	<p>CHEMBL602580</p>		<p>Name: no data</p> <p>Molecular species: BASE</p> <p>Molecular weight: 292.51 g/mol</p> <p>Molecular formula: C₁₉H₃₆N₂</p>
<p>MMV665878</p>	<p>CHEMBL530223</p>		<p>Name: no data</p> <p>Molecular species: NEUTRAL</p> <p>Molecular weight: 367.41 g/mol</p> <p>Molecular formula: C₂₀H₂₁N₃O₄</p>
<p>MMV665941</p>	<p>CHEMBL592105</p>		<p>Name: METHYLOSANILINE</p> <p>Molecular species: NEUTRAL</p> <p>Molecular weight: 389.54 g/mol</p> <p>Molecular formula: C₂₅H₃₁N₃O</p>
<p>MMV667491</p>	<p>CHEMBL1437888</p>		<p>Name: no data</p> <p>Molecular species: BASE</p> <p>Molecular weight: 440.55 g/mol</p> <p>Molecular formula: C₂₇H₂₈N₄O₂</p>

MB compounds' chemical properties. The table shows the ChEMBLID name, the chemical structure, molecular species, molecular weight, molecular formula of the eight compounds tested in this study.

Table S2. Male and female *P. berghei* gametocytes

MB compounds	Activity start-up time		Inhibition after 24 hours of exposure	
	♂ gametocyte (%)	♀ gametocyte (%)	♂ gametocyte (%)	♀ gametocyte (%)
MMV000248	6 hours ^a	6 hours ^a	45.2	59.9
MMV006172	24 hours ^c	12 hours ^b	16.2	32.9
MMV019555	6 hours ^a	6 hours ^a	40.6	63.6
MMV019881	no activity	no activity	(-)14.6	6.2
MMV665830	6 hours ^a	1 hour ^a	82.5 ^c	94.6
MMV665878	6 hours ^b	6 hours ^a	96.7	92.1
MMV665941	6 hours ^a	3 hours ^a	76.3 ^c	59.3
MMV667491	6 hours ^a	6 hours ^a	78.3	82.8

Male and female activity start-up time (the first hour which the compound had activity compared to the control group) and inhibition rate in *P. berghei* 820 cl1m1cl1 strain. *P* values were calculated using 2way ANOVA with Bonferroni posttests. ^a*p* value < 0.001, ^b*p* value < 0.01 and ^c*p* value < 0.05 when compared to the control group. Results are the average of two independent biological replicates.

Table S3. *Anopheles aquasalis* mortality

MB compounds	Control (%)	5 μM (%)	10 μM (%)
MMV000248	38.5	36.4	33.4
MMV006172	26.3	24.8	24.0
MMV019555	23.2	23.4	27.1
MMV019881	34.4	30.9	35.1
MMV665830	21.0	23.2	24.7
MMV665878	24.0	32.2	30.3
MMV665941	50.1	42.0	34.0
MMV667491	14.6	19.6	20.3

The *Anopheles aquasalis* mortality after seven day of MB compounds exposure. *P* values were calculated using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons posttest. No differences between groups were found. Data are the mean of five independent biological replicates.

FIGURES

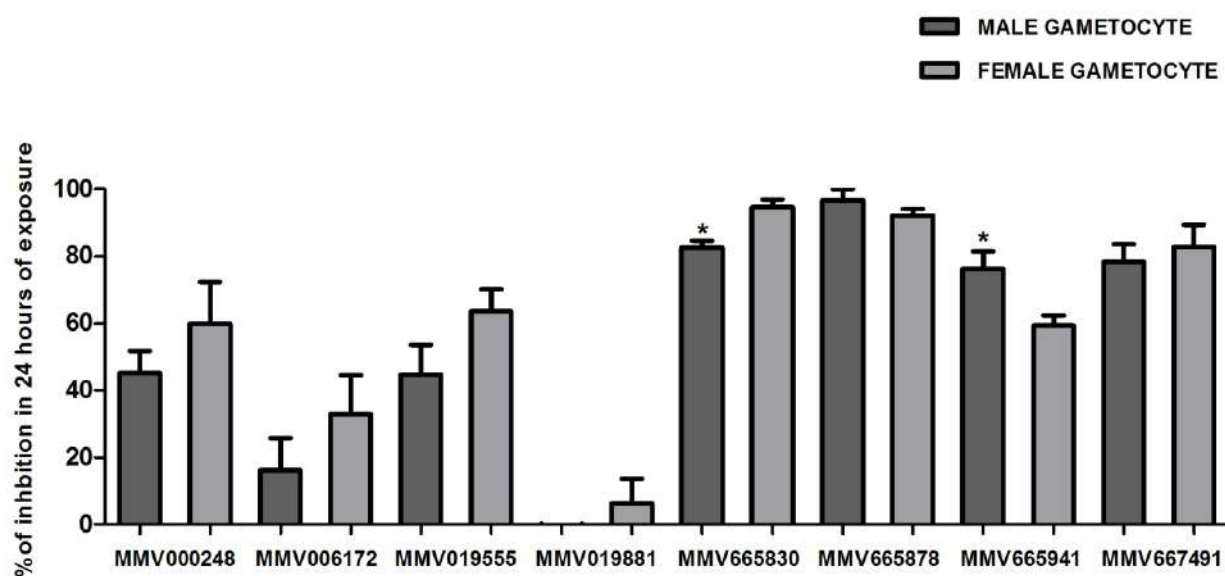


Figure 1. Male and female *P. berghei* gametocytes cytotoxicity in 24 hours of exposure to MB compounds. For difference between male and female gametocytes cytotoxicity in the same compound *p* values were calculated using Mann Whitney test and multiple groups'. Asterisks indicate *p* value < 0.05 for male and female gametocyte comparison per compound tested. Results are the average of two independent biological replicates.

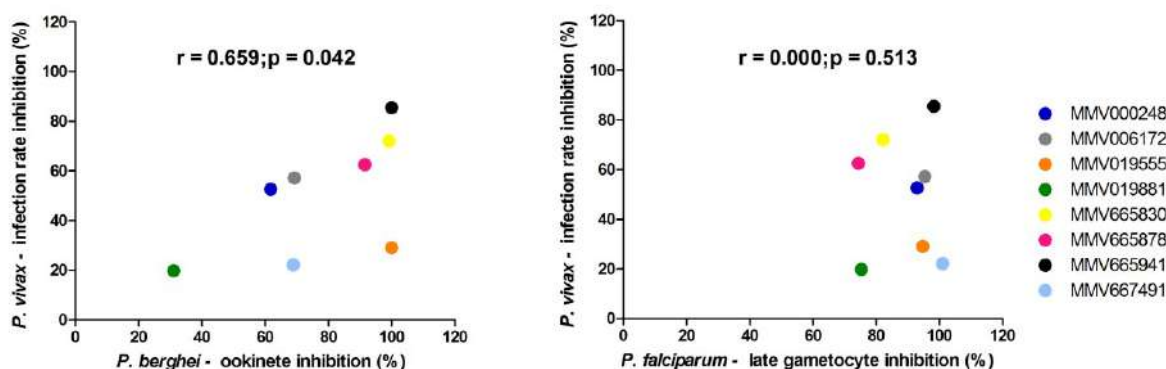


Figure 2. Comparison of MB transmission blocking activity between *P. vivax* and *P. berghei* or *P. falciparum*. **(A)** Spearman correlation between *P. berghei* ookinete inhibition – *ex vivo* (%) and infection rate in *P. vivax* for different MB compounds. **(B)** Spearman correlation between *P. falciparum* late gametocyte inhibition – *in vitro* (%) and infection rate in *P. vivax* for different MB compounds. The *P. falciparum* data were obtained from literature.^(8,13,14,24) Each colored circle corresponds to one MB compound as indicated.



Figure 3. Representative scheme showing the hit compounds. The three compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 demonstrated high activity in both *Plasmodium* species.

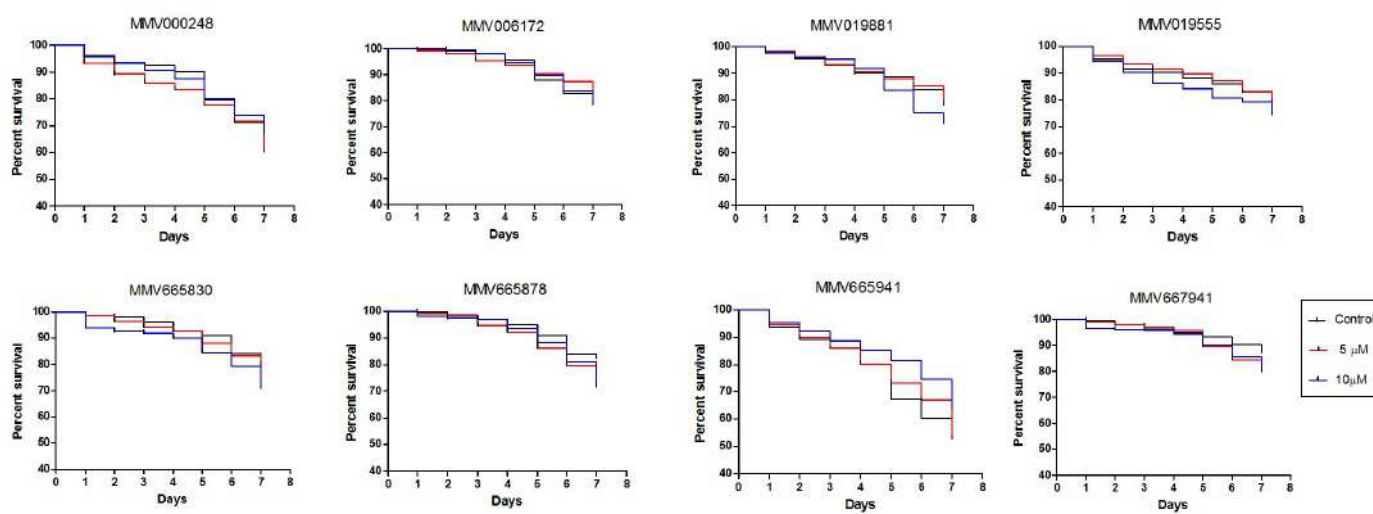


Figure S1. MB compounds' survival graphics. Results are the average of five independent biological replicates. The comparison of survival curves by Mantel-Cox test did not show differences between the control versus 5 μM and 10 μM groups.

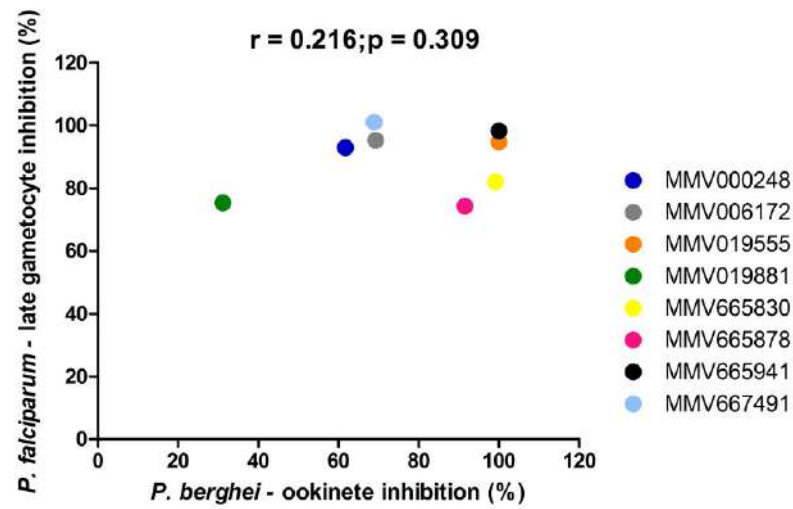


Figure S2. Spearman correlation between *P. falciparum* late gametocyte inhibition – *in vitro* (%) and *P. berghei* ookinete inhibition – *ex vivo* (%) for different MB compounds. The *P. falciparum* data were obtained from literature. ^(8,13,14,24) Each colored circle corresponds to one MB compound as indicated.

3.2 Manuscrito científico 2

Full title: Methylene blue antimalarial activity against asexual and sexual stages of *Plasmodium vivax*

Short title: Methylene blue antimalarial activity against *Plasmodium vivax*

Author's name

Camila Fabbri^{a,b,c}, Alexandre Oliveira Trindade^a, Djane Clarys Baia-da-Silva^{a,b}, Marcus Vinicius Guimarães Lacerda^{a,d}, Wuelton Marcelo Monteiro^{a,b}, Fabio Trindade Maranhão Costa^{d,e}, Stefanie Costa Pinto Lopes^{a,d*}

Author's affiliations

^aInstituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil

^cCentro Universitário Fametro, Manaus, Brazil

^dInstituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Brazil

^eUniversidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil

*Corresponding author

E-mail: stefaniecplopes@gmail.com

Abstract

Methylene blue (MB), a compound used in the treatment of malaria until the 1950s, now is under consideration as an alternative in fighting drug-resistant malaria parasites due to its deleterious effect on asexual and sexual stages of *Plasmodium* species. Its transmission-blocking potential has been demonstrated *in vivo* using murine malaria models such as *P. berghei* and *P. yoelii* and with *P. falciparum* through *in vitro* studies and clinical trials. However, MB's antiparasmodial activity against *P. vivax* has only been shown against the asexual blood stages. Here we report our findings on the antiparasmodial potential of MB against both sexual and asexual stages of *P. vivax*. To achieve this, we performed an *ex vivo* schizont maturation assay (SMA), an *ex vivo* zygote to ookinete transformation assay and a direct membrane feeding assay (DMFA). Corroborating with previous findings, MB inhibited *P. vivax* ring to schizont maturation (IC_{50} = median of 1.3 μ M and range 0.01 to 18.4 μ M). Also, it inhibited zygote to ookinete transformation *ex vivo* (mean inhibition of $76.5 \pm 12.8\%$). From the DMFA experiments, MB did not affect infection rate but demonstrated a slight transmission-blocking activity as exhibited by a small decline in the infection intensity (number of oocysts per midgut) compared to the controls. Additional studies are still necessary before excluding MB as a potential transmission-blocking drug against *P. vivax*, more so through assays that incubate gametocytes in the test drug before performing membrane feeding.

Author Summary

Methylene blue (MB), a drug once used over 70 years ago to treat malaria is now under consideration as an alternative to current antimalarials that are no longer effective against the different stages of the malaria parasite. Previous studies demonstrated MB could block the patient/animal to mosquito transmission of the parasite, a part of the parasite cycle that is responsible for the spread of malaria. However, there are no studies reported to demonstrate this property of MB against *Plasmodium vivax* – a malaria parasite species very common in South America. Here, MB's activity was assessed against *P. vivax* blood stages and sexual stages that are responsible for *Plasmodium* transmission. The study revealed MB has high antimalarial activity against the blood stages, but dissimilar results against the stage responsible for the transmission. MB had little transmission-blocking capacity in experiments that simulated patient to mosquito transmission, probably due to the short exposure period. Nonetheless, further studies are necessary to fully define the potential application of MB as an antimalarial for the treatment and control of *P. vivax* before rejecting it.

Introduction

Malaria is an important global parasitic disease, responsible for about 228 million cases and 405,000 deaths globally in 2018. *Plasmodium falciparum* is still the most prevalent malaria parasite in the African, Eastern Mediterranean and Western Pacific Regions. On the other hand, *P. vivax* is the predominant parasite in the Americas region [1].

Early diagnosis and effective treatment are the most important tools in the control and elimination of malaria worldwide [2]. However, several studies have revealed that *P. falciparum* [3,4] and *P. vivax* are resistant to chloroquine, an antimalarial that is still in use and recommended as the first-line treatment for *P. vivax* in the Americas [1,5–8].

Methylene Blue (MB), a water-soluble textile dye first synthesized in 1876, had a significant role in malaria treatment before and during World War II. It was in use as an antimalarial until the 1950s. Recently, expression of interest in the MB potential application as the next universal antimalarial has been extensive following the discovery that its mode of action targeted *P. falciparum* glutathione reductase enzyme [9]. As a result, MB's range of antiplasmodial activities has been evaluated in both pre-clinical and clinical trials against several *Plasmodium* species including strains resistant to standard antimalarials [10].

Against *P. falciparum*, MB has demonstrated to be active against both asexual and sexual stages [10–12], consequently there are proposals advocating for its use as an alternative antimalarial treatment due to its potential in transmission-blocking [13,14]. Three different randomized controlled trials demonstrated that MB-based combination therapy could reduce transmission of *P. falciparum* malaria in Africa [15–17]. Besides, MB was also safe for use as it showed no clinically relevant hemolysis in G6PD deficient African patients [18].

On *P. vivax* parasites, MB studies have illustrated its high efficacy against the asexual stages [19,20]. In contrast, there is a paucity of information about MB's activity towards the sexual stages of *P. vivax*, and thus its inherent impact on transmission-blocking remains unknown.

Accordingly, here we investigated the antimalarial activity of MB against *P. vivax* isolates from the Brazilian Amazon. We report our findings on the *ex vivo* activities of methylene blue on *P. vivax* asexual and sexual maturation stages (ring to schizonts and zygote to ookinete, respectively) and its transmission-blocking effect through direct membrane feeding assay (DMFA).

Methods

Methylene blue compound

The compound methylene blue was diluted in Milli-Q® water making a stock solution of 5mg/mL that was maintained at -80°C.

Sample collection of *P. vivax* field isolates and ethical approval

Fresh *P. vivax* field isolates used were from malaria-infected patients attending the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil. A 9ml sample of *P. vivax*-infected blood was drawn from each patient by venipuncture into heparin tubes. The donor patients were older than 18 years, microscopically diagnosed as having *P. vivax* mono-infection at parasitemia higher than 1,000 parasites/ μ l and had not taken any antimalarial treatment in the last 60 days. After sample collection, all patients were treated accordingly as per the Brazilian Malaria Treatment Guidelines [21]. All participating patients provided a written and signed Informed Consent for their participation in the study. The FMT-HVD Research Ethics Committee approved this study (CAAE: 50812815.0.0000.0005), approval number 1.358.054.

***Ex vivo* activity against asexual *P. vivax* isolates**

Ex vivo susceptibility of *P. vivax* isolates to MB was evaluated a slightly modified schizont maturation assay [22]. In this assay, only blood samples with over 50% ring stage were used. The parasitized blood samples were centrifuged, then the resulting red blood cell pellet washed in RPMI - 1640 medium before passing through cellulose columns (Sigma) for leukocyte removal. The collected blood filtrate consisting of parasitized erythrocyte suspension was then washed with RPMI 1640. Later, the final pellet was suspended in IMDM medium to a final concentration

of 2% hematocrit before dispensing onto 96-well plates that were pre-loaded with various concentrations of MB and CQ. The drugs were serially diluted to 8 concentrations that ranged from 0.1 to 51.2 nM (MB) and 1.95 to 1000 nM (CQ); plain medium was also included as a control. The cultures were thereafter incubated at 37°C for 36h to 48h in a hypoxia chamber (with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ gas mixture). After incubation, schizont count per 200 parasites was determined by microscopic examination of the cultures. Schizont counts from the drugged wells were compared to those of the control wells and the IC₅₀ values of the drugs determined. The activity of the MB test drug was evaluated in five different *P. vivax* isolates (biological replicates).

***Anopheles aquasalis* colony**

Colonies of *Anopheles aquasalis* mosquitoes were reared and maintained at the insectary facility of the Medical Entomology laboratory in FMT-HVD, Manaus, Amazonas, Brazil, as per established protocols [23,24]. The colonies were maintained at constant temperature (24–26°C) and relative humidity (70–80%). Mosquito larvae were hatched in water at room temperature and fed commercial fish food. The larvae developed to pupa then matured into adult mosquitoes, which were maintained with water and 10% sucrose solution before their use in experiments. Female *An. aquasalis* aged 3 to 6 days old were used in subsequent experiments.

***P. vivax* Direct Membrane Feeding Assay (DMFA)**

The DMFA was performed as previously described with few modifications [23,24]. In a lamina flow chamber with temperature controlled at 32 – 37°C, blood from *P. vivax*-infected patients was centrifuged to remove plasma. Afterwards, the erythrocytes were washed twice in RPMI-1640 before reconstituting with inactivated AB human serum (Sigma) to 40% hematocrit. One

millilitre of this blood solution was offered to five groups of mosquitoes, each containing 120 to 150 females. Each of the five groups of mosquitoes was fed blood containing either Control A and Control B (both without drug) 5 μM MB, 10 μM MB, or 20 μM MB. Seven days post-infection the mortality rate (mean of dead mosquitoes per each group) was determined and the surviving mosquitoes from each experimental group were frozen and dissected. The midguts were stained in 2% mercurochrome stain (Sigma Aldrich) for 10 minutes. Mosquito infection rate and infection intensity (mean number of oocysts per midgut infected) were determined. For a consistent statistical analysis, mosquitoes with no oocyst in the midgut were excluded from the infection intensity analysis. This assay was conducted in five different *P. vivax* isolates (thus 5 biological replicates per test group).

Production of *P. vivax* ookinetes and drug inhibition assay

P. vivax ookinetes were obtained *ex vivo* as described elsewhere [25] with few modifications. Briefly, leukocyte depleted parasitized blood was resuspended in exflagellation medium (10 mM Tris, 170 mM NaCl, 10 mM glucose, 25mM NaHCO₃, 12 mM xanthurenic acid, 20% of fetal bovine serum, pH 8.0) at 20% hematocrit, and incubated for one hour at 25°C with ambient gas conditions. This stimulated gametocytes to undergo gametogenesis. After incubation, blood suspension was centrifuged (400g, 5 min) and the pellet resuspended in a 1:1 proportion with RPMI 1640 medium, before purification using with 45% percoll (percoll diluted in 50% of Milli-Q® water and 5% of 10X RPMI 1640). This was to separate sexually mature stages of the parasite. The resultant pellet was afterwards washed and resuspended in ookinete medium (IMDM medium, 50 mg/litre of hypoxanthine and 20% heat-inactivated AB human serum, pH 8,0) to a 20% hematocrit. MB at a final concentration of 10 μM was added and evaluated in comparison to a control group (without drug), both in duplicates. The cultures were incubated at

25°C for 24 hours with ambient gas conditions to enable ookinete development. The ookinete yield was determined per 1000 erythrocytes while percentage drug inhibition was calculated by dividing the difference between ookinete yields from MB and control tests, by the control test yield and multiplying by 100: Percentage (%) inhibition = [(Control yield – MB yield) / Control yield] x 100. In this assay, only three different *P. vivax* isolates (biological replicates) were evaluated.

Statistical analysis

Normality was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Comparison between two groups was performed using the Mann Whitney test while multiple group comparison was done using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons posttest. The IC₅₀ were analyzed with a normalized response – variable slope. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

Methylene blue has activity against *P. vivax* asexual stage *ex vivo* at an IC₅₀ lower than chloroquine

Overall, five clinical isolates obtained from patients diagnosed with *P. vivax* mono-infection were evaluated. Table 1 shows the IC₅₀ results of chloroquine (CQ) used as the control drug and MB, used as the test drug. The test compound, MB demonstrated an inhibitory effect on *P. vivax* maturation in the blood stage. At a median IC₅₀ of 1.3 η M, MB was 22.5 times lower than the control drug, CQ (29.3 η M).

Table 1. *Ex vivo* drug susceptibility – IC₅₀

Drug	Median (range) IC₅₀ (nM)	<i>p</i> value^a
Chloroquine	29.3 (10.4 – 72.7)	0.015
Methylene blue	1.3 (0.01 – 18.5)	

The IC₅₀ median was derived from five independent experiments assessed by *ex vivo* schizont maturation evaluated by microscopy in each treatment. ^a*p* -value was calculated using Mann Whitney test and compare chloroquine and methylene blue IC₅₀.

Methylene blue does not block transmission *in vivo*

MB's ability to block transmission of viable gametocytes was evaluated using the DMFA method. For this, the DMFA assay involved five biological replicates per group. The infection rate, intensity and mortality are described in Fig 1. Here, MB demonstrated low inhibition (calculated using the infection rate results) in blocking transmission at all the concentrations tested; only reaching a maximum of 32.4% inhibition (S1 Table). Concerning infection intensity, MB compound appeared to decrease the mean number of oocysts observed in the midgut mosquitoes compared to the control groups in the three tested concentrations. No concentrations tested interfered with the *Anopheles aquasalis* mortality rate.

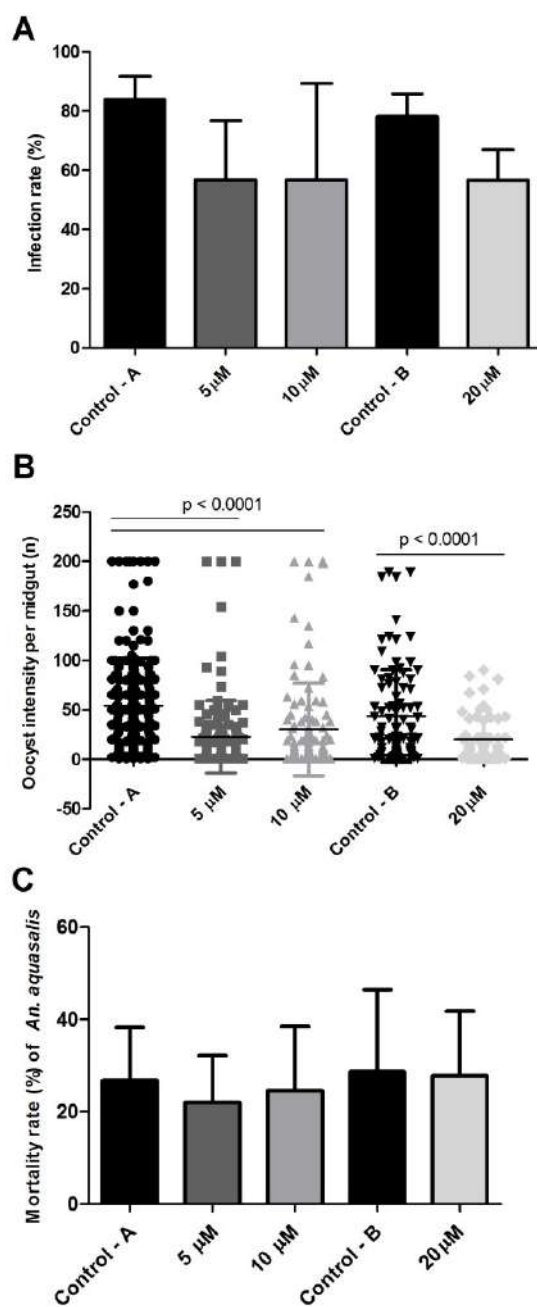


Fig 1. MB transmission blocking activity on *Plasmodium vivax* by DMFA. Infection rate (percentage of infected mosquitoes) (A), intensity (mean of oocysts per infected midgut) (B) and mortality (mean number of dead mosquitoes seven days post-infection) (C) were evaluated in 5 independent experiments (isolates) by feeding *An. aquasalis* with blood without MB (Control A

and B) or blood with MB at different concentrations (5, 10 and 20 μM). *P*- values were calculated using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons posttest for control A, 5 μM and 10 μM and using Mann Whitney test for control B and 20 μM .

Methylene blue has activity against zygote to ookinete transformation *ex vivo*

Methylene blue's capacity to block zygote to ookinete transformation was evaluated in an *ex vivo* ookinete culture using three different clinical isolates tested in duplicate. The mean number of ookinetes per 10^3 erythrocytes in MB at 10 μM was 10.83 ± 6.11 compared to 45.0 ± 8.02 in the control group (no treatment) (*p*-value = 0.001). The inhibition of ookinete transformation reached a mean of $75.9 \pm 13.9\%$ (Fig 2A). Further, the MB treatment impaired the maturation of *P. vivax* ookinete *in vitro*. Round and stem forms were observed in the group with MB treatment, while in the control mature ookinetes were found (Fig 2).

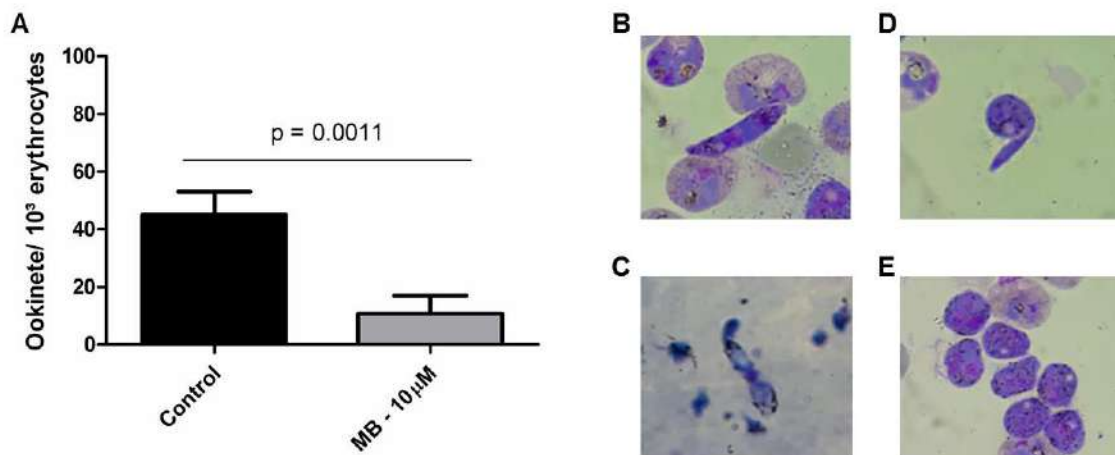


Fig 2. Methylene Blue activity in the *ex vivo Plasmodium vivax* ookinete assay. Mean number of ookinetes per 10^3 erythrocytes found in stained thin smears from three independent assays (isolates) tested in duplicate after 24 hours of *P. vivax* zygote culture at 25°C in the presence or absence (control group) of methylene blue at 10 μ M (A). Photomicrographs representative of thin smears stained with Panotic staining kit after 24 hours of *P. vivax* zygote culture at 24°C in the absence (B and C) or presence (D and E) of methylene blue at 10 μ M. *P*- value was calculated using Mann Whitney test.

Discussion

This study demonstrates methylene blue's *ex vivo* and *in vivo* antiplasmodial activity against different stages of *Plasmodium vivax* development. This activity against *P. vivax* asexual erythrocytic stage already has been reported with isolates from Indonesia, where there is widespread chloroquine resistance [20]. Using the same methodology as previously described, our study found a similar IC_{50} (1.3 η M in our study *versus* 1.2 η M), and, in both studies, MB had an inhibitory concentration lower than that of CQ. Although CQ is still the standard and first-line treatment against vivax malaria in Brazil [1,21], the emergence of chloroquine-resistant strains of *P. vivax* resistant has already been reported in Brazil and other countries [2,6–8].

Contrary to studies on *P. falciparum* [12,26] and murine *Plasmodium* [27] where MB treatment could abrogate mosquito infection in SMFA or by direct feeding, here the MB treatment applied demonstrated a low transmission-blocking potential against *P. vivax* in the DMFA assay with maximum inhibition on infection rate at 32% with no dose dependent-response profile observed. Despite the low inhibition, MB did reduce the infection intensity of *P. vivax* in the mosquitoes as

indicated by the low mean number of oocysts per midgut compared to the control, in all the tested concentrations. Furthermore, results from the *ex vivo* ookinete transformation assay reinforces the hypothesis that MB can interrupt transmission by interfering with *P. vivax* zygote to ookinete transformation.

It is important to highlight that the main difference in our study's protocol in evaluating the transmission-blocking potential of MB against *P. vivax* to those used on *P. falciparum* or murine models, is the exposure time of mature gametocytes to MB. It has been extensively demonstrated that MB has gametocidal activity against mature *P. falciparum* gametocytes, both *in vitro* [12,26,28] and *in vivo* [12,15–17,26]. Our approach did not involve incubating gametocytes in MB before infecting the mosquitoes, since there is no *P. vivax* long-term culture or data regarding the viability of *P. vivax* gametocytes in short-term culture. Therefore, the slight transmission blocking effect observed in the *in vivo* assay could be a result of an insufficient time of exposure of the dye to gametocytes. This may explain the inferior inhibition observed. Thus, gametocyte exposure time to MB could be a key factor in the transmission-blocking potential of MB.

Conversely, in the *ex vivo* ookinete transformation assay, we incubated the zygotes in MB for 24 hours. This resulted in delayed ookinete transformation and a high inhibition effect on the transformation by MB was observed. However, in the DMFA, we have not observed a prominent effect in the infection rate as expected, only a reduction in the oocysts number in the infected midgut. Possible explanations to the differences between the *ex vivo* and *in vitro* results are bioavailability of MB in mosquitoes midgut, differences in mosquitoes microbiota and immunity under treatment [29,30]. Nonetheless, the differences observed between the *ex vivo* and *in vivo* assays need additional investigations.

The antimalarial mechanism of action of MB against *P. falciparum* is inhibiting the glutathione-dependent degradation of heme [31]. It also kills the parasite by increasing the intracellular concentration of oxidants and toxic products that are harmful to both the asexual and gametocyte stages [14,15,28]. Although there is a propensity to put both *P. falciparum* and *P. vivax* together in a single conceptual, especially when it comes to drugs for treating malaria [5], the specific MB mechanism of action for *P. vivax* remains unknown. It is thus precipitous to assume MB's action is the same in both species considering there are several unique biological differences between these two species [32].

In this context, more experiments are essential to evaluate MB's activity on *P. vivax* gametocytes both *ex vivo* and *in vivo* particularly incubations with the drug before a membrane-feeding assay. These investigations are necessary to fill the knowledge gaps regarding MB's potential as a transmission-blocking intervention against vivax malaria. Moreover, the synergic effects of chloroquine or ACT with MB as a partner drug against *P. vivax* is also essential to satisfy a criterion that promotes the use of MB as an alternative antimalarial scheme.

Despite not being in use as an antimalarial since the 1950s, MB is safe [14]. Additionally, various clinical trials have reported MB to be generally well tolerated in humans and acceptable with mild gastrointestinal effects, it significantly reduces *P. falciparum* gametocytes, and it acts synergistically with ACT [14–17]. In respect to this, MB should be considered as an alternative drug in the treatment of malaria soon, especially in the context of the emergence and spread of drug-resistant *Plasmodium* species and strains across several countries [2,7,8]. Besides, the development of new molecules is an expensive and time-consuming process, thus the repurposing of old drugs is a strategy that favors the search for new old solutions.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant 442849/2019-2), Fundação Oswaldo Cruz (Programa INOVA Novos Talentos), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM; EDITAL N. 005/2019 - PAPAC). FTMC is supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant # 2017/18611-7. FTMC, MVGL and WMM are CNPq research fellows

References

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva. [Internet]. 2019. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
2. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2013;6736.
3. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med*. 2009;361:455–67.
4. Gupta R, Mishra N, Kumar A, Rana R, Srivastava B, Tyagi PK, et al. Monitoring artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: comparison of parasite clearance time by microscopy and real-time PCR and evaluation of mutations in Pfatpase6 gene in Odisha state of India. *Parasitol Res*. 2015;114:3487–96.
5. Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev*.

2009;22:508–34.

6. Garavelli PL, Corti E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:128.

7. Lizcano OV, Resende SS, Chehuan YF, Lacerda MVG, Brito CFA, Zalis MG. Genetic diversity of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* parasites from the western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:948–51.

8. Kittichai V, Nguitragool W, Gaelle H, Mbenda N, Cui L. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* multidrug resistance 1 gene in Thai parasite populations. *Infect Genet Evol.* 2019;64:168–77.

9. Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, et al. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* 2003;8:272–5.

10. Pascual A, Henry M, Briolant S, Charras S, Baret E, Amalvict R, et al. In vitro activity of proveblue (methylene blue) on *Plasmodium falciparum* strains resistant to standard antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2472–4.

11. Okombo J, Kiara SM, Mwai L, Pole L, Ohuma E, Ochola LI, et al. Baseline in vitro activities of the antimalarials pyronaridine and methylene blue against *Plasmodium falciparum* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1105–7.

12. Adjalley SH. e SH, Johnston GLGL. b, Li TT., Eastman RTRT. f, Eklund EH. EH, Eappen AG. AGAG., et al. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission blocking activity by methylene blue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:E1214–23.

13. Müller O, Lu G, Jahn A, Mockenhaupt FP. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. Taylor & Francis; 2019;17:471–3. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1634545>
14. Lu G, Nagbanshi M, Goldau N, Mendes Jorge M, Meissner P, Jahn A, et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: A systematic review. *BMC Med*. 2018;16:1–16.
15. Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP, Schirmer RH. Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against Falciparum Malaria : A Randomised Controlled Trial. *PLoS One*. 2009;4:1–6.
16. Coulibaly B, Pritsch M, Bountogo M, Meissner PE, Nebié E, Klose C, et al. Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine-methylene blue for falciparum malaria in children: A randomized controlled trial in Burkina Faso. *J Infect Dis*. 2015;211:689–97.
17. Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of Plasmodium falciparum transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:627–39.
18. Müller O, Mockenhaupt FP, Marks B, Meissner P, Coulibaly B, Kuhnert R, et al. Haemolysis risk in methylene blue treatment of G6PD-sufficient and G6PD-deficient West-African children with uncomplicated falciparum malaria : a synopsis of four RCTs. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013;22:376–85.
19. Suwanarusk R, Russell B, Ong A, Sriprawat K, Chu CS, Pyaephyo A, et al. Methylene blue

inhibits the asexual development of vivax malaria parasites from a region of increasing chloroquine resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:124–9.

20. Wirjanata G, Sebayang BF, Chalfein F, Handayuni I, Trianty L, Kenangalem E. Potent Ex Vivo Activity of Naphthoquine and Methylene Blue against Drug-Resistant Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6117–2

21. Siqueira AM, Daniel-Ribeiro CT, Fontes CJF, Pereira DB, Boulos M, Lacerda MVG, et al. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. Brasília-DF; 2019. Available from: www.saude.gov.br/bvs

22. Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J. Simple In Vitro Assay for Determining the Sensitivity of *Plasmodium vivax* Isolates from Fresh Human Blood to Antimalarials in Areas where *P. vivax* Is Endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:170–3.

23. Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, dos Santos E V, Pessoa FA, et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2013;12:1–10.

24. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:23–47.

25. Bounkeua V, Li F, Chuquiyauri R, Abeles SR, Mcclean CM, Neyra V, et al. Lack of Molecular Correlates of *Plasmodium vivax* Ookinete Development. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:207–13.

26. Alessandro SD, Silvestrini F, Dechering K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, et al. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. 2013;2048–58.
27. Bosson-Vanga H, Franetich JF, Soulard V, Sossau D, Tefit M, Kane B, et al. Differential activity of methylene blue against erythrocytic and hepatic stages of *Plasmodium*. *Malar J. BioMed Central*; 2018;17:1–10.
28. Wadi I, Pillai CR, Anvikar AR, Sinha A, Nath M, Valecha N. Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes: Implications for transmission-blocking. *Malar J. BioMed Central*; 2018;17:1–9.
29. Sharma P, Rani J, Chauhan C, Kumari S, Tevatiya S, Das De T, et al. Altered Gut Microbiota and Immunity Defines *Plasmodium vivax* Survival in *Anopheles stephensi*. *Front Immunol.* 2020;11:1–13.
30. Romoli O, Gendrin M. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasites and Vectors. Parasites & Vectors*; 2018;11:1–8.
31. Garavito G, Bertani S, Rincon J, Maurel S, Monje MC, Landau I, et al. Blood schizontocidal activity of methylene blue in combination with antimalarials against *Plasmodium falciparum*. *Parasite.* 2007;14:135–40.
32. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis. Elsevier Ltd*; 2009;9:555–66.

S1 Table. *In vivo* drug susceptibility - DMFA

MB compound	Infection rate - % (mosquitoes examined)	Infection intensity (mean \pm SD)	Inhibition - %
Control A	84.0 (233)	54.08 \pm 48.47	-
5 μM	56.7 (218)	22.56 \pm 36.52 ^a	32.4
10 μM	56.8 (209)	30.19 \pm 46.53 ^a	32.4
Control B	78.2 (124)	43.71 \pm 46.47	-
20 μM	56.6 (114)	20.03 \pm 22.77 ^a	27.6

Infection rate (% of mosquitoes with the presence of 1 or more oocyst in the midgut), Infection intensity (mean of oocyst per infected midgut) and Inhibition (calculated using the infection rate data). *P* values were calculated using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons posttest for control A, 5 μ M and 10 μ M and using Mann Whitney test for control B and 20 μ M. ^a*p* value < 0.0001, when compared to the control group. Results are the average of five independent biological replicates.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

- Inicialmente, a proposta deste estudo era estudar apenas *P. vivax*. Porém, as dificuldades de implementar um cultivo de gametócitos nesta espécie para os testes *ex vivos* dos compostos pré-selecionados abriu o leque para alternativas mais viáveis, como verificar a possibilidade da padronização de uma plataforma de triagem com outra espécie de melhor manejo laboratorial, como o *P. berghei*;
- O fato de cada amostra de paciente (isolado) ser único, com variantes não controláveis, interferiu na qualidade estatística do trabalho (desvios padrões elevados). Porém, cada isolado possui seu próprio controle, o que minimiza as falhas geradas por essa limitação. Além disso, isolados do campo mimetizam uma condição mais real para o experimento com fármacos, enquanto o cultivo de laboratório passado por diversas gerações não possui mais esta característica;
- A dificuldade de se conseguir isolados com o perfil ideal também é uma limitação deste estudo e impactou no *n* amostral principalmente no experimento de IC50 no fármaco azul de metileno. Para esse teste é necessário que o perfil da parasitemia esteja com no mínimo 50% de trofozoítos jovens (anéis);
- O número de compostos MMV testados é a principal limitação deste estudo. De 400 compostos do Malária box, apenas 8 foram testados. E isso deve-se a todos os itens já supracitados como também o desafio de testar todos os compostos na metodologia DMFA, a qual requer um insetário com grande capacidade produtiva e principalmente de qualidade, com anofelinos que se alimentam apropriadamente. Ademais, a metodologia em si é muito laboriosa e requer horas de dedicação, principalmente na etapa final de dissecação;
- Não há uma droga padrão para *P. vivax* na metodologia DMFA, limitando a padronização dos testes. A primaquina utilizada em *P. falciparum* com ação gametocida

não é uma alternativa, pois mostrou ineficácia no bloqueio de transmissão em dados expostos nesta tese e em estudos preliminares realizados no grupo de pesquisa.

- Por fim, as perspectivas deste estudo são continuar os testes com azul de metileno, aumentando o n do experimento de IC50, padronizar a cultura a curto prazo de gametócitos para viabilizar a metodologia SMFA em *P. vivax* para verificar, assim, a hipótese que a incubação prévia com o fármaco bloqueará a transmissão.

5. CONCLUSÕES

Do presente trabalho, concluiu-se que:

- A espécie *P. berghei* mostrou-se compatível para uma plataforma de triagem para *P. vivax*;
- O composto MMV019881 não revelou eficácia frente ao bloqueio de transmissão;
- Os compostos MMV665830, MMV665878 e MMV665941 foram denominados *hit compounds* por alta inibição nas metodologias DMFA e no desenvolvimento de oocinetos;
- O fármaco azul de metileno demonstrou IC50 menor que a droga padrão (cloroquina) e parece ser eficaz contra formas assexuadas de *P. vivax*;
- Embora o fármaco azul de metileno tenha revelado alta inibição na diferenciação de zigotos a oocinetos, a inibição na metodologia DMFA foi muito baixa e o fármaco parece não realizar bloqueio de transmissão em *P. vivax*. Mais experimentos com diferentes estratégias de incubação do composto são necessários.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. World Malaria Report 2020. World Health Organization. 2020.
2. Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitol Res.* 2019;118(1):1–27.
3. Amir A, Cheong FW, Ryan De Silva J, Wee J, Liew K, Lau YL. Infection and Drug Resistance Dovepress Plasmodium knowlesi malaria: current research perspectives. *Infect Drug Resist.* 2018;1145–55.
4. Imwong M, Madmanee W, Suwannasin K, Kunasol C, Peto TJ, Tripura R, et al. Asymptomatic Natural Human Infections With the Simian Malaria Parasites Plasmodium cynomolgi and Plasmodium knowlesi. *J Infect Dis.* 2019;219(1):695–702.
5. Brasil P, Zalis MG, Pina-costa A De, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Articles Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro : a molecular epidemiological investigation. *Lancet.* 2017;5:1038–46.
6. Lover AA, Kevin Baird J, Gosling R, Price RN. Malaria elimination: Time to target all species. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(1):17–23.
7. de Medeiros AC, Cruz LM. Boletim Epidemiológico Malária 2020. Brasília-DF; 2020.
8. Siqueira AM, Daniel-Ribeiro CT, Fontes CJF, Pereira DB, Boulos M, Lacerda MVG, et al. Guia de tratamento da malária no Brasil [Internet]. Brasília-DF; 2019. Available from: www.saude.gov.br/bvs
9. Siqueira AM, Mesones-lapouble O, Marchesini P, Sampaio VDS, Brasil P, Tauil PL, et al. Plasmodium vivax Landscape in Brazil : Scenario and Challenges. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6):87–96.
10. Neves DP. Parasitologia Humana. 12ª Edição. São Paulo; 2011. 546 p.
11. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(9):555–66.

12. Gonçalves D, Hunziker P. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malar J.* 2016;15(1):1–13.
13. Barry A, Hansen D. Naturally acquired immunity to malaria. *Parasitology.* 2016;143:125–8.
14. Moormann AM, Nixon CE. Immune effector mechanisms in malaria : An update focusing on human immunity. *Parasite Immunol.* 2019;41:1–14.
15. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1):1–11.
16. Braeckel-budimir N Van, Kurup SP, Harty JT. ScienceDirect Regulatory issues in immunity to liver and blood-stage malaria. *Curr Opin Immunol.* 2016;42:91–7.
17. Ly A, Hansen DS. Development of B Cell Memory in Malaria. *Front Immunol.* 2019;10:1–11.
18. Haldar.k M. Malaria,erythrocytic infection, anda anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2009;(574):87–93.
19. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 2015.
20. Moxon CA, Gibbins MP, Mcguinness D, Jr DAM, Marti M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2019;15:315–43.
21. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Microreview Malaria ' s deadly grip : cytoadhesion of Plasmodium falciparum -infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013;15:1976–83.
22. Mosnier LO, Lavstsen T. The role of EPCR in the pathogenesis of severe malaria. *Tromb Res.* 2017;141:46–9.
23. Taylor WR, Hanson J, Turner GD, White NJ, Dondorp AM. Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest J.* 2012;142(2):492–505.
24. Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria : Perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol [Internet].* 2012;42(12):1099–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.007>
25. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends.* 2009;25(5):220–7.
26. Fabbri C, de Cássia Mascarenhas-Netto R, Lalwani P, Melo GC, Magalhães BML,

- Alexandre M a a, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in Plasmodium vivax malaria patients evolving with cholestatic jaundice. *Malar J.* 2013;12(315):1–7.
27. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-Infected erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010;202(4):638–47.
 28. Lopes SCP, Albrecht L, Carvalho BO, Siqueira AM, Thomson-Luque R, Nogueira PA, et al. Paucity of plasmodium vivax mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *J Infect Dis.* 2014;209(9):1403–7.
 29. Hemmer CJ, Holst FGE, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in Plasmodium vivax or ovale than in Plasmodium falciparum malaria. *Trop Med Int Heal.* 2006;11(6):817–23.
 30. Dayanand KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, Drug Resistance, and Pathophysiology of Plasmodium vivax Malaria. *J Vector Borne Dis.* 2018;55(1):1–8.
 31. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. *Malar J.* 2012;11:1.
 32. Field JW, Sandosham AA, Fong YL. A Morphological Study of the Erythrocytic Parasites in Thick Blood Films, the Microscopic Diagnosis Of Human Malaria. The Government Press. 1963;20–117.
 33. Leeson HS. Microscopic diagnosis of human malaria. A morphological-study of erythrocytic parasites. *R Soc Heal J.* 1957;2.
 34. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, et al. Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One.* 2012;7(4):1–7.
 35. Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E. Lung Injury in Vivax Malaria : Pathophysiological Evidence for Pulmonary Vascular Sequestration and Posttreatment Alveolar- Capillary Inflammation. 2007;195(4):589–96.
 36. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis

- of plasmodium vivax malaria: To what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis.* 2012;55(8):67–74.
37. Costa FTM, Lopes SC, Ferrer M, Leite JA, Martin-Jaular L, Bernabeu M, et al. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: Raison d'être? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(SUPPL. 1):79–84.
 38. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: A systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012;11(12):1–18.
 39. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;
 40. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(Suppl 6):35–51.
 41. Rout S, Kanta R. *Plasmodium falciparum* : Multidrug resistance. *Chem Biol Drug Des.* 2019;93:737–59.
 42. Commons RJ, Simpson JA, Thriemer K, Humphreys GS, Abreha T, Alemu SG, et al. The effect of chloroquine dose and primaquine on *Plasmodium vivax* recurrence : a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis. *Lancet.* 2018;18:1025–34.
 43. Wells TNC, Huijsduijnen RH Van, Voorhis WC Van. Malaria medicines : a glass half full ? *Nat Rev.* 2015;14:424–42.
 44. Efferth T, Schawarzi S, Smith J, Osieka R. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13:527–8.
 45. Baird JK, Battle KE, Howes RE. Primaquine ineligibility in anti - relapse therapy of *Plasmodium vivax* malaria : the problem of G6PD deficiency and cytochrome P - 450 2D6 polymorphisms. *Malar J.* 2018;17:1–6.
 46. Monteiro WM, Val FFA, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, et al. G6PD deficiency in Latin America : systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:553–68.
 47. Peixoto HM, Brito MAM, Romero GAS, Monteiro WM, Lacerda MVG De, Oliveira

- MRF De. Cost - effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2016;15:1–10.
48. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med.* 2009;361(5):455–67.
 49. Lo E, Hemming-schroeder E, Yewhalaw D, Nguyen J, Kebede E, Zemene E, et al. Transmission dynamics of co-endemic *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in Ethiopia and prevalence of antimalarial resistant genotypes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):1–25.
 50. Rieckmann K, Davis D, Hutton D. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet.* 1989;2:1183–4.
 51. Lizcano OV, Resende SS, Chehuan YF, Lacerda MVG, Brito CFA, Zalis MG. Genetic diversity of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* parasites from the western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(7):948–51.
 52. Faway E, Musset L, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, et al. *Plasmodium vivax* multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malar J.* 2016;15(1):1–7.
 53. Garavelli PL, Corti E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:128.
 54. Alecrim GC, Alecrim W, Macêdo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(1):67–8.
 55. Santana Filho FS, Arcanjo ARL, Chehuan YF, Costa MRF, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine- Resistant *Plasmodium vivax* , Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):1125.
 56. Marques MM, Costa MRF, Filho FSS, Nascimento MTS, Brasil LW, Silveira H, et al. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):342–7.
 57. Silva SR, Cristine A, Almeida G, Allan G, Ramasawmy R, Costa S, et al. Chloroquine resistance is associated to multi - copy pvcr1 - o gene in *Plasmodium*

- vivax malaria in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2018;17:1–8.
58. Kittichai V, Nguitragool W, Gaelle H, Mbenda N, Cui L. Genetic diversity of the *Plasmodium vivax* multidrug resistance 1 gene in Thai parasite populations. *Infect Genet Evol.* 2019;64:168–77.
 59. Thomas D, Tazerouni H, Gnana K, Sundararaj S, Cooper JC. Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of *Plasmodium vivax*. *Acta Trop.* 2016;160:35–8.
 60. Baird JK, Hoffman SL. Primaquine Therapy for Malaria. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1336–45.
 61. Fernando D, Rodrigo C, Rajapakse S. Primaquine in vivax malaria : an update and review on management issues. *Malar J.* 2011;10(351):1–12.
 62. Ponsa N, Sattabongkot J, Kittayapong P, Eikarat N, Coleman RE. Transmission-blocking activity of tafenoquine (WR-238605) and artelinic acid against naturally circulating strains of *plasmodium vivax* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(5):542–7.
 63. Brueckner R, Lasseter K, Lin E, Schuster B. First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(5):645–9.
 64. Milhous W. Development of new drugs for chemoprophylaxis of malaria. *Soc Pathol Exot.* 2001;94:149–51.
 65. Lacerda M, Llanos-Cuentas A, Krudsood S, Lon C, Saunders D, Mohammed R et al. Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. *N Engl J Med.* 2019;380(3):215–28.
 66. World Health Organization. World Malaria Report 2019. 2019.
 67. Pan American Health Organization. Epidemiological Update Malaria in the Americas in the context of COVID-19 pandemic. 2020.
 68. World Health Organization. A framework for malaria elimination. 2017.
 69. Lima AC da SF. Avaliação de Mosquiteiros Impregnados com Inseticidas de Longa Duração: MILD em três regiões do município de Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil. 2016.
 70. Perera R, Caldera A, Wickremasinghe AR. Reactive Case Detection (RACD) and

- foci investigation strategies in malaria control and elimination : a review. *Malar J*. 2020;19(401):1–11.
71. Pan American Health Organization. Fourth meeting of the malaria technical advisory group (malaria tag) to the pan american health organization (paho). 2019.
 72. World Health Organization. Mass drug administration for falciparum malaria. 2017.
 73. Hemingway J, Shretta R, Wells TNC, Bell D, Djimdé A, Achee N, et al. Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination : What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria ? *Plos Biol*. 2016;14(3):1–14.
 74. Laurens MB. RTS , S / AS01 vaccine (Mosquirix TM): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(3):480–9.
 75. Tran TM, Portugal S, Draper SJ, Crompton PD. Malaria Vaccines: Moving Forward After Encouraging First Steps. *Curr Trop Med Reports*. 2015;2(1):1–3.
 76. Birkholtz L-M, Coetzer TL, Mancama D, Leroy D, Alano P. Discovering New Transmission-Blocking Antimalarial Compounds: Challenges and Opportunities. *Trends Parasitol*. 2016;32(9):669–81.
 77. Nikolaeva D, Draper SJ, Biswas S. Toward the development of effective transmission-blocking vaccines for malaria. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(5):653–80.
 78. Delves MJ, Ramakrishnan C, Blagborough AM, Leroy D, Wells TNC, Sinden RE. A high-throughput assay for the identification of malarial transmission-blocking drugs and vaccines. *Int J Parasitol*. 2012;42(11):999–1006.
 79. Ruecker A, Mathias DK, Straschil U, Churcher TS, Dinglasan RR, Leroy D, et al. A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay To Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7292–302.
 80. Sanders NG, Sullivan DJ, Mlambo G, Dimopoulos G, Tripathi AK. Gametocytocidal Screen Identifies Novel Chemical Classes with *Plasmodium falciparum* Transmission Blocking Activity. *PLoS One*. 2014;9(8):1–13.
 81. Miguel-Blanco C, Lelièvre J, Delves MJ, Bardera AI, Presa JL, López-Barragán MJ, et al. Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum*

- female gamete formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3298–305.
82. Almela MJ, Lozano S, Lelièvre J, Colmenarejo G, Coterón JM, Rodrigues J, et al. A new Set of chemical starting points with *Plasmodium falciparum* transmission-blocking potential for antimalarial drug discovery. *PLoS One.* 2015;10(8):1–18.
83. Calit J, Dobrescu I, Gaitán XA, Borges MH, Ramos MS, Eastman RT, et al. Screening the Pathogen Box for Molecules Active against *Plasmodium* Sexual Stages Using a New Nanoluciferase-Based. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(11):1–9.
84. Alessandro SD, Silvestrini F, Dechering K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, et al. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. 2013;(May):2048–58.
85. Sun W, Tanaka TQ, Magle CT, Huang W, Southall N, Huang R, et al. Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. *Sci Rep.* 2014;4:1–11.
86. Bowman JD, Merino EF, Brooks CF, Striepen B, Carlier PR, Cassera MB. Antiapicoplast and gametocytocidal screening to identify the mechanisms of action of compounds within the malaria box. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Feb;58(2):811–9.
87. Lucantoni L, Duffy S, Adjalley SH, Fidock DA, Avery VM. Identification of MMV Malaria Box Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Early-Stage Gametocytes Using a Luciferase-Based High-Throughput Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):6050–62.
88. Lucantoni L, Fidock DA, Avery VM. Transmission-Blocking Compounds against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2097–107.
89. Plouffe DM, Wree M, Du AY, Meister S, Li F, Patra K, et al. High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host Microbe.* 2016;19(1):114–26.
90. Dehghan H, Oshaghi MA, Mosa-Kazemi SH, Abai MR, Rafie F, Natheghpour M, et al. Experimental Study on *Plasmodium berghei*, *Anopheles Stephensi*, and BALB/c Mouse System: Implications for Malaria Transmission Blocking Assays. *Iran J.* 2018;13(4):549–59.

91. Blagborough a M, Churcher TS, Upton LM, Ghani a C, Gething PW, Sinden RE. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. *Nat Commun.* 2013;4(May):1812.
92. Ponzi M, Sidén-kiamos I, Bertuccini L, Currà C, Kroeze H, Camarda G, et al. Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1 / PEG3 protein. *Cell Microbiol.* 2009;11(May):1272–88.
93. Galinski MR, Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*. Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. In: *Advances in Parasitology*. Elsevier; 2013. p. 1–26.
94. Miura K, Swihart BJ, Fay MP, Kumpitak C, Kiattibutr K, Sattabongkot J, et al. Evaluation and modeling of direct membrane - feeding assay with *Plasmodium vivax* to support development of transmission blocking vaccines. *Sci Rep.* 2020;10:1–13.
95. Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, dos Santos E V, Pessoa FA, et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2013;12(1):1–10.
96. Adjalley SH. e SH, Johnston GLGL. b, Li TT., Eastman RTRT. f, Eklund EH. EH, Eappen AG. AGAG., et al. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission blocking activity by methylene blue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(47):E1214–23.
97. Chotivanich K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Looareesuwan S, Day NPJ, Coleman RE, et al. Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):1927–30.
98. Goodman C, Siregar JE, Mollard V, Vega-Rodriguez J, Syafruddin D, Matsuoka H, et al. Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science (80-).* 2016;352(6283):349–53.
99. Ferrer P, Vega-rodriguez J, Tripathi AK, Jacobs-lorena M, Sullivan DJ. Antimalarial Iron Chelator FBS0701 Blocks Transmission by *Plasmodium falciparum* Gametocyte Activation Inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1418–26.
100. Kobylinski KC, Foy BD, Richardson JH. Ivermectin inhibits the sporogony of

- Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malar J* [Internet]. 2012;11(381):1–9. Available from: *Malaria Journal*
101. Pelt-Koops J van, Pett HE, Graumans W, Vegte-bolmer M Van Der, Gemert GJ Van, Rottmann M, et al. The Spiroindolone Drug Candidate NITD609 Potently Inhibits Gametocytogenesis and Blocks *Plasmodium falciparum* Transmission. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3544–8.
 102. Vos MW, Stone WJR, Koolen KM, van Gemert G-J, van Schaijk B, Leroy D, et al. A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Sci Rep*. 2015;5(November):1–13.
 103. Bolscher JM, Koolen KMJ, Van Gemert GJ, Van de Vegte-Bolmer MG, Bousema T, Leroy D, et al. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2014;70(5):1357–66.
 104. Balaich JN, Mathias DK, Torto B, Jackson BT, Tao D, Ebrahimi B, et al. The Nonartemisinin Sesquiterpene Lactones Parthenin and Parthenolide Block *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Transmission. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2108–17.
 105. Kone A, Vegte-Bolmer M van de, Siebelink-Stoter R, Gemert GJ Van, Dara A, Niangaly H, et al. Sulfadoxine-pyrimethamine impairs *Plasmodium falciparum* gametocyte infectivity and *Anopheles* mosquito survival. *Int J Parasitol*. 2010;40(10):1221–8.
 106. Pinilla YT, C. P. Lopes S, S. Sampaio V, Andrade FS, Melo GC, Orfanó AS, et al. Promising approach to reducing Malaria transmission by ivermectin: Sporontocidal effect against *Plasmodium vivax* in the South American vectors *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(2):1–23.
 107. Popovici J, Vantaux A, Primault L, Samreth R, Piv EP, Bin S, et al. Therapeutic and Transmission-Blocking Efficacy of Dihydroartemisinin / Piperaquine and Chloroquine against. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(8):1516–9.
 108. MMV. Medicines for Malaria Venture [Internet]. 2019. Available from: <http://www.mmv.org/>

109. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLoS One*. 2013;8(6):1–8.
110. Guttman R, Ehrlich P. Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *BKW*. 1891;28:953–6.
111. Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, et al. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep*. 2003;8(5):272–5.
112. Ginemuge P, Jyothi S. Methylene blue: Revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2010;26(4):517–20.
113. Bosson-Vanga H, Franetich JF, Soulard V, Sossau D, Tefit M, Kane B, et al. Differential activity of methylene blue against erythrocytic and hepatic stages of *Plasmodium*. *Malar J*. 2018;17(1):1–10.
114. Wadi I, Pillai CR, Anvikar AR, Sinha A, Nath M, Valecha N. Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes: Implications for transmission-blocking. *Malar J*. 2018;17(11):1–9.
115. Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J, et al. Communications in Free Radical Research Methylene blue as an antimalarial agent Short refereed paper. *Redox Rep*. 2013;8(5):272–5.
116. Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP, Schirmer RH. Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against *Falciparum Malaria* : A Randomised Controlled Trial. *PLoS One*. 2009;4(5):1–6.
117. Coulibaly B, Pritsch M, Bountogo M, Meissner PE, Nebié E, Klohe C, et al. Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine-methylene blue for *falciparum malaria* in children: A randomized controlled trial in Burkina Faso. *J Infect Dis*. 2015;211(5):689–97.
118. Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(6):627–39.
119. Müller O, Lu G, Jahn A, Mockenhaupt FP. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(7):471–3.

120. Suwanarusk R, Russell B, Ong A, Sriprawat K, Chu CS, Pyaephyo A, et al. Methylene blue inhibits the asexual development of vivax malaria parasites from a region of increasing chloroquine resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:124–9.
121. Wirjanata G, Sebayang BF, Chalfein F, Handayuni I, Trianty L, Kenangalem E. Potent Ex Vivo Activity of Naphthoquine and Methylene Blue against Drug-Resistant Clinical Isolates of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6117–24.

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1 Procedimentos operacionais padrões

7.1.1 Protocolo de preparação para coluna de celulose – CF 11

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE
PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP	POP_IPCCB_LAB_001_v01_PT		
Título	PREPARAÇÃO DE COLUNA DE CELULOSE CF11		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Macejane Ferreira de Souza	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 20/01/2018

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de confecção de coluna de celulose, conduzido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostra que seja necessário a remoção de leucócitos.

3. SIGLAS

UV	Radiação Ultravioleta
----	-----------------------

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica

5. RESPONSABILIDADES

Estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução das técnicas com amostra biológica.

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

- Seringa de 10 ml
- Tubo Falcon de 15 ml
- Fita adesiva
- Lã de vidro
- Celulose CF11
- Pipeta de Pasteur
- Suporte para tubos Falcon
- Câmara de Fluxo Laminar

7. PROCEDIMENTOS

1. Primeiro, deve-se deixar todos os materiais que serão utilizados no UV, dentro da câmara de fluxo laminar, durante 20 minutos para descontaminação;
2. Colocar o tubo Falcon em um suporte e retirar a tampa;
3. Retirar a seringa da embalagem e remover o êmbolo da mesma;
4. Conectar a seringa, com o orifício maior virado para cima, ao tubo Falcon utilizando uma fita adesiva;
5. Pegar uma pequena quantidade de lã de vidro e cobrir superficialmente o orifício menor da seringa, com ajuda de uma pinça ou pipeta;
6. Colocar a celulose na seringa até atingir a marca de 4 ou 5 ml;
7. Deixar no UV a coluna no UV por 15 minutos.

7.1.2 Protocolo de preparação de meios incompletos: RPMI, MCCOY E IMDM

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_002_v01_PT		
Título	PREPARAÇÃO DE MEIOS INCOMPLETOS E COMPLETOS: RPMI, MCCOY 5A E MEIO DE CULTIVO DE DULBECCO MODIFICADO POR ISCOVES (IMDM- <i>ISCOVE'S MODIFIED DULBECCO'S MEDIUM</i>)		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Macejane Ferreira Glenda Ramos	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 20/06/2018

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de confecção de meios incompletos (RPMI e Meio McCoy 5A e IMDM), conduzido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostras biológicas.

3. SIGLAS

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica

5. RESPONSABILIDADES

Estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução das técnicas que envolvam o uso dos meios citados.

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

Materiais

- Espátula inox com colher;
- Recipientes para pesagem;
- Béquer de 1L;
- Balão volumétrico de 1L;
- Barra magnética (Bailarina);
- Garrafas estéreis.

Reagentes

- Frasco de Meio (RPMI, IMDM, MCCOY 5^a)
- Glicose;
- Bicarbonato de Sódio;
- Água mili-Q ou destilada.

Equipamentos

- Bomba de vácuo;
- Agitador magnético;
- Balança analítica
- Câmara de Fluxo Laminar
- Geladeira

7. PROCEDIMENTOS

1. Observar o rótulo dos meios a serem preparados. Caso o meio em pó, não contenha glicose e bicarbonato de sódio, pesar 2,4 g de glicose e 2,4 g de bicarbonato de sódio.
2. Ligar a balança analítica e verificar se está calibrada;
3. Seleciona a unidade de pesagem em gramas (G);
4. Coloca o recipiente de pesagem vazio e tara a balança;
5. Adiciona-se dentro do recipiente, utilizando uma espátula e pesa 2,4 g de glicose e bicarbonato

Preparação RPM e McCoy 5A incompleto

1. Em um béquer de 1 litro, coloca o conteúdo total do meio em pó, a glicose e o bicarbonato de sódio em 1 litro de água destilada;
2. Homogeneizar o meio em agitador magnético por 40 minutos até dissolver completamente;
3. Filtrar à vácuo em garrafa de com membrana de 0.22 um ou 0.49 um. Este procedimento deve ser feito em câmara de fluxo laminar. **OBS:** Na ausência de garrafa, filtrar o meio com filtro de 0.22 um ou 0.49 um e seringa.
4. Identificar-se a garrafa com o nome do meio e data de preparação e guarda na geladeira.

Meio IMDM incompleto

1. Adicionar 1000 ml de água destilada em um Becker de vidro e adicionar os reagentes abaixo relacionados, na ordem que se apresentam, agitando levemente entre uma adição e outra:
 - a. 3,024 g/ L de Bicarbonato de Sódio
 - b. 3,024 g/L de Glicose
 - c. 1 envelope de IMDM comercial.

2. Levar a solução ao agitador magnético;
3. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução e armazenar em vidro estéril no freezer 20° até o uso.

7.1.3 Protocolo de preparação de percoll 45%

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA FUNDAÇÃO DE
MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP	POP_IPCCB_LAB_003_v01_PT	Versão 01	
Título	PERCOLL 45%		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aprovação:
Camila Fabbri	Stefanie Lopes	Stefanie Lopes	18/04/2018

1. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para o preparo do percoll 45%

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratório de Cultura

3. DEFINIÇÕES

EPIs: Equipamentos de proteção individual

RCF: do inglês *Relative Centrifugal Force*, é a unidade padrão para medidas de centrífugas

RPM: rotações por minuto. Uma das unidades de rotação da centrífuga que não leva em conta o diâmetro do equipamento.

RPMI 1X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 1 litro de água destilada filtrada.

RPMI 10X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 50 mL de água destilada filtrada.

4. RESPONSABILIDADES

4.1 Equipe do laboratório de cultura: verificar se todos os reagentes estão dentro da validade e o suficiente em estoque, realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar o preparo do percoll 45%, utilizar todos os EPIs (luvas, máscara e touca).

5. POP'S RELACIONADOS

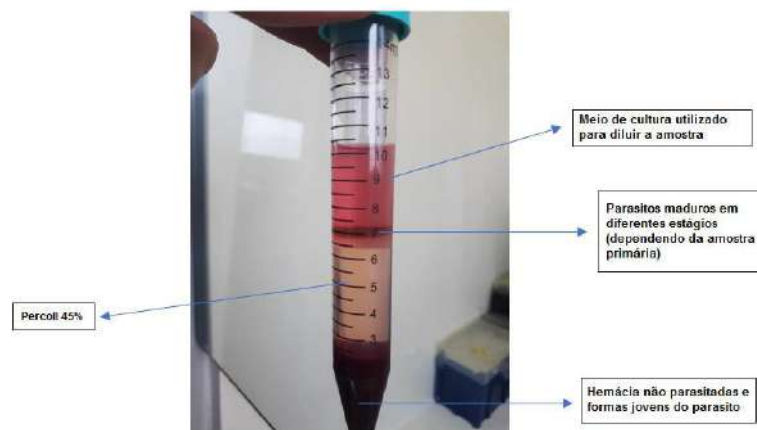
- POP 001 – coluna de celulose
- POP 002 - Meios de cultura;
- POP 004 - Produção de Oocinetos;

6. MATERIAIS

- RPMI1X – lavagem;
- RPMI 10X;
- Água mili-q ou água destilada filtrada em filtro 22 µM;
- Soro AB;
- Falcons de 15 mL;
- Pipetas 10 mL;
- Pipetas Pasteur;
- Câmara de fluxo laminar;
- Centrífuga.

7. PROCEDIMENTOS

1. Para a preparação do percoll 45% será necessário: tubo falcon estéril de 15 mL, percoll, meio RPMI 10X, meio RPMI 1X (checar o POP de meios de cultura), água destilada filtrada com filtro de seringa de especificação 20 μm e pipeta estéril descartável pasteur;
2. Em um falcon de 15 mL pipetar: 4,5 mL de água, 4,5 mL de percoll, 1 mL de RPMI 10x. Homogeneizar vertendo o tubo falcom fechado. Isso é a conta para 10 mL de percoll 45%. Passar 5 mL para outro falcon de 15 mL, tendo assim, dois falcons com 5 mL de percoll 45% cada;
3. Em posse da amostra a ser utilizada (cultura de gametócitos, cultura de oocinetos, amostra fresca proveniente da coluna de celulose, dentre outras) com objetivo de enriquecer utilizando o percoll 45%, diluir a amostra na proporção de 1:1 usando o meio RPMI 1X;
4. Adicionar a amostra diluída vagarosamente no percoll 45% na proporção de 1:1. Ou seja, se há 5 mL de percoll 45% no falcon de 15 mL, apenas 5mL da amostra diluída deve ser adicionada. Esse processo deve ser realizado com o tubo falcon já contendo o percoll 45% inclinado em 45 graus e a amostra diluída sendo adicionada vagarosamente com auxílio de uma pipeta pasteur. Quando a primeira cada de amostra estiver formada sobre o percoll 45%, o tubo pode voltar a posição de 90 graus e o ritmo de adição da amostra pode ser acelerado;
5. Centrifugar o tubo falcon por 15 min, 1500g (ou RCF), sem freio e sem aceleração;
6. Após a centrifugação, deverá formar as seguintes camadas:



7. Com atenção e uma pipeta pasteur estéril, retirar o anel de parasitas maduros e transferir para um falcon 15 mL limpo. Pode retirar também o meio simultaneamente. Cautela para não gerar refluxo no momento que estiver sugando o anel, dessa forma, retirar aos poucos;
8. Com o falcon de 15 mL contendo meio e o anel de parasitos maduros, centrifugar em 1500 RPM por 5 min. Irá formar um pellet bem pequeno no fundo do falcon;
9. Lavar o pellet com RPMI 1x. Repetir o procedimento mais duas vezes;
10. Após as lavagens, retirar o máximo do sobrenadante do pellet (de forma segura, com uma ponteira de 50 uL) e homogeneizar. Esse é o pellet de parasito maduros pronto para ser utilizado no próximo passo do objetivo final da amostra que está sendo processada.

7.1.4 Protocolo de cultura de oocineto

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE
PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP	POP_IPCCB_LAB_004_v01_PT	Versão 01	
Título	PRODUÇÃO DE OOCINETOS		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aprovação:
Camila Fabbri	Stefanie Lopes	Stefanie Lopes	18/04/2018

1. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para a produção de oocinetos

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratório de Cultura

3. DEFINIÇÕES

EPIs: Equipamentos de proteção individual

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Media diluído em 1 litro de água destilada filtrada.

Oocineto: Fase móvel do zigoto em alguns protozoários.

RCF: do inglês *Relative Centrifugal Force*, é a unidade padrão para medidas de centrífugas

RPM: rotações por minuto. Uma das unidades de rotação da centrífuga que não leva em conta o diâmetro do equipamento.

RPMI 1X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 1 litro de água destilada filtrada.

RPMI 10X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 50 mL de água destilada filtrada.

4. RESPONSABILIDADES

4.1 Equipe do laboratório de cultura: verificar se todos os reagentes estão dentro da validade e o suficiente em estoque, realizar todo o procedimento prévio de assepsia do fluxo laminar antes de iniciar a produção de oocinetos e utilizar todos os EPIs (luvas, máscara e touca).

5. POP'S RELACIONADOS

- POP 001 - Coluna de celulose;
- POP 002 - Meios de cultura;
- POP 003 - Percoll 45%

6. MATERIAIS

- Meio de Cultura RPMI 1X;
- Meio de cultura IMDM;
- Soro AB;
- Soro Fetal Bovino;
- Falcons de 15 mL;
- Falcons de 50 mL;

- Garrafas de 40 mL
- Pipetas volumétricas estéreis de 10 mL;
- Pipetas Pasteur estéreis e descartáveis;
- Hipoxantina;
- Soluções estoque: TRIS 50 mM, NaCl 850 mM, Glicose 50 mM, NaHCO₃ 125 mM e Ácido xanturênico 12 mM.
- Centrífuga
- Camara de fluxo laminar
- Incubadora entre 24-25 °C

7. PROCEDIMENTOS

Preparo das soluções estoque:

Obs 1: As soluções que utilizam água destilada, a mesma precisa ser filtrada antes com filtro de seringa 0,22 µm OU filtrar a solução após pronta com o mesmo filtro, lembrando que para cada solução usar um filtro e seringa distintos.

Obs 2: A solução de ácido xanturênico não precisa ser filtrada, pois a mesma utiliza DMSO estéril

Obs 3: Todas as soluções devem ser produzidas em câmara de fluxo e armazenar em 4°C.

- **Tris 50 mM:** pesar 0,3g e diluir em 50 mL de água destilada;
- **NaCl 850 mM:** pesar 2,25g e diluir em 50 mL de água destilada;
- **Glicose 50 mM:** pesar 0,45g diluir em 50 mL de água destilada;
- **NaHCO₃ 125mM:** pesar 0,105g diluir em 50 mL de água destilada;
- **Ácido xanturênico:** 2,5mg e diluir em **1 mL de DMSO estéril**

Preparação das soluções de uso:

Obs: Todas as soluções devem ser preparadas em câmara de fluxo.

- **Solução de exflagelação:** em um falcon de 50 mL, adicionar: 10 mL de Tris, 10 mL de NaCl, 10 mL de Glicose, 10 mL de NaHCO₃, 413 µL de ácido xanturênico e 9,583 mL de soro fetal bovino. Verificar o pH (pH 8.0) com auxílio de uma fita de pH;

- **Meio de cultura oocineto:** 10 mL de soro AB, 40 mL de meio de cultura IMDM e 2,5 mg de Hipoxantina. Primeiro diluir a hipoxantina em 40 mL de IMDM. Por fim, adicionar 10 mL de soro AB. Verificar o pH (pH 8,0).

Produção de oocinetos:

1. Coletar 1 tubo de heparina (10 mL) de um paciente com *P. vivax* 2 cruzes. 1 tubo é suficiente para 1 cultura. Logo, se for realizar mais de uma cultura (teste com droga) coletar na proporção (ver POP DE COLETA DE SANGUE);
2. Realizar filtração por coluna de celulose (ver POP COLUNA DE CELULOSE);
3. Após a última lavagem, reservar a papa;
4. Em uma placa de 6 poços estéril, adicionar **2 mL da papa em 8 mL da solução de exflagelação (hematócrito de 20%). Incubar por 1 hora em estufa a 24°C** (a estufa está no laboratório de cultura na gerência de entomologia);
5. Após 1 hora, com o auxílio de 1 pipeta volumétrica estéril de 10 mL, transferir a cultura para um falcon de 15mL ou de 50 mL (dependendo da quantidade). Caso fique resquício de sangue no fundo do poço, adicionar 1 mL de meio de cultura RPMI 1x, homogeneizar com o auxílio da pipeta e transferir para o falcon;
6. Centrifugar 2000 RPM/5 min. Caso não ocorra uma boa separação da papa, repetir a centrifugação;
7. Retirar sobrenadante com o auxílio de uma pipeta pasteur;
8. Ressuspender a papa com meio de lavagem RPMI na proporção 1:1. Exemplo: se tiver 3mL de papa, adicionar 3 mL de meio RPMI para lavagem;
9. Realizar percoll 45% com cada amostra (VER POP PERCOLL 45%);
10. Em garrafas de cultura (40 mL) sem filtro, colocar 2 mL de papa para **8 mL de meio de cultura oocineto (hematócrito de 20%). IMPORTANTE: caso seja realizado teste de droga, realizar uma garrafa para cada diluição e um controle (sem droga);**
11. Colocar mistura gasosa em cada garrafa;
12. Incubar as garrafas por 24 horas em estufa a 24°C.

13. Após 24h de cultivo, retirar a cultura da estufa e levar para o fluxo laminar. Com auxílio de uma pipeta de 10 mL retirar o conteúdo e transferir para um falcon de 15 mL ou de 50 mL, dependendo da quantidade total de cultura.
14. Lavar a garrafa com meio de cultura RPMI (cerca de 1 mL) para retirar a papa “grudada” no fundo da garrafa. Transferir também para o falcon;
15. Centrifugar o falcon em 2000 rpm por 5 min. Se verificar que não separou bem (meio e papa), repetir a centrifugação;
16. Retirar o sobrenadante, reservar a papa;
17. Pipetar 3 uL do pellet e fazer esfregaços. Identificar as lâminas com “oocineto” e a data do dia;
18. Corar as lâminas com panótico, depois de secas. Utilizar o metanol previamente para fixar o conteúdo;
19. Secar as lâminas com secador e proceder com a leitura. Contar a quantidade de oocinetos em 1000 hemácias encontradas.

7.1.5 Protocolo de manutenção da colônia

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE
PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP	POP_IPCCB_LAB_005_v01_PT		
Título	PROCEDIMENTO PARA MANUTENÇÃO DE COLÔNIAS DE ANOFELINOS.		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Anne de Almeida Keillen Campos Rosa Santana Iria Rodriguez	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 13/03/2016

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de manutenção de Colônias de anofelinos conduzido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostras.

3. DEFINIÇÕES

Não se aplica

4. RESPONSABILIDADES

Estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução das técnicas que envolvam o uso dos meios citados.

5. POPs RELACIONADOS

- POP 006 – Infecção experimental - DMFA
- POP 007 - Dissecção e Detecção Microscópica da Infecção de anofelinos por *Plasmodium* spp.

6. MATERIAIS

- Bacias plásticas retangulares (17 x 24 x 4 cm)
- Bacias retangulares grandes (30 X 22 X 6 cm)
- Bacias plásticas redondas (22 cm de diâmetro X 12 cm de altura)
- Bacias plásticas (40 X 26 X 7 cm),
- Gaiola 17 cm de diâmetro X 17 cm de altura

- Erlenmeyer de 50ml
- Copos de Postura
- Açúcar cristal
- Papel de filtro
- Água
- Sal marinho
- Papel toalha
- Gaze
- Algodão bola/ Algodão em rolo
- Fitas adesivas para identificação
- Copinhos plásticos descartáveis com 120ml de capacidade
- Esponja
- Camundongos
- Freezer - 20°C
- Termohigrometro digital

7. PROCEDIMENTOS

Procedimentos com os ovos e larvas pequenas

1. Na postura forçada, após dois a três dias, os mosquitos sobreviventes são removidos, com o auxílio de capturador de Castro e com um pissete, joga-se água pelas bordas dos mesmos (nos papéis-filtro), para que todos os ovos do aparato sejam transferidos para a bacia;
2. Esperar a eclosão das larvas por dois a três dias, colocando comida para larvas pequenas nas próprias bacias. Nesta etapa a água não é trocada e a bacia é manipulada o mínimo possível, adicionando mais comida e água caso seja necessário;
3. Dois a três dias após a eclosão dos ovos, retirar lentamente o papel filtro colocado da lateral interna das bacias e, utilizando um pedaço de papel toalha ou de papel higiênico retirar o excesso de sujeira da superfície incluindo os ovos restantes em seguida, transferir as larvas para bacias plásticas retangulares (17 x 24 x 4 cm), com

aproximadamente 120 ml de água (em geral 100 a 150 larvas por bacia para *An. aquasalis*);

4. Após distribuir as larvas, marcar as bacias com fita adesiva da cor definida para a espécie, anotando na fita a data da transferência.

OBS: Sempre que nova bacia for aberta, colocar a fita com a data em que a larva foi colocada no copo (e NÃO a data de transferência). Esta data indica a idade aproximada da larva.⁴ Com um estilete, segurar o tórax do mosquito, e com outro puxar o último segmento abdominal, de forma lenta e suave para permitir a saída do intestino médio.

Procedimentos com as larvas

1. Diariamente, limpar as bacias com um pedaço de papel toalha ou de papel higiênico. Estes pedaços devem ser cortados e estocados (procurar evitar o uso de papéis que não absorvem muita água);

OBS: Colocar o papel na superfície da água, retirando assim o excesso de comida e as exúvias. O papel flutua e se adere à sujeira que está na superfície. As larvas não se grudam.

2. Para repor a água perdida por evaporação, ao longo do dia e no papel, durante a limpeza, adicionar aproximadamente 60 ml de água em cada bacia;
3. Após o processo de limpeza das bacias, alimentar as larvas com comida;

OBS: Muita comida suja as bacias. Pouca comida provoca canibalismo. A quantidade ideal é conseguida com a prática.

4. Quando as larvas atingirem o estágio (L3), transferi-las para bacias retangulares 17 X 24 X 4 cm), com aproximadamente 240mL de água (em torno de 1 cm de lâmina de água). Nesta etapa, as larvas devem ser separadas por tamanho;

OBS: Devem ser colocadas de 100 a 150 por bacia para *An. aquasalis*.

5. Após a limpeza diária das bacias, coloca-se comida;

OBS: se houver excesso de comida na superfície da água nas bacias retangulares é preciso passar papel toalha para remover.

6. Retirar, diariamente, as pupas das bacias, logo pela manhã. Para isto, usar pipetas plásticas descartáveis tipo Pasteur com a ponta cortada, para ficar larga. As pupas são contadas e encaminhadas para as respectivas gaiolas;
7. Não descartar as pipetas e usar uma para cada espécie. As pipetas são marcadas com fita da cor correspondente a espécie e são mantidas, na sala de larvas, em vidros separados, contendo solução de hipoclorito;
8. Quando uma bacia for descartada, retirar a fita colorida de identificação ainda na sala de larvas e jogar fora. Este procedimento facilita a lavagem.
9. Na parte da tarde, verificar a quantidade de comida em todas as bacias e, se necessário, adiciona-se um pouco mais de comida. As larvas mais vorazes são as L2 e L3.

Procedimento com as pupas

1. Colocar no máximo 300 pupas em cada recipiente (copinhos de 120 ml);
2. Colocar aproximadamente 300 pupas em cada gaiola (17 cm de diâmetro X 17 cm de altura);
3. Colocar pupas em uma mesma gaiola por no máximo 3 dias.

Preparações das gaiolas para os adultos

1. Verificar as condições das caixas que já estão limpas e guardadas;
2. Adicionar papel-filtro cortado (redondo) no fundo da gaiola;
3. Na parte externa da gaiola colar sobre a fita marrom a etiqueta referente a abertura da nova gaiola, contendo informações referentes a espécie que está trabalhando, o nº da gaiola, a espécie, data de abertura, responsável, data de alimentação e colar o durex da cor referente a espécie.

OBS: sempre é necessário o preenchimento de todas as informações.

1. Introduzir na gaiola uma mamadeira com solução de sacarose a 10%;
2. Colocar o copo com as pupas na gaiola e anotar na ficha correspondente, o número da gaiola, data de abertura, espécie, número de pupas adicionadas por dia e o somatório do número de pupas;

3. Pôr um pano (ou uma gaze) umedecido sobre cada gaiola. Estes devem ser molhados diariamente (mas não encharcados).

Manutenções das gaiolas com adultos

1. Inspeccionar as gaiolas diariamente, retirando copos nos quais os adultos já emergiram;

OBS: Os copos com água atraem os adultos, principalmente os machos, que acabam morrendo, diminuindo a taxa de fêmeas inseminadas.

2. A primeira alimentação em geral é feita com 7 dias após a abertura da gaiola (em caso dessa gaiola ser usada na colônia), em casos de infecção utiliza-se mosquitos com 3 a 5 dias após a abertura da mesma - quando esta é montada em apenas um ou dois dias – ou 4 a 6 dias, quando a gaiola for montada por mais de dois dias;
3. São usados camundongos ou hamster anestesiados segundo o POP_MAL_LB_016_v01D_PT, para alimentar os anofelinos. Estes são colocados sobre as gaiolas por no máximo 40 minutos;
4. Anotar data e dados relativos à alimentação na ficha correspondente a cada gaiola. Da mesma forma, anotar o destino de cada gaiola, com a data (se foi entregue para alguém, se os mosquitos sobreviventes depois de algum tempo, foram colocados em alguma outra gaiola – neste caso, em qual gaiola e a data);

OBS: Em caso de “fusão” de gaiolas, descartar a de menor número e manter na colônia a mais recente.

5. Colocar as fêmeas em postura forçada três dias após a alimentação sanguínea;
6. Alternativamente, realiza-se postura forçada, um aparato plástico (8,5 cm de diâmetro X 4,5 cm de altura), com a parte superior recoberta por uma tela de nylon com um pequeno orifício (que permite a introdução dos mosquitos). O aparato plástico fica mergulhado em uma bacia (18 x 8 cm) contendo solução de sal marinho a 0,2%, e com as paredes interna recoberta com papel-filtro (Figura 1);



Figura 1. Postura Forçada

7. Dois a três dias após a alimentação as fêmeas são transferidas para o aparato de postura onde permanecem por dois a três dias.

OBS: ao abrir o manguito, para manipular a gaiola, soprar para dentro, de forma a manter os anofelinos no interior.

Limpeza das bacias e gaiolas

1. Lavar as bacias com esponja destinada apenas para isto, SEM sabão ou detergente. Verificar se as etiquetas foram retiradas. Esfregar bastante, enxaguar bastante, e deixar escorrendo. No dia seguinte, organizar as bacias em seus devidos lugares.

OBS: No caso das esponjas verde-amarelas (de cozinha), usar apenas o lado amarelo (o lado verde arranha, criando nichos propícios ao acúmulo de sujeira e à proliferação de micro-organismos).

2. Colocar as gaiolas das quais os mosquitos devem ser descartados na geladeira ou no freezer a -20°C por, pelo menos, uma noite. É importante que, pela manhã, o freezer seja esvaziado antes que gaiolas sejam lá colocadas. As gaiolas retiradas do freezer devem ser limpas. Para isto, o manguito é aberto (envolvendo a própria gaiola), a gaiola é sacudida sobre a lata de lixo e o papel-filtro do fundo é retirado. Periodicamente, é conveniente colocar as gaiolas para tomar sol, depois que saem do freezer e são limpas.

Controles de temperatura e umidade relativa no insetário

1. Cada sala do insetário deve ser equipada com um termohigrômetro de máxima e mínima;
2. Todos os dias, a temperatura e a umidade relativa (máxima, mínima e do momento) são anotadas e o aparelho é zerado. Anota-se também a data e a hora da anotação e o nome do operador;
3. A temperatura ideal para a sala de larvas é de 25-26°C. Nesta sala, a umidade relativa não é importante (as larvas estão na água);
4. Para a sala dos adultos, a temperatura ideal é de 25-26°C. É importante que não passe de 27°C, pois a longevidade diminui muito. A umidade relativa é ideal entre 70 e 80% e crítica abaixo de 60%.

OBS: aumentar a umidade de todo o insetário, pode gerar desconforto para quem lá trabalha e estimular a proliferação excessiva de fungos, o que acaba prejudicando a colônia. Uma solução seria manter a umidade da sala dos adultos entre 70 e 80% e colocar as gaiolas dos anofelinos sobre bacias com águas e com pano úmido por cima.

OBS: se caso só exista uma sala onde se manipula larvas e adultos a temperatura deve ser intermediária de 26°C.

7.1.6 Protocolo de infecção experimental de mosquitos anofelinos - DMFA

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP	POP_IPCCB_LAB_006_v01_PT		
Título	PROCEDIMENTO PARA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MOSQUITOS ANOFELINOS - DMFA		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Anne Almeida Keillen Campos Rosa Santana	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 15/04/2016

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de infecção experimental de mosquitos anofelinos, conduzido no insetário Dr. Augustinho Cruz Marques, na Gerência de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostras biológicas.

3. DEFINIÇÕES

INFECÇÃO EXPERIMENTAL: É uma técnica que permite alimentar os insetos (mosquitos) com diferentes fontes tais como: sangue (contendo ou não os parasitos), salina, látex e anticorpos. Essa técnica permite adicionar ao sangue os parasitos e favorecer um repasto infectante. Simula o repasto ou alimentação sanguínea do vetor no hospedeiro vertebrado em condições naturais.

4. RESPONSABILIDADES

Estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução das técnicas que envolvam o uso dos meios citados.

5. POPs RELACIONADOS

- **POP 005** - Procedimento para Manutenção de Colônias de Anofelinos
- **POP 007** - Dissecção e Detecção Microscópica da Infecção de Anofelinos por *Plasmodium* ssp.

6. MATERIAIS

1. PBS 1X (estéril)
2. Isopor
3. Gelo (campo)
4. Tubo para micro-centrifuga (tipo eppendorf)
5. Pipetas Paster (Plástico ou vidro)
6. Micropipetas
7. Alimentadores artificiais
8. Insetos (Anofelinos)
9. Sangue (conteúdo parasitos)
10. Papel toalha
11. Garrote ou mangueira
12. Tubo a vácuo para coleta do sangue
13. Heparina
14. Parafilme ou membrana de pinto
15. Microtubos
16. Seringa do tipo insulina
17. Ligas
18. Banho Maria
19. Microscópio
20. Centrifuga

7. PROCEDIMENTOS

Condições Gerais do Experimento

1. O experimento de infecção experimental deverá ocorrer a 37°C;
2. Pode-se utilizar membrana biológica (Ex.: pele de pintinho) fresca ou congelada, bem como membrana sintética (Ex.: parafilme);
3. O tubo com os parasitos e o sangue deverá permanecer em estufa ou banho-maria a 37°C;

4. Quando a coleta de sangue for realizada em campo, o tubo deverá ser transportado em garrafa térmica com água a temperatura de 37°C.

Preparação dos Insetos

1. Separar (cerca de 100 ou 150 fêmeas) fêmeas de mosquitos com idade de 3 a 5 dias, as quais foram alimentadas previamente somente em solução açucarada (retira-se o açúcar mais ou menos 24 horas antes);
2. Acondicionar as fêmeas em potes ou copos apropriados para a infecção experimental.

Preparação do sangue

1. Conversar com o voluntário;
2. Realizar a entrevista;
3. Pedir para o voluntário assinar os termos
4. Coletar o sangue.
5. Limpar o local (antebraço) com algodão contendo álcool 70% e coletar o sangue utilizando seringa ou tubo de coleta a vácuo;
6. Transportar o sangue para o laboratório (deixando o sangue em temperatura ambiente ou em garrafa térmica a 37°C.
7. Centrifugar o sangue total por 5 minutos a 1500 RPM;
8. Após a centrifugação retirar o plasma sanguíneo;
9. Lavar a papa de hemácias com RPMI incompleto 1X por três vezes, centrifugando a papa entre as lavagens por 5 minutos a 1500 RPM
10. Reconstituir o sangue à 40% de hematócrito em soro humano inativado AB comercial;

OBS: Na ausência de soro humano AB comercial, inativar o plasma do próprio paciente. Para isto, após a centrifugação do sangue total, transferir o plasma para outro tubo e incubar em Banho Maria a 57°C por uma hora.

Preparação das membranas

1. O parafilme pode ser utilizado também como membrana, deverá ser cortado 5cmX5cm do parafilme e esticado de modo que cubra a superfície do alimentador, depois deve-se colocar uma liga para que o parafilme se mantenha fixo no alimentador e assim o mosquito possa realizar o repasto sanguíneo.

Montagem do circuito de alimentação

1. O sistema de infecção experimental consta de um Banho Maria a 37°C e um sistema de circulação de água ligado ao alimentador artificial.
2. O sangue contendo os parasitos é colocado no alimentador artificial previamente montado com a membrana animal e ou parafilme e então colocado sobre o pote que contém os insetos.
3. O tempo mínimo da infecção é de 30 minutos e o máximo de 2 horas.
4. Após a alimentação apenas os insetos alimentados deverão ser transferidos para gaiolas maiores (as mesmas usadas na criação, pois contribui para a diminuição da mortalidade das fêmeas infectadas) onde serão mantidos com solução açucarada a 10% e deverão permanecer na sala dos infectados até o momento da dissecação.

OBS: Este mesmo aparato de infecção experimental poderá ser utilizado com diferentes substâncias, pode-se substituir o sangue por solução de látex ou somente plasma e os parasitos podem ser substituídos por anticorpos e ou outros marcadores biológicos.

7.1.7 Protocolo para dissecação de intestino médio e detecção microscópica da infecção de anofelinos por *Plasmodium* spp.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_007_v01_PT		
Título	PROCEDIMENTO PARA DISSECAÇÃO DE INTESTINO MÉDIO E DETECÇÃO MICROSCÓPICA DA INFECÇÃO DE ANOFELINOS POR <i>Plasmodium</i> spp		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Rosa Almeida Iria Cabral	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Claudia María Ríos Velásquez	Data de aplicação: 15/04/2016

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de dissecação de intestino médio e Detecção Microscópica da Infecção de Anofelinos por *Plasmodium* spp

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostras biológicas.

3. DEFINIÇÕES

DISSECAÇÃO DE INTESTINO MÉDIO: É uma técnica que permite dissecar o intestino médio dos mosquitos para confirmação da infecção pela presença ou não de oocistos e dessa forma estimar a taxa e intensidade da infecção.

4. RESPONSABILIDADES

- Técnicos, alunos de mestrado, alunos de doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução da infecção experimental de anofelinos;
- Equipe do Insetário da Gerência de Entomologia, FMT-HVD.

5. POPs RELACIONADOS

- **POP 005** - Procedimento para Manutenção de Colônias de Anofelinos
- **POP 006** - Procedimento de infecção experimental de mosquitos anofelinos - DMFA

6. MATERIAIS

- Placas de petri
- Gelo
- Lâmina
- Lamínula
- Estilete entomológico
- Mercurocromo 2%
- PBS 1X
- Álcool 70%
- Freezer -20°C
- Lupa Estereoscópica
- Microscópio

7. PROCEDIMENTOS

Dissecção dos anofelinos

1. Os mosquitos infectados devem ser mantidos na sala de infectados com solução açucarada 10%, temperatura entre 25-26°C e 80% de umidade;
2. Após 7 dias de infecção, retirar os mosquitos da sala de infectados, conduzi-los para sala de dissecção, retirá-los das gaiolas utilizando um capturador e adormecê-los no frio em freezer - 20°C;
3. Após adormecidos, faz-se uma lavagem utilizando uma placa de petri contendo álcool 70%, seguido de uma segunda lavagem em PBS 1X, todo o procedimento de dissecção deve ser realizado sobre o gelo (evitando que o mosquito acorde e voe).
4. Dissecar as fêmeas individualmente, da seguinte forma:
 - a. Colocar uma gota de PBS em uma lâmina;
 - b. Transferir um mosquito para a gota de PBS;

- c. Cortar as asas, pernas e cabeça do mosquito;
- d. Com um estilete, segurar o tórax do mosquito, e com outro puxar o último segmento abdominal, de forma lenta e suave para permitir a saída do intestino médio.

Detecção de oocistos de *Plasmodium spp*

1. A partir da dissecação do mosquito, retirar o intestino médio e transferí-lo para uma lâmina;
2. Adicionar uma gota de mercurocromo a 2%;
3. Deixar corar por 10 minutos;
4. Após 10 minutos, transferir o intestino médio para outra lâmina, adicionar uma gota de PBS 1X a lamínula;
5. Observar em microscópio, no aumento de 10X, para visualização dos oocistos de *Plasmodium*.

7.1.8 Protocolo para cultivo de formas assexuadas e testagem de drogas – IC50

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_008_v01_PT		
Título	PROCEDIMENTO PARA CULTIVO DE FORMAS ASSEXUADAS E TESTAGEM DE DROGAS – IC50		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Camila Fabbri Alexandre Trindade	Revisado por: Stefanie Lopes	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 10/02/2018

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento para cultivo de formas assexuadas e testagem de drogas para posterior análise em IC50.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico ou qualquer outro membro da equipe apto para manuseio de amostras biológicas.

3. DEFINIÇÕES

CULTIVO DE FORMAS ASSEXUADAS: É uma técnica que permite o cultivo de trofozoítos jovens (anéis) a maturação de esquizontes por até 48 horas com o objetivo de verificar a atividade antimalária de drogas no bloqueio da maturação.

4. RESPONSABILIDADES

- Técnicos, alunos de mestrado, alunos de doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execução da infecção experimental de anofelinos;
- Equipe do Insetário da Gerência de Entomologia, FMT-HVD.

5. POPs RELACIONADOS

- **POP 001** – coluna de celulose
- **POP 002** - Meios de cultura;

6. MATERIAIS

- RPMI 1X;
- IMDM;
- Soro AB;
- Glicose 10%;
- Pipetas automáticas de 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
- Pipeta automática multicanal de 200 µL;
- Ponteiras de 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Pipetador automático;
- Placa de 92 poços com fundo chato;
- Pipetas pasteur estéreis;

- Tubo Falcon de 50 mL;
- Câmara de hipóxia;
- Estufa a 37°C;
- Centrífuga;
- Câmara de fluxo laminar.

7. PROCEDIMENTO

Preparação do IMDM completo

1. Em um tubo falcon de 50 mL adicionar:
 - a. 1,6 mL de Glicose (7,5%);
 - b. 10 mL de soro (20%);
 - c. Completar até 50 mL com IMDM

Preparação da diluição seriada da droga e adição do sangue parasitado

Após passar a amostra pela coluna de celulose de acordo com o POP 001, prosseguir da seguinte maneira:

1. Ressuspender o papa em meio de cultura IMDM Completo para Hematócrito (Hct) 4%. Para uma placa de 92 poços: 160 µL papa + 3840 µL de meio IMDM Completo;
2. Faça a diluição da droga na maior concentração desejada reserve em um eppendorf de 1 mL;
3. Pipetar 100 µL da droga diluída nos poços: 1A,1B,1C ou 1E, 1F,1G. Ou seja, cada concentração será realizada em triplicata;
4. Pipetar 50 µL de meio IMDM Completo nos poços 2-11;
5. Com a pipeta multicanal, realizar a diluição seriada da seguinte maneira: Retirar 50 µL do primeiro poço e adicionar 50 µL no próximo e assim sucessivamente, até a coluna 10. Nos poços da coluna 10 desprezar ficarão 100 µL, então 50 µL de cada poço deve ser desprezado;
6. Com a diluição finalizada, adicionar 50 µL do Hct a 4% em todos os poços, com cuidado para não contaminar as ponteiras;

7. Fechar a placa e colocá-la na câmara de hipóxia, anotando o dia e horário. Inserir a mistura de gases por 3 minutos e acondicionar a câmara na estufa a 37°C. A placa deve ficar em cultivo por até 48 horas. Lâminas em 24 e 42 horas podem ser realizadas para verificar o estágio de maturação do parasito.


Confecção das gotas espessas

Após o tempo de maturação de até 48 horas, prosseguir da seguinte maneira para a confecção das gotas espessas:

1. Deixar a placa em 45° para a concentração da papa
2. Identificar a lâmina com o nome do composto testado, poço e data;
3. Pipetar 3 uL de cada triplicata na mesma lâmina;
4. Fazer a gota espessa;
5. Esperar secar e prosseguir com a coloração.

Coloração das lâminas e leitura

- Corar a gota com azul de metileno (já vem pronto, pegar no setor de esterilização). Deixar cerca de 10 a 20 segundos. Lavar e esperar secar;
- Corar a lâmina com Giemsa (2 mL de giemsa e completar com até 40 mL com água tamponada). Aguardar entre 5 a 7 minutos;
- Lavar e esperar secar;
- Em seguida realizar a contagem diferenciada das formas de anel e esquizonte de *P. vivax* para um total de 200 formas parasitárias.

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
 TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA**


DOURADO ((FMT-HVD))

Continuação do Projeto 1332/05

HOJY medt:ztm .rt!! M*""Illi't, \,trt !Jx:,er= rriifmerTA!t? para 'III:Ziltfr ezte pr-W ml!t, t 'K:deijJY NJViM
— — "Eli...!! eitn:r'v!!m tr;rameniZ

oa m-e ?"-=tl! r"Cf?f!!! fn LU!rttt :!P!ttnt J 1""1M!fAito We!N/, oer1rttX! I:S:s:, !:+!d:at:tJ <tr:m:zffit!!slc- e
dPtff!U)nilç 00¥1 » C:: sos <!; a-en;a, OHZi!!! '11Jr'1f5,

Hteterm co''110 !l'r'tmlo nva !!IN:iillcwrtra P, t!''v:oc de :orr4)0Zk1!1i IXiKmdo:z W

W61M!t :9Cff, JI¥:10iimd0 e::I

ca,trl! a arr'ZIS: Ht''g:Ulrle,m:S< ;a;\$.Z!f:n! :s do :pam=rflk, !T!lur Iztr:bm a **contra os estíbios**

'Zellu s; ;,aameW-flliz,)eu :!l:l' na

In dt+Ydad:>! dio p;a; r:::lo r;<J, moz,q'.J:l:G tt<tiZIGu-els t- tr:tn<Zffl,fz,1Jh}, O llrat,ar:!'o' erlt! re:az:::ulo n z,
de rJ cl; ,iii d:=tvfT-HVD:Zn>4!t o d !fbez, Cit..re'

X!'t!dH!m a part:Ui:PJl:r .!M J)e::q..t:¥1, tu'k !> 'kt!JI! ,zrlt +flc:Zt Cl:t<Nt:kL o \$M?;I!..e = tk1 JZJ3de:nte n,;

tyHf!''etfJ nla 4kJS r:::c Ht!C!O MJS:M:iaai

ao-r !ZuliZ !:i:ilaoo:z: efl'': a;Milq;:z de ""eoll!>!o ,!m wt'H!m! 'ts?LIIS CWZ rr ±n:os e **3 2WV: 3F**

lrr''' ifwtcbde e- ct rhwX7'd!!: 4:tocl:tkrZ> t.2ki1M1

p:::rmJJJKt..Jiivr,a  ctu nk ctH **3 1 S<kRtf!l!fm, OJ..lit.r.i!O.:z; ueeri JeSi**

!!Jift:ll;;!o — pm•ttm'!f" ""

Serão utilizados para a avaliação dos efeitos dos compostos a serem testados na congelação dos
Q:t:me-t<d?>\$,¥:tb:UtUO;eJ e ,:b'em J."JVD a

I>fWU :b de CPZ Ctk :tn 1!lrcr), E 3!;7!al, Lurra bl!rcetrll! ff"t:if tXt tM; iJJe t:o!ftad:r, z,ter"tiill:mda ;"f!:
<loile"nl'n•>kl do ot•loo<!• ont""":llri<o ;IC6)

destes compostos na maturação ex vivo dos isolados de P. vivax. Com tudo isso, este projeto visa identificar
etz, C:mf!OO: M do MIII MB BH"

;aq..e>=te1 Mm d¥YdJK!e o: s {teP ttvW & fi.r!Htr!¥! : M &en e: Ilr:tf !l Mf4<!!!!@

-15 

transmissão da infecção. Atualmente, estamos na era da "amedicação" da malária, em face de números de
o:JHOs, eMf! '<12 ml!!!! **I-I1,** tnz:fAS!''t! em

T:at!100 JZi!t", Neste errido, a bi.t:Eill per i!"IJ""eo:;&" Qi:rf biD: ueJem a miS>;z!o lla OOenif! Td.:Pn!a

de frente na amedicação da malária, visto

d!r:rozb'3Rllm t e ,f1ttti!O!nle"O<z :ta **!J! Deq; ;a'Qerr.lo c az:z -**

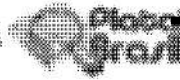
_,f!l!m r > **FI-lm! !ll! t4 : 1**

•lel2!ni<b - - - "i>m"m ..,.,.,.,....._ : m""""k><le **-•lll!_,.9"**,

Seleção de drogas antimaláricas: Serão testados neste projeto compostos do Malária Box, os quais
previamente já foi demonstrada atividade.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 28
 Bairro: Cl. Federal
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (067) 272-0173 Fax: **1** = seg@fmt.org.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO ((FMT-HVD))



Mile-ac!00 ""-m,_,•
IMH! H!> <H! I<XT9<1 de por iH!H!H!H!H!H! A Mg.Jit <H! H<I'PH R!H!> <> om m!!<l R
c1.1!1m!! 1::ZS"C, -em amb!&'lb! ;;.Be!D:ado, H!
m>;I<> ali!! oJXmdf '1 :ten mZ e:riXhl t:tr:Jir,,= de ., ,"" "" (19,XI), ,^ t:::m e::v, e
oodn :=. OOJ:ii:loo :r:!! r!etermfnoo
""""""""tf!]< 14<H!! almMI"*>>Bll:lmlH!M<M""et:tl11Cicle1!! 0!11:O!S:<!!lr&;Jil: H!R JITHI,
C.ca ktgl!!i ,ef:a be:m ltf.}>:Biid&,
e:zta jmdem zllt! .tr oo tem5 !Z 醫!! } o:s ancteinoz_J:u!ttml jje F, ¥1Yi!!CO Lime

— """""""" lrc:clulciOoo a- "" :|||*
p.e;:oor.limc ..rae c;l p n :|||* .£ tw,oot41 at.az;'F z, em
m..t !!\$miJ :Z: !K! em
Mel> M<COJ SA SIJPI! mm ICC << mro N +>,'IS J J I - H!<NIH!I=-' ""I.O.
er' O!i.r'UZiN'W!3
v Jm2t:&n:a de trtc e*' parnz:bzA0 t<a , !!'H!H!&H!<> ,!ki 13m edmentn

— ,_,;t.j<Rt'lf - - .•
lln¥!tZ H <H!H!H!H!H!H! d•> i'!<:OCX!H!fOP ""a!H!E:JMIO !!pile•.IOI>CH! I<! !e !I m!H!t'i:U :!H! H!QU
tmaem!'i t s,
c""""!!IT!>illee tl:re:tdE em meT!t ilt:Cy re ,t\ t: t tmentlm1:>cz,m de tAJm;mn
AB (Gibrol) Serão adicionadas nos
peços de uma placa a solução com a droga na concentração desejada, sendo que cada concentração de
chlhf! 'lm !!:s;-- em t ,;::msmc

■ """""""" mell> lie <!tti!! erio- ,_, - - s.rio Mlc : nmm n•
<||>""c<nn

01!!<4!¥0 dH T'U11111HI
o•ve: %!lite
H!.,..Ail'I'◊ tl<>i! <lo de czmll•hamn!>OF<ll!m ;i;!!H!por <>m!>>!!lc• """""""" !!<; M- !!<>•"
Ot,!!W:!!<O!H!d!!H!H!H!
•S. >cl!>not .z """" ""•!!• !!;o•"" """"""""•<t <llllbiiM!< H! <lr!> 0<11"lh ctlmlieP,
:'ate: ;• iJM 'o _ iCd!
e:tY"11" \fSr cio M1111MIZ! So::eif:cbYilinkvz: tDYiD qH !IJIZI OC!!tnode P, ¥7ra:r ""r!•G <•a;[<:- A"WZ!HZlr a:
<H!n >:!!l: !Xl ril,o, !:e:tnfec:t:?!dauarmt
mosquitos na presença dos compostos do Malaria Box (in vivo); - Padronizar a produção de

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 28 CEP: 45062-000
Rua: D. Pedro: ■ ■ ■
UF: AM
Telefone: ff7121:IM@ fá: lidv:1"" :3!CZ E-mail: zee@fmt.wv.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação da Resenha:

31.1. Concluímos o projeto como:

APROVADO

CEI:
O :m eprnyeza APR0 1.LO e s III !"tZiYIOlls- fie:am fm'cnr:IEO!! "lie 2nla" a te'ICEP m
relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário
Rtrm :PIa R.eUj et P- t'dZ!!•FlnZ eS< cfr:t:CJZ; Unk:1itr!:(M- e Mi...>th:lm'+os-, !?IM !:t l
CONEP em TICISIA fIOJ?,e p;age"

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PS_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P RQUETO_557889.pdf	05/11/2015 23:33:17		Aceito
Outros	QUESTIONARIO.pdf	05/11/2015 23:31:39	Camila Fabroni	Aceito
Outros	anuencia_gerencia_de_malaria.pdf	05/11/2015 23:30:48	Camila Fabroni	Aceito
Outros	anuencia_gerencia_de_entomologia.pdf	05/11/2015 23:29:53	Camila Fabroni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Anuência	TCLE_ILUSTRADO.pdf	05/11/2015 23:28:51	Camila Fabroni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_comite_de_etica.pdf	05/11/2015 23:28:21	Camila Fabroni	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_preenchida.pdf	05/11/2015 23:27:53	Camila Fabroni	Aceito

IR•""tIO <!! " - """"""
!!do

N.,_ _llo <• CONEP:
lllo

Endereço: Av. Heitor Vieira, 25

Bairro: Q. Sudeste I

CEP: 88.040-201

UF: AM @Mwt&...&tY III Lt'!!1

Telefone: www...

ta: i!DE71::T..il-rz

E-mail: cap@fmd.org.br

7.2.2 Termo de compromisso livre e esclarecido (TCLE)

BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS PARA O BLOQUEIO DE TRANSMISSÃO DE *PLASMODIUM VIVAX* TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A **FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)** está fazendo um estudo com o objetivo de estudar novas drogas contra o *Plasmodium vivax*, ou seja, o causador da doença que você tem no momento. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue do paciente para realizar alguns testes com este sangue e a droga, afim de verificar se ela é eficaz ou não. Será testado também se essas drogas conseguem impedir a transmissão para o mosquito, assim o sangue coletado com a adição da droga também será utilizado para alimentar esses mosquitos que são criados em laboratórios para verificar se ele se contaminam com malária ou não.

Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes testes com sangue de 50 pessoas (homem ou mulher, maiores de 18 anos). Por isso pedimos que você participe deste estudo. Abaixo tem o ciclo da malária, pra você entender melhor como ocorre a doença:



CICLO DA MALÁRIA

Este estudo sobre malária será feito com pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Hospital Tropical). Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Como sempre acontece na rotina do hospital, você vai fazer o exame para a malária e se ele for positivo, você irá receber o tratamento gratuito de malária, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde. Se você tiver malária vivax e aceitar participar desse projeto, precisaremos apenas colher uma amostra pequena de 9 mL de sangue da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



COLETA DE SANGUE

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada para isso e com experiência, utilizando material descartável e com total higiene.

Após a coleta de sangue, poderá ocorrer dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente poderá ocorrer desmaio ou infecções no local da punção. Todos os cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Mas, caso você se sinta mal durante a coleta, os pesquisadores responsáveis pelo estudo irão encaminhar você para um médico especializado deste mesmo hospital para lhe examinar e oferecer tratamento, se necessário.

Existe também a possibilidade de perda do sigilo e privacidade do sujeito da pesquisa, mas para evitar essa situação, todas as amostras serão coletas e identificadas com códigos e o nome do paciente nunca será divulgado.

É importante lembrar que a quantidade de sangue a ser coletada é pequena e não representa risco para a saúde. A participação nesse estudo não oferece riscos futuros à sua saúde e você não receberá nenhum dinheiro por participar nele. A qualquer momento você pode desistir de participar, sem qualquer prejuízo para o seu tratamento contra a doença.

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de um estudo testando novas drogas para o tratamento de *Plasmodium vivax* e para impedir a transmissão para o mosquito. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente escolher novas drogas para o tratamento de pacientes com malária vivax.

O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora de maneira correta para não poluir o meio ambiente e nem contaminar as pessoas.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com o Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 9114 7633 (qualquer dia e horário). O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá tirar dúvidas ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro, CEP: 69040-000) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu,, entendi tudo sobre o estudo "BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS PARA O BLOQUEIO DE TRANSMISSÃO DE PLASMODIUM VIVAX"

Data: / /

Endereço:
.....

Telefone: (....)-.....

Polegar direito



Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

Data: / /

7.2.3 Questionário

BUSCA POR NOVOS FÁRMACOS PARA O BLOQUEIO DE TRANSMISSÃO DE *PLASMODIUM VIVAX* QUESTIONÁRIO

DATA DE INCLUSÃO ___/___/___

CÓDIGO NO ESTUDO _____

INFORMAÇÕES DO PACIENTE

1. NOME: _____

2. DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

3. JÁ TEVE MALÁRIA ANTES? () SIM () NÃO

4. SE SIM, QUANTOS EPISÓDIOS? _____

5. QUANDO FOI A ÚLTIMA MALÁRIA? () < 2 MESES () 2 – 6 MESES () 6 MESES – 1 ANO () > 1 ANO ()

6. TEMPO DA DOENÇA ATUAL: _____ DIAS

7. ESTÁ TOMANDO ALGUM MEDICAMENTO? () SIM () NÃO

8. SE SIM, QUAL(IS)? _____

9. JÁ ESTÁ EM USO DE ANTIMALÁRICO? () SIM () NÃO

10. SE SIM, QUAL(IS)? _____

11. É PORTADOR DE DOENÇA CRÔNICA? () DIABETES () HAS () AMBAS () OUTRA () NÃO

ANÁLISE LABORATORIAL

12. GOTA ESPESSA () POSITIVO () NEGATIVO

13. PARASITEMIA _____ p/mm³

14. HEMOGLOBINA _____ g/dL

15. LEUCÓCITOS TOTAIS _____ mm³

16. ERITRÓCITOS _____ milhões/mm³

17. PLAQUETAS _____ uL

...CIA... M...or4...llllfp"

M,JW p.rtl0Jil)5iol<lgy M beell ext:elt\ ivdy 5l-udied. **lb — t**
, sin<tll fi"-t rep<wts by Lvann 121 in 1884 de!llCribing
myocmJWJ old <llfOU)Chmger;in prtie!Ddying **tun Nbri&. kw 5l-**
Wie b...e cardully t"V.du.fold **leudi<N..sud.u syst:e:n** in
Nbri.LTllll!Secliniei oldexperineIU15tdie b...e **S u tll..t**
.wnii!dion h ..cttlIn-
pmedby **!lelqHetmiClll**olldobstructioo inmiuwdCUl.u<tl!"
ofly .md myocmJWJ injuryused by p..dit'e f'dused proteinas
wel I ... **i dlollmM.Ory <yi.Ukine old ollemi • 11 8M<n fl!CCltly,**
&Jcip.mlm **Nb:ril** p.rtiets wrere 00W.1 to JR5ent endotlldw.l

• "v==|| tCllMii T... ..
hot"on>;.Vol.f1S CU.f:ol.-WG— AW8'J).D..O(Q
b:11
It<ll"'.U- _ *.eaFdMft(AC.*" -