



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

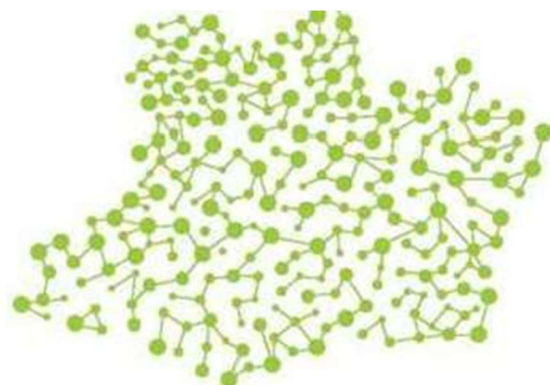


**VIABILIDADE E INFECTIVIDADE DE
GAMETÓCITOS *DE Plasmodium vivax* EM
UM CULTIVO EX VIVO**

GLENDIA QUARESMA RAMOS

MANAUS

2021



Glenda Quaresma Ramos

**VIABILIDADE E INFECTIVIDADE DE GAMETÓCITOS
DE Plasmodium vivax EM UM CULTIVO EX VIVO**

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 Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas.

Orientador (a): **Prof^a** Stefanie Costa Pinto Lopes

Co-orientador (a): **Prof^o**. Wuelton Marcelo Monteiro

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

R175v Ramos, Glenda Quaresma
VIABILIDADE E INFECTIVIDADE DE
GAMETÓCITOS DE *Plasmodium vivax* EM UM
CULTIVO EX VIVO / Glenda Quaresma Ramos.
Manaus : [s.n], 2021.
86 f.: color.; 21 cm.

Tese - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Lopes, Stefanie Costa Pinto

Coorientador: Monteiro, Wuelton Marcelo

1. malária. 2. ensaios de alimentação por membrana.
3. *Plasmodium vivax*. 4. bloqueio de transmissão. 5.
gametócitos. I. Lopes, Stefanie Costa Pinto (Orient.). II.
Monteiro, Wuelton Marcelo (Coorient.). III. Universidade
do Estado do Amazonas. IV. VIABILIDADE E
INFECTIVIDADE DE GAMETÓCITOS DE *Plasmodium*
vivax EM UM CULTIVO EX VIVO

FOLHA DE JULGAMENTO

VIABILIDADE E INFECTIVIDADE DE GAMETÓCITOS DE
PLASMODIUM VIVAX EM UM CULTIVO EX VIVO

GLENDA QUARESMA RAMOS

"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:



Prof. Stefanie Costa Pinto Lopes, Dra.

Prof. Claudia Maria Rios Velásquez, Dra.

Prof. Daniel Youssef Bargieri, Dr.

Prof. Leonardo José de Moura Carvalho, Dr.

Prof. Maisa da Silva Araújo, Dra.

Dedico à minha família.
Em especial às minhas avós (*in memoriam*), Maria de Belém e Dorotéia.

AGRADECIMENTOS

À minha família que é minha base e o meu maior motivo para crescer.

À minha mãe, obrigada por todo apoio e compreensão.

À minha prima Maria Alice e ao meu irmão Lucas, que são o motivo que me fazem dedicar aos estudos e sempre buscar o melhor.

Ao meu marido Henrique, que pacientemente me apoiou e me acalmou em vários momentos. Obrigado por toda a companhia, momentos alegres e por me ajudar a enfrentar aqueles dias em que tudo parecia desesperador.

Aos meus sogros, Sr. Henrique e Sra. Ana, obrigada pelo acolhimento e incentivo.

À todos os meus amados bichos que acolhi, em especial Chuvisco, que durante esses anos me recebeu em cada chegada tarde dos experimentos e me arrancou boas gargalhadas por suas travessuras.

Aos amigos de Macapá, que sempre me acompanharam, mesmo à distância. Gostaria de expressar minha imensa gratidão aqueles que me ajudaram quando mais precisei, em especial aos meus eternos vizinhos Bia e Graça (e família) e as amigas de sempre: Taiuana, Tainara, Débora e Aline! Muito obrigada, pela amizade e ajuda!

À Dra. Stefanie Lopes, por sua orientação neste trabalho. Seu conhecimento e como os expressa é fonte de inspiração para muitos ao seu redor. Obrigada pela paciência, oportunidades e por ser muitas vezes, inspiração profissional.

Ao Dr. Wuelton e ao Dr Marcus, pela oportunidade, contribuições e ensinamentos.

Aos colegas do IPCCB e PPGMT, obrigada por dividir conversas e conhecimento.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo, suas doações de amostras foram essenciais para o desenvolvimento e avanço na pesquisa.

Ao grupo “Crias da Stef” pela ajuda, conversas e discussões científicas.

À Camila Fabbri e Rosa Santana pelo auxílio nos experimentos e em diversos outros momentos.

Aos alunos de Iniciação Científica, Francys e Alexandre, obrigada pela colaboração e por me aceitarem a fazer parte da vida acadêmica de vocês.

Ao XXIII Seminário Laveran & Deane, pela oportunidade de apresentar e discutir o projeto de pesquisa.

Aos funcionários da Gerência de Malária, Dra Mônica, Flavia e Dona Marta. Obrigada à equipe da malária que colaboraram para o recrutamento de pacientes e aos colegas que me auxiliaram durante a coleta

À Gerência de entomologia, Sr. Nelson e aos responsáveis pela colônia *An. aquasalis*, pelas instalações e pelo fornecimento de mosquitos e ajuda nos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas e à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e aos funcionários pela atenção e por serem sempre prestativas.

À Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade de cursar o doutorado em Doenças Tropicais e Infeciosas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de doutorado durante os quatro anos de desenvolvimento da pesquisa

À todos, que de alguma forma participaram deste caminho e contribuíram para o meu crescimento.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

O projeto foi apoiado financeiramente pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da bolsa de estudo a nível doutorado.

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

RESUMO

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Considerada um grave problema de saúde pública, a malária está presente em diversos países tropicais e subtropicais, colocando em risco mais da metade da população mundial. *Plasmodium vivax* é uma das espécies causadoras da malária ao homem e a que apresenta maior distribuição geográfica no mundo e, devido a seus aspectos biológicos, tem se tornado um grande desafio em meio a um cenário de eliminação. Os gametócitos são as formas responsáveis pela transmissão do *Plasmodium* ao vetor, as fêmeas do mosquito *Anopheles*. Avanços nos estudos da biologia e dinâmica dos gametócitos em *P. falciparum*, se tornaram possíveis após o estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro* e modelos experimentais. No entanto, a ausência dessas metodologias para *P. vivax* tem dificultado o avanço nas pesquisas. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o tempo de viabilidade e infectividade de gametócitos de *P. vivax* cultivados *ex vivo*. Para a realização deste estudo, os ensaios foram realizados com amostras provenientes de pacientes com diagnóstico positivo para malária vivax e analisados o tempo de viabilidade em cultivo *ex vivo* de até 48h sob três métodos: amostras enriquecidas por i. Percoll 70% ou ii. MACS e iii. amostras sem enriquecimento. A viabilidade foi analisada em até 48h por microscopia optica, ensaios de alimentação por membrana em mosquito *Anopheles* e ensaios de exflagelação. Os resultados mostraram que os gametócitos apresentaram viabilidade em até 48h de cultivo, no entanto, a partir de 12h a infecção foi afetada significativamente. Dentre os métodos analisados, Percoll e amostras não enriquecidas apresentaram similaridades na infecção, com diminuição significativa após 12h de cultivo. Em contrapartida, MACS apresentou gametócitos morfolologicamente viáveis em até 24h, mas a infecção foi observada somente em até 12h com diminuição significativa a partir de 6h. Em um cenário de controle e eliminação da malária, o estudo da viabilidade dos gametócitos é necessário para explorar novas estratégias de bloqueio. Desta forma, nossas análises mostram que gametócitos cultivados em 6 horas podem ser usados inicialmente para a triagem de novos agentes com ação gametocitocida e, como tal, permite a validação direta com a infecção em mosquitos. Esses resultados contribuem para fornecer novas perspectivas no desenvolvimento das ferramentas necessárias para a investigação de agentes para bloquear a transmissão.

PalavrasChaves: malária, ensaios de alimentação por membrana, *Plasmodium vivax*, bloqueio de transmissão, gametócitos, cultura.

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*. Considered a serious public health problem, malaria is present in several tropical and subtropical countries, putting more than half of the world's population at risk. *Plasmodium vivax* is one of the species that causes malaria to man and is the one with the greatest geographical distribution in the world and, due to its biological aspects, has become a major challenge in the midst of an elimination scenario. Gametocytes are the forms responsible for transmitting *Plasmodium* to the vector, the females of the *Anopheles* mosquito. Advances in the studies of biology and dynamics of gametocytes in *P. falciparum*, became possible after the establishment of an in vitro culture system and experimental models. However, the absence of these methodologies for *Plasmodium vivax* has hindered the progress in research. In this sense, this study aimed to evaluate the viability and infectivity time of *P. vivax* gametocytes cultured ex vivo. To carry out this study, the tests were performed with samples from patients with a positive diagnosis for vivax malaria and the viability time in ex vivo culture of up to 48 hours was analyzed under three methods, samples enriched by i. Percoll 70% or ii. MACS and iii. samples without enrichment. Viability was analyzed within 48 hours by optical microscopy, MFA assays in *Anopheles* mosquito and exflagellation assays. The results showed that the gametocytes showed viability in up to 48h of culture, however, from 12h onwards the infection was significantly affected. Among the analyzed methods, Percoll and non-enriched samples showed similarities in infection, with a significant decrease after 12 hours of culture. On the other hand, MACS showed morphologically viable gametocytes within 24h, but infection was only observed within 12h with a significant decrease after 6h. In a malaria control and elimination setting, the study of gametocyte viability is necessary to explore new blocking strategies. Thus, our analyzes show that gametocytes cultured in 6 hours can be used initially for screening new agents with gametocytocidal action and, as such, allows direct validation with infection in mosquitoes. These results contribute to provide new perspectives on the development of tools necessary for the investigation of agents to block transmission.

Keywords: malaria, membrane feeding assays, *Plasmodium vivax*, transmission block, gametocytes, culture.

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença que atinge pessoas em todo o mundo e é causada por um parasita conhecido como *Plasmodium* que é passado para o homem durante a picada do mosquito. Muitos estudos vêm sendo feitos nesses parasitos para conhecer as suas características, como eles crescem no homem e nos mosquitos, e também descobrir novos remédios para tratar a doença. O *Plasmodium vivax* é um dos tipos que causam a malária no homem e está bem distribuído em vários locais do mundo. Mesmo com muitos estudos, ainda é difícil entender como eles crescem e causam a doença. Essa dificuldade em conhecer o parasito acontece porque não temos as mesmas ferramentas que os outros tipos de parasito têm. Os parasitos têm muitas formas no sangue quando está no homem, sendo uma delas chamado de gametócitos, que são pegos pelo mosquito durante a picada, fazendo com que o mosquito carregue esse parasito e leve para outras pessoas. Nesse estudo procuramos saber quanto tempo os gametócitos, quando tirados do sangue do homem que está com malária do tipo *vivax*, consegue viver em laboratório e se ele também consegue infectar o mosquito. Com os experimentos, vimos que esses gametócitos podem ficar vivos em laboratório por até dois dias. Mas, os melhores resultados foram vistos em 6h, porque, depois disso, a quantidade de gametócitos vivos diminuiu e não conseguiram infectar os mosquitos muito bem. Esses resultados mostraram que os gametócitos no laboratório tem um tempo de vida curto, mas que se vistos em até 6h podem ser usados para buscar novos remédios que vão matar esse tipo de parasito e não vai passar para o mosquito e nem para outra pessoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Incidência de casos de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> no mundo	2
Figura 2 - Número de casos de malária confirmado por 1000 habitantes na região das américas em 2019	3
Figura 3 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019...	4
Figura 4 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium vivax</i>	5

LISTA DE ABREVIATURAS, LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

<	Menor que
%	Porcentagem
ACT	Terapia combinada com artemisinina (do inglês, <i>artemisinin-based combination therapy</i>)
AP2-G	Regulador transcricional em apicomplexos
DFA	Ensaio de alimentação direto (do inglês <i>Direct Feeding Assay</i>)
DMFA	Ensaio de alimentação direta por membrana (do inglês <i>Direct Membrane Feeding Assay</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G6PD	Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
HTP	<i>High throughput</i>
MFA	Ensaio de alimentação por membrana (do inglês <i>Membrane Feeding Assay</i>)
MTP	<i>medium throughput</i>
PfEMP-1	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
SMFA	Ensaio padrão de alimentação por membrana (do inglês <i>Standard Membrane Feeding Assay</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Malária.....	1
1.2. Ciclo do <i>Plasmodium</i>	4
1.3. Gametócitos.....	7
1.4. <i>Plasmodium vivax</i> : Biologia e desafios	8
1.4.1. Implicações biológicas	8
1.4.2. Tratamento.....	10
1.4.3. Metodologias em <i>P. vivax</i>	12
1.4.4. Métodos para ensaios de bloqueio da transmissão.....	13
1.5. Relevância do estudo	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. PRODUTO DA TESE	19
3.1. Manuscrito 1	20
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	30
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ANEXOS E APÊNDICES	48
7.1. Procedimentos do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	48
7.1.1. Parecer de aprovação do projeto.....	48
7.1.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	52
7.1.3. Questionário.....	54
7.2. Procedimentos operacionais padrões	55
7.2.1. Protocolo de preparação para coluna de celulose - CF 11	55
7.2.2. Protocolo de preparação de meios incompletos: RPMI, MCCOY E IMDM.....	57
7.2.3. Protocolo de preparação de Percoll 70%.....	60
7.2.4. Protocolo de preparação de coluna magnética MACS	62
7.2.5. Protocolo de infecção experimental de mosquitos anofelinos - MFA.....	65
7.2.6. Protocolo para dissecação de intestino médio e detecção microscópica.....	71

1. Introdução

1.1. Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. que são transmitidos através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Reconhecida como um sério problema de saúde pública mundial, a transmissão da malária ocorre em 87 países (1), sendo considerada uma doença de maior impacto na morbidade e mortalidade da população em áreas tropicais e subtropicais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2019, foram confirmados 229 milhões casos de malária e cerca 409 mil mortes em todo o mundo, sendo a Região da África com a maior proporção de casos (94%) e mortes por malária (1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, quatro espécies de *Plasmodium* são reconhecidas como responsáveis pela malária humana, são elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Infecções em humanos por *P. knowlesi*, *P. cynolmogi* e *P. simium* tem sido relatados nos últimos anos (2-5), no entanto nestas infecções ainda não tem evidenciado uma transmissão efetiva, sendo então associadas a fatores ecológicos e individuais (6,7).

Dentre as espécies reconhecidas, *P. falciparum* e *P. vivax* são as principais causadoras da malária humana. *Plasmodium falciparum* é responsável por causar malária grave e de mortes relatadas, principalmente na Região da África, onde é responsável por mais de 99% dos casos (Figura 1a). Fora da África, mais da metade (55%) dos casos registrados de malária é devido a infecções causadas por *P. vivax*. (Figura 1b).

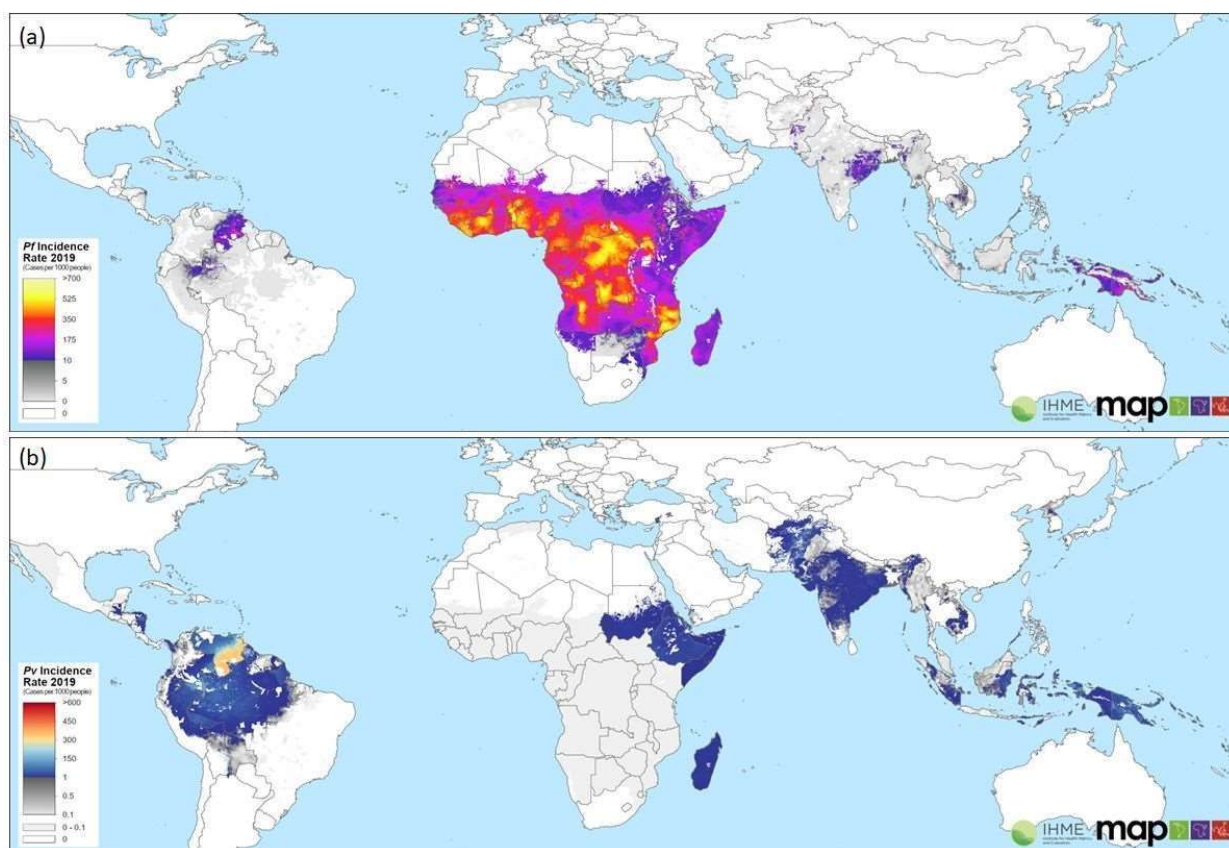


Figura 1 (a). Incidência de casos de *P. falciparum* e (b). Incidência de casos de *P. vivax* no mundo (8).

Nas Américas, nos 18 países endêmicos, aproximadamente 139 milhões de pessoas estão sob o risco da malária. Em 2019, 723 mil casos foram confirmados, na qual 90% concentrados na Venezuela, Colômbia e Brasil (Figura 2) (1).

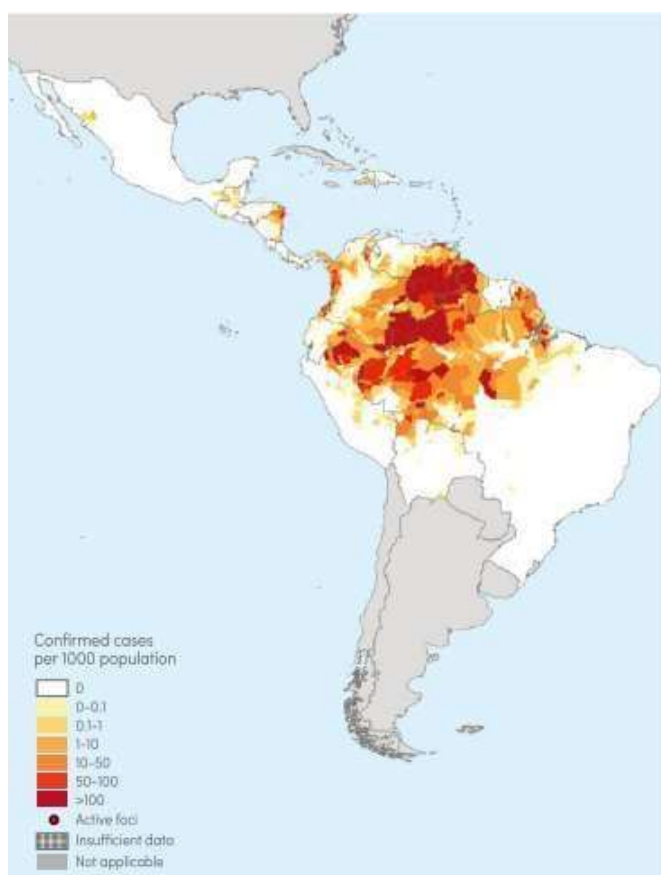


Figura 2. Número de casos de malária confirmado por 1000 habitantes na região das américas em 2019 (1).

No Brasil, a magnitude da malária está relacionada com a alta endemicidade na Região Amazônica. Em todo o território nacional, 157.454 casos foram notificados em 2019 (9), dos quais 99% dos casos foram notificados na Região Amazônica, concentrados, principalmente, em 41 municípios (9), sendo 16 no Estado do Amazonas, que respondem a um total de 43% dos casos de malária na Região (10).

Até a década de 80, a predominância era de casos por *P. falciparum*, porém, devido a esforços desenvolvidos para controlar a malária na época, a partir da década de 90, *P. vivax* passou então a ser a principal espécie causadora de malária e em 2019, cerca de 89% dos casos notificados foram por malária vivax (9) (Figura 3).

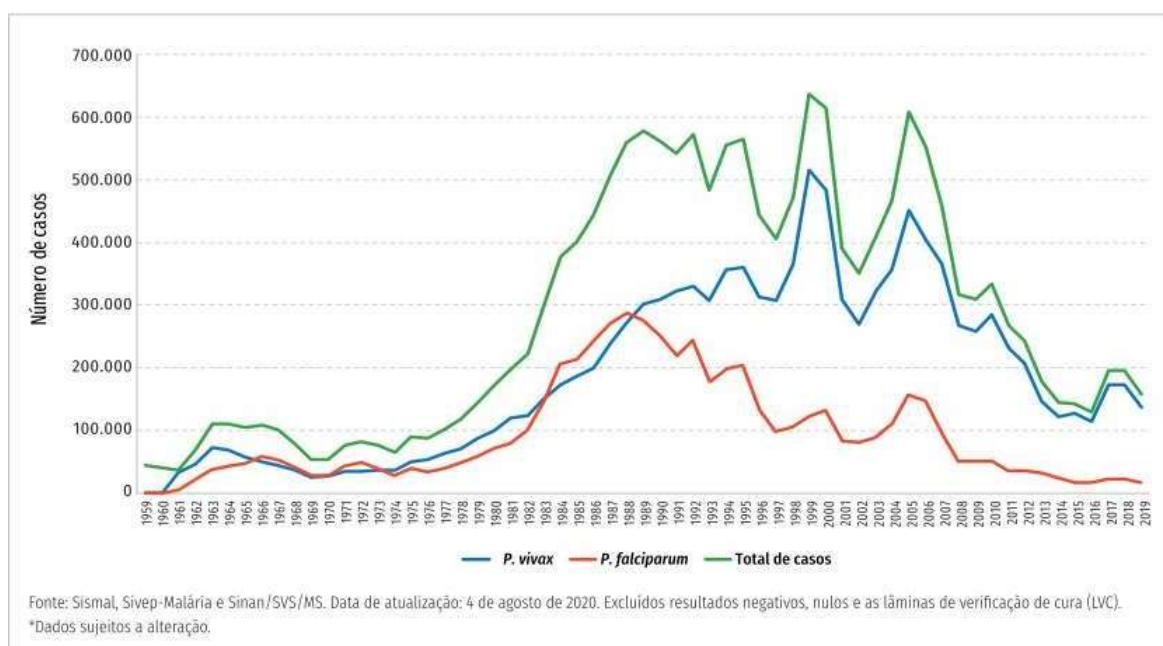


Figura 3. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019 (9).

Os demais casos notificados (1%) corresponde à Região extra-amazônica.. Nesta Região, mais de 80% dos casos são importados de áreas endêmicas ou de outros países. Apesar de um número menor de casos, a Região Extra-Amazônica apresenta maior letalidade em função da demora de diagnóstico e tratamento (11).

1.2. Ciclo do *Plasmodium*

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 4) é um dos mais complexos e requer especialidades para o desenvolvimento em diferentes hospedeiros (vertebrado e invertebrado) e ambientes (12,13).

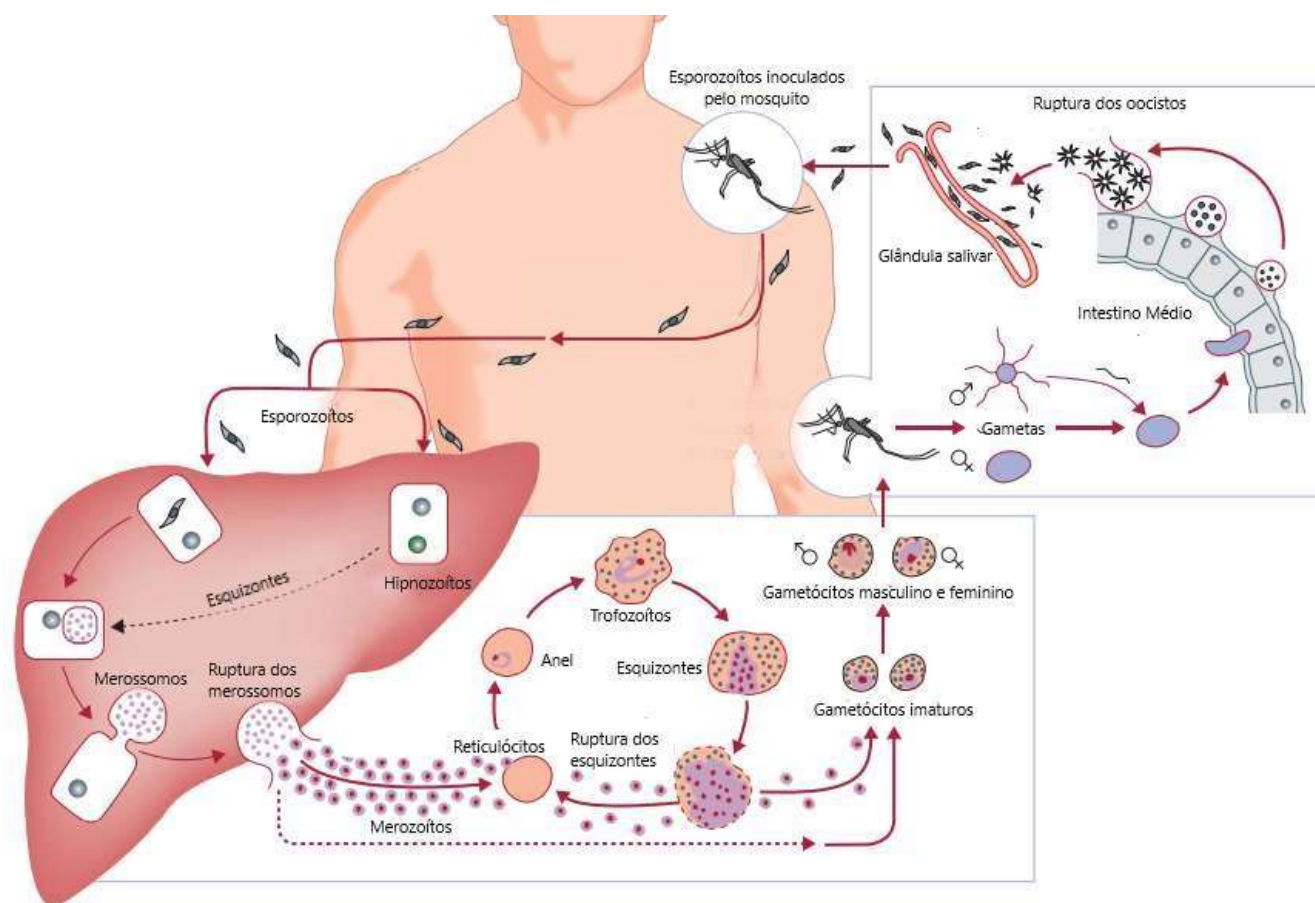


Figura 4. Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*. Adaptado (14)

No hospedeiro vertebrado, o ciclo inicia durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles* que inocula na derme as formas infectantes do parasito presentes na glândula salivar, os esporozoítos. Devido à sua motilidade, os esporozoítos inoculados penetram nos vasos sanguíneos e por meio da circulação, alcançam rapidamente o fígado. Por um processo denominado travessia, os esporozoítos cruzam a barreira sinusoidal e invadem os hepatócitos. Nos hepatócitos, os parasitos se multiplicam e ao longo de 2-10 dias são formados esquizontes exo-eritrocíticos contendo merozoítos que são liberados na corrente sanguínea por meio de vesículas denominadas merossomos (15). Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, após os esporozoítos invadirem os hepatócitos, alguns parasitos podem entrar em estágios latentes não replicáveis denominados hipnozoítos, que podem ficar dormentes por um longo período, culminando em episódios de recaídas (14).

Os recém liberados merozoítos na circulação, se ligam e invadem os eritrócitos por uma série rápida e orquestrada de eventos (16). Uma vez nos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoíto e durante o desenvolvimento intra-eritrocitário diversas mudanças são atribuídas à célula para que seja permitido o transporte de moléculas, citoaderência e digestão do conteúdo citoplasmático. Ao final do desenvolvimento assexuado, um ciclo de 48h, a divisão nuclear é seguida pela formação e liberação de merozoítos que irão invadir novos eritrócitos e dar continuidade ao ciclo. A fase eritrocítica, onde ocorre as repetidas replicações e invasão é responsável pelas manifestações clínicas, caracterizada principalmente pelas síndromes febris e, pela patogenia (13).

Durante o ciclo eritrocítico, uma proporção de parasitos é diferenciada em estágios sexuados dimórficos, chamados de gametócitos. Enquanto os estágios assexuados são responsáveis pela doença clínica, os gametócitos são responsáveis pela transmissão do parasita ao vetor, fêmeas do mosquito *Anopheles*.

No hospedeiro invertebrado, o ciclo inicia com a ingestão de gametócitos maduros durante o repasto sanguíneo. Após a ingestão, no lúmem do intestino, devido a características intrínsecas ao ambiente do hospedeiro invertebrado (temperatura, pH e ácido xanturênico), os gametócitos masculinos e femininos são induzidos a gametogênese. Esse processo inicia com a ativação dos gametócitos que proporciona a saída dos eritrócitos e no fim, a formação dos gametas (17). Cada gametócito masculino sofre um processo denominado de exflagelação, que resulta na formação de oito microgametas móveis, enquanto que os femininos, por um processo mais simples de saída do eritrócito, se diferenciam em macrogametas (18). Após a formação dos gametas, ocorre a fecundação que resulta na formação de um zigoto e, posteriormente, a conversão em um oocineto móvel que atravessa a barreira epitelial do intestino médio. Após a passagem, o oocineto se estabelece e se torna um oocisto séssil, onde ocorrem replicações esporogônicas e a formação dos esporozoítos. Após alcançarem a maturidade, os oocistos rompem-se e os esporozoítos são lançados na hemolinfa e migram até as glândula salivares para alcançar os ductos salivares para serem inoculados em um novo hospedeiro vertebrado (19).

1.3. Gametócitos

Os gametócitos são os estágios formados nas células sanguíneas do hospedeiro vertebrado e são responsáveis pela transmissão do parasito ao vetor. Durante a replicação assexuada uma proporção de parasitos se compromete para a formação de estágios sexuais não replicantes.

Dados relacionados aos gametócitos são registrados há pelo menos um século, no entanto o processo pelo qual são formados, a gametocitogênese, ainda é pouco elucidado. Sabe-se que esse processo varia entre as diferentes espécies e é determinada por fatores moleculares e ambientais.

O fator de transcrição AP2-G, um membro conservado da família apicomplexa AP2 de proteínas de ligação ao DNA que tem diversas atividades reguladoras de transição no parasito (20,21), é um potencial regulador do comprometimento sexual (22,23). Outros fatores que incluem a densidade parasitária, resposta imune do hospedeiro, fatores genéticos ou o tratamento com drogas (22-24), contribuem para a regulação do comprometimento sexual e do metabolismo. Após o comprometimento, a conversão sexual é seguida, primeiramente, pela formação de um estágio anel sexual que segue para o desenvolvimento dos gametócitos (25,26) e, após diferentes estágios, tornam-se maduros e infectivos (27).

Durante a formação sexual, uma série de mudanças morfológicas e moleculares ocorre para que os gametócitos femininos e masculinos tornem-se maduros e infectivos ao vetor. Em *P. falciparum*, o tempo de maturação leva de 7-12 dias e são classificados em cinco distintos estágios morfológicos (I-V) (28), no qual os estágios I-IV, gametócitos imaturos, se desenvolvem na medula óssea e, quando atingem o estágio V, são lançados de volta a circulação sanguínea para serem ingeridos pelo mosquito (29). Uma vez na circulação, os gametócitos maduros de *P. falciparum* podem ser detectados por semanas (30).

Os gametócitos de *P. vivax* apresentam uma série de diferenças biológicas em relação ao *P. falciparum*, que vão desde a morfologia, dinâmica, maturação e longevidade.

Durante todo o seu desenvolvimento, ao longo de 2-3 dias, os gametócitos de *P. vivax* apresentam uma morfologia arredondada que preenche todo o eritrócito (31). Estudos tem mostrado que proteínas APiAP2 de *P. falciparum* tem homólogos sintênicos em *P. vivax* e com expressões semelhantes durante o ciclo eritrocítico (21,32), no entanto a compreensão da biologia dos gametócitos em *P. vivax* ainda é escassa.

Em contraste com *P. falciparum*, gametócitos maduros de *P. vivax* estão presentes na circulação no início da infecção, por vezes, antes dos sintomas serem reconhecidos. Estudos de transcriptomas tem mostrado que o desenvolvimento dos gametócitos de *P. vivax* é mais rápido do que em *P. falciparum*, tornando-se maduros em aproximadamente 48h. além disso, a presença de gametócitos na medula óssea tem sugerido uma fase de maturação nesses nichos, bem como a função de reservatório (33). Após a maturação, em relação a *P. falciparum*, o tempo de vida útil dos gametócitos em *P. vivax* é curta e podem estar presentes na circulação por até 3 dias (31).

1.4. *Plasmodium vivax*: Biologia e Desafios

1.4.1. Implicações Biológicas

Plasmodium vivax é a espécie mais bem distribuída geograficamente em todo o mundo e suas características biológicas, que favorecem a sua persistência, implicam diretamente sua epidemiologia e as estratégias de controle e eliminação (34).

Uma das características dessa espécie é a baixa parasitemia (< 2%) devido, ao menos parcialmente, a sua preferência de invadir reticulócitos. Diferente do *P. falciparum*, que invade eritrócitos de todas as idades e aumenta a rigidez das células para aderir ao endotélio, em *P. vivax*, essa preferência por reticulócitos pode estar relacionada com a capacidade de manter a flexibilidade dos eritrócitos infectados e consequentemente circular pelos capilares e ter maior probabilidade de sobreviver à passagem do baço (35-38).

A citoaderência e o sequestro de eritrócitos infectados em estágios tardios, além de ser um escape que permite a sobrevivência do parasito, está relacionada também com

a gravidade da doença devido à obstrução da microvasculatura e indução da resposta inflamatória local, observadas em *P. falciparum*. O evento de adesão é mediado pela PfEMP-1 (do inglês *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) que é expressa na superfície do eritrócito e mostra afinidade a diversos receptores do hospedeiro (39). A proteína PfEMP-1 está localizada em regiões específicas denominadas *knobs*, que são visualizadas como saliências densas de elétrons e que auxiliam na ancoragem (40).

Embora durante muito tempo, infecções por *P. vivax* tenham sido consideradas benigna com quadros sintomáticos mais brandos, a malária por *P. vivax* tem causado uma significativa morbidade e impacto econômico sobre os países endêmicos. Ao longo dos anos, crescentes estudos têm mostrado complicações graves e fatais (41,42) que antes eram relacionadas apenas com *P. falciparum*. Os crescentes relatos de manifestações graves em *vivax* incluem malária cerebral (43,44), trombocitopenia (45-47) anemia severa (48,49), disfunção hepática (50), renal (51) e pulmonar (48,52-54).

Os frequentes relatos graves em *P. vivax* levaram a uma reavaliação de processos relacionados à patogênese. Devido à falta de proporção de estágios maduros em relação aos estágios em anel, a ideia de que o parasito pudesse se esconder para que ocorresse a maturação foi levantada desde a década de 60 (55). Ao longo dos anos, a falta de homólogos de PfEMP-1, a não visualização de *knobs* na superfície e a presença de todos os estágios na circulação periférica conduziram à conclusão de que essa espécie não apresentava capacidade de adesão e sequestro (56).

No entanto, estudos mostraram que *P. vivax* apresenta a capacidade de adesão (57,58); embora o número de parasitos aderidos em condições estáticas tenham sido 10 vezes menor do que observados em *P. falciparum*, a força de interação, sob estresse, foi similar (57). Além disso, em um estudo *ex vivo*, foi demonstrado que parasitos em estágios tardios (esquizontes) apresentaram maior adesão do que os estágios iniciais, sugerindo que a baixa proporção de parasitos maduros na circulação periférica pode ser consequência do sequestro desses estágios (58). Em função desse sequestro, estudos tem buscado relacionar a biomassa do parasito com a patogênese e gravidade durante as infecções por *vivax* (59-61).

Além das lacunas que permeiam o processo de invasão e a patogênese da malária vivax, fatores biológicos durante o desenvolvimento do parasito são tidos como os principais desafios no controle.

Durante o ciclo pré-eritrocítico de vivax, estágios latentes são formados no fígado. Essas formas, os hipnozoítos, são descritos como formas pequenas que persistem por semana a meses após a infecção inicial, não expressam antígenos e tem potencial para recidiva, conhecida também como recaídas (14,62).

P. vivax apresenta um curto período de incubação, 8-9 dias, mas seu período de latência apresenta uma grande variabilidade, que estão relacionadas ao número de esporozoítos inoculados pelo mosquito, bem como a origem geográfica do parasito (62,63). Os mecanismos envolvidos na formação e ativação dos hipnozoítos ainda são poucos conhecidos, representando o maior gargalo para o efetivo controle da doença, pois, estes estágios maximizam a possibilidade do parasito em alcançar o vetor para a reprodução sexuada, já que o hospedeiro humano será infectante em mais de uma ocasião.

Além da formação de hipnozoítos, outra característica que impacta as ações de controle é a rápida gametocitogênese, processo pelo qual os gametócitos são formados. Os gametócitos do *P. vivax* estão presentes mais cedo na progressão de uma infecção em comparação com *P. falciparum*, de forma que a maioria dos pacientes tem gametocitemia suficiente para permitir a transmissão antes que o diagnóstico ou tratamento possa ocorrer (64). Além disso, os gametócitos são transmitidos de forma mais eficiente, mesmo em densidades parasitárias mais baixa (31) e, no mosquito, apresentam um desenvolvimento para estágios transmissíveis ao humano, os esporozoítos, mais rapidamente do que em *P. falciparum*.

1.4.2. Tratamento

O tratamento da malária tem como objetivo interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas; destruir as formas latentes, que

estão associadas aos episódios de recaídas; e interromper a transmissão, impedindo o desenvolvimento das formas sexuais (11).

No Brasil, com o objetivo de melhorar a adesão ao tratamento de infecções por *P. vivax*, é realizado o esquema terapêutico de 7 dias (esquema curto) que consiste na administração de cloroquina por 3 dias associada à primaquina por 7 dias seguidos. Esse tratamento associado atua de forma sinérgica para o clareamento dos parasitos e diminui as chances de recorrência parasitário seguinte ao tratamento, também chamada de recrudescência (11,65).

A primaquina, uma 8-aminoquinolinas, possui um espectro de atividade de cura radical (*P. vivax* e *P. ovale*) e gametocitocida (*P. falciparum*) (66,67). No tratamento da malária por *P. vivax*, a primaquina é utilizada na cura radical, eliminando parasitos latente na fase hepática da infecção e consequentemente prevenindo as recaídas. Apesar da aprovação da tafenoquina para a cura radical de infecções por *P. vivax* (68), a primaquina ainda é o único medicamento amplamente disponível em várias áreas endêmicas.

Contudo, a eficácia da primaquina ainda é prejudicada em função, principalmente, do uso de doses sub-terapêuticas, do não cumprimento de regimes prescrito e de falhas na ativação metabólica (69-73). Estudos tem mostrado que mesmo com uso da primaquina, as recaídas podem ocorrer em 30% dos casos (65). Além, disso, o uso da primaquina está associada a riscos graves e efeitos colaterais (74), sobretudo em pacientes com deficiência na enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD).

Em relação à cloroquina, o tratamento é realizado com o objetivo de eliminar as formas sanguíneas assexuadas, que são responsáveis pelas manifestações clínicas. Contudo, o uso comum da cloroquina no tratamento de malária levou ao aparecimento de resistência. Para *P. falciparum*, em função da crescente resistência a diversas monoterapias, o tratamento é realizado com uma combinação de derivados de artemisinina (ACT do inglês, *Artemisinin-based Combination Therapy*). Em se tratando de *P. vivax*, o primeiro relato de resistência à cloroquina ocorreu na Papua Nova Guiné, na década de 80 (75). Desde então relatos de resistência tem sido reportado em diversos países (76,77), inclusive no Brasil (78-80).

O tratamento é um dos pontos importantes que refletem no controle e eliminação da malária. A restrição do uso da primaquina (principalmente em pessoas deficientes em G6PD) implica diretamente na transmissão, seja na impossibilidade de usar o único medicamento com atividade antigametocida, como no caso para *P. falciparum*; seja na eliminação das formas hepáticas latentes que previnem a recaída que ocorre em infecções por *P. vivax*, e que impedem o desenvolvimento de uma nova infecção, e consequentemente a formação de estágios sexuais. Aliado a isso, a resistência pode prejudicar ou retardar o clareamento de parasitos, atribuindo a isso maiores chances de formação de estágios comprometidos com a transmissão.

1.4.3. Cultura de *P. vivax*

P. falciparum continua sendo a principal espécie responsável pelo maior número de casos e mortes por malária. Desde a estabilização de um sistema de cultivo (81), diversos avanços na biologia do parasito foram alcançados, com um melhor entendimento da patogênese, na pesquisa de drogas e vacinas, e na dinâmica da infecção (82).

De forma geral, a compreensão da biologia de *P. vivax* ainda é muita escassa, em parte, devido a inabilidade de estabelecer um cultivo in vitro. Desde a primeira tentativa de cultivar *P. vivax*, uma série de estratégias tem sido abordadas na preparação do parasito, no ajuste de meio de cultura e na concentração do soro humano (83-88). E, devido a preferência pelos reticulócitos, considerável atenção tem sido dada aos métodos de obtenção e suplementação dessas células (88-90). Contudo, apesar do progresso, uma carga de desafios ainda é observada no estabelecimento de um sistema de cultivo desse parasito.

Atualmente, o conhecimento em malária vivax está baseado, principalmente, em infecções naturais e experimentais em humanos (31). A pesquisa e o avanço de metodologias têm possibilitado estudos *ex vivo* com amostras de pacientes de área endêmica (frescas ou criopreservadas) ou de infecções em primatas não humanos.

Primatas não humanos adaptados a cepas de *P. vivax*, devido a sua possibilidade de abordar questões específicas da biologia, têm sido instrumentos de pesquisa da malária por décadas, seja para a compreensão básica da biologia do parasito ou investigações pertinentes ao desenvolvimento de novas intervenções (91,92). De forma significativa, esses modelos foram essenciais na descoberta das formas latentes e, atualmente diversos estudos tem sido realizados para investigar hipnozoítos e mecanismos de recaídas (92-94). No entanto, esses modelos apresentam limitações em todo o mundo por questões de custo e ético.

Na ausência de culturas a longo prazo, culturas *ex vivo* a curto prazo para o crescimento de estágios e invasão de merozoítos foram estabelecidas desde 1989 utilizando cepas de *P. vivax* provenientes de macacos neotropical (95). O progresso de otimização das condições de cultura ainda é lento, no entanto, essas culturas e ensaios serviram ao objetivo de obter amostras de parasitos para pesquisas na descoberta de diagnóstico, testes de drogas, desenvolvimento de vacinas e biologia dos parasitos (37,96).

A busca e o estabelecimento de ferramentas são um dos pontos tidos como potencialmente transformadores, principalmente em *P. vivax*. Em se tratando dos estágios sexuais, diversos protocolos têm sido estabelecidos para avaliar gametócitos em culturas *ex vivo* a partir de isolados criopreservados (97,98). No entanto, ainda há a necessidade do desenvolvimento de métodos em cultura *ex vivo* que tenham como alvos os estágios sexuais, que permitam avaliar intervenções com medicamentos, vacinas, agentes biológicos ou químicos destinados a interromper a transmissão.

1.4.4. Métodos para Ensaio de bloqueio de transmissão

A transmissão do *Plasmodium* para o vetor é mediada exclusivamente por gametócitos maduros na circulação periférica do hospedeiro. Os estágios sexuais são reconhecidos como um potencial ponto de intervenção, seja por meio de drogas bloqueadoras ou vacinas.

Como mencionado anteriormente, os gametócitos são o principal alvo para estudos de bloqueio. No início, a morfologia dos gametócitos masculino e feminino era a principal base de avaliação; mais recentemente, o uso de parasitos modificados que expressam marcadores fluorescentes nos diferentes estágios de desenvolvimento dos gametócitos têm sido bem utilizados (99-102), além de possibilitar a realização de ensaios *medium throughput* (MTP) ou *high throughput* (HTP) (103,104). No entanto, apesar de robustos, estes métodos estão restritos a cepas transgênicas e podem não descrever adequadamente o impacto das intervenções durante as infecções.

De forma geral, a densidade de gametócitos não prevê inteiramente a capacidade de infectar os mosquitos. Para validação, é necessário avaliar a infectividade de gametócitos em infecções *in vivo* realizadas em mosquitos fêmeas *Anopheles* sp, considerados ensaios padrão ouro para análises de bloqueio. Esses ensaios avaliam o sucesso da infecção no mosquito através de análises da proporção de mosquitos infectados (ou prevalência de oocistos) e também da intensidade da infecção (número de oocistos).

Os ensaios podem ser realizados de duas formas: i. por alimentação direta (DFA, do inglês *Direct Feeding Assay*) na qual os mosquitos realizam a alimentação direta na pele de um hospedeiro, ou ii. por membrana (MFA, do inglês *Membrane Feeding Assay*), onde o sangue é retirado do hospedeiro e então, oferecido aos mosquitos por meio de um sistema artificial de alimentação por membrana.

Apesar de estar mais relacionado com a real dinâmica da infecção, os ensaios DFA são menos utilizados por razões éticas. A viabilidade da infecção por membrana foi demonstrada pela primeira vez por Yoelii (105) com *P. falciparum* e obteve taxas de infecção comparáveis com ensaios diretos. Desde então, o método de alimentação por membrana tem sido amplamente utilizado em estudos de malária. Os ensaios de membrana apresentam diversas vantagens sob a alimentação direta, como a possibilidade de usar quantitativo de mosquitos maior que possa aumentar a acurácia dos resultados. Ademais, esses ensaios são menos afetados pela inter-variabilidade atrativa do indivíduo. Outra vantagem para uso de MFA, é a possibilidade de ensaios com a

substituição do plasma de forma que seja capaz avaliar fatores relacionados a imunidade e a ação de anticorpos, por exemplo (106).

Os ensaios adaptados com membrana, MFA, são utilizados em dois sistemas: o ensaio direto por membrana (DMFA, do inglês Direct Membrane Feeding Assay) e o ensaio padrão de alimentação por membrana (SMFA, do inglês Standard Membrane Feeding Assay).

O SMFA é um ensaio bem utilizado para *P. falciparum*, onde os gametócitos cultivados *in vitro* são expostos a compostos de interesse (drogas ou anticorpo, por exemplo) e então oferecidos aos mosquitos através de alimentadores artificiais de membrana. Apesar de ser chave para análises de intervenção de bloqueio e serem realizados sob condições controladas, os ensaios não refletem a dinâmica de infecções naturais, além do mais, na sua maioria, o SMFA é realizado com um número limitado de cepas (NF54 ou clones), já que as cepas que podem gerar gametocitemia suficientemente altas em culturas *in vitro* são raras (107).

Nos ensaios DMFA, o experimento é seguido após uma coleta venosa de sangue (31,106) e as análises podem seguir de três formas: i. com amostras de sangue oferecidas após a coleta (Sangue Total) ou, o plasma é separado, e então o as hemácias são ressuspendidas em soro ii. do próprio hospedeiro ou iii. soro controlado e oferecido ao mosquito.

Para *P. vivax*, os estudos sobre gametócitos dependem de primatas não humanos experimentalmente infectados ou humanos e, os ensaios de infectividade podem ser realizados por DFA ou/e DMFA. Por razões explicadas acima, e pela crescente necessidade de compreender a dinâmica de infecção e a busca de novos agentes com ação de bloqueio, os DMFA são bem mais utilizados, principalmente em situações onde o DFA não pode ser realizado. Esses ensaios tem sido bem utilizados para investigar o tempo de viabilidade de gametócitos sob diferentes condições (108,109), para analisar características biológicas e dinâmica (108) e para investigar candidatos para o bloqueio da transmissão (110-113).

Anopheles aquasalis é um importante vetor da malária em áreas Costeiras da América Central e do Sul (114). Esta espécie tem sido criada em condições de laboratório e, devido a sua suscetibilidade a infecções por *P. vivax*, são bem utilizados como modelo para estudos experimentais para avaliar a interação parasito-hospedeiro (114-122) bem como candidatos para bloqueio de transmissão (110,111).

Em se tratando de bloqueio, a análise de potencial gametocitocida de drogas antimaláricas já disponíveis comercialmente foram umas das primeiras abordagens a ser explorada, e teve como objetivo bloquear a transmissão eliminando os gametócitos de forma que torne o hospedeiro, no caso o homem, não infeccioso ao mosquito (123). De forma geral, a capacidade de resposta de drogas é difícil de ser comparada entre as espécies de *Plasmodium*. Para *P. vivax*, não há métodos em cultura que exploram o rastreamento de drogas gametocitocida, limitando então, aos ensaios clínicos (124-129) e aos ensaios *in vivo* em *Anopheles*, que avaliam de uma forma mais ampla a atividade esporontocida (110,111,130).

1.5. Relevância do estudo

Durante muitos anos, as pesquisas e financiamentos em malária foram voltadas para *P. falciparum*, em razão de sua gravidade e mortalidade ocasionadas pela infecção. No entanto, devido à expansão de áreas acometidas por *P. vivax* e por suas características biológicas no ciclo (formação de hipnozoítos e rápida gametocitogênese), estudos em *P. vivax* têm ganhado mais atenção.

Os gametócitos são os estágios envolvidos na transmissão da malária e compreender sua dinâmica e biologia são necessários para a busca de novas estratégias de bloqueio. Os ensaios para gametócitos em *P. vivax* estão restritos principalmente a ensaios *in vivo* em *Anopheles* sp. Durante o DMFA, o composto é imediatamente colocado no sangue e então oferecido ao mosquito, após 7-9 ou 14-16 dias da infecção inicial, os mosquitos são dissecados e o bloqueio da transmissão é determinado pela contagem do

número de oocistos ou esporozoítos, respectivamente. Apesar de serem bem utilizados, os ensaios de membrana com *P. vivax* escapam da capacidade de determinar uma ação gametocitocida em função da ausência de incubação prévia.

P. vivax apresenta uma série de características que dificultam o estabelecimento de um cultivo *in vitro*, sendo este um dos principais problemas enfrentados para avançar o conhecimento desta espécie. Os ensaios *ex vivo* a curto prazo representam uma ferramenta que auxilia na compreensão da biologia e no teste de agentes de interesse. No entanto os estudos que englobam os gametócitos são mais restritos nesses modelos, se fazendo necessário abordar a viabilidade destes gametócitos em cultivo *ex vivo*, que possa proporcionar a avaliação de compostos ou candidatos vacinais no bloqueio de transmissão com o objetivo de melhorar as estratégias de intervenções e um melhor entendimento biológico.

2. Objetivos

2.1. Geral

Analisar a viabilidade de gametócitos de *Plasmodium vivax* cultivados *ex vivo* a curto prazo

2.2. Específicos

- Avaliar a viabilidade de gametócitos em cultivo sob diferentes processamentos (enriquecimento por Percoll 70% ou MACS e amostras não enriquecidas);

- Avaliar o tempo de viabilidade de gametócitos de *P. vivax* em cultivo *ex vivo* a curto prazo;

- Estimar o tempo de infectividade de gametócitos cultivados *ex vivo*.

3. Produto da tese

Os resultados dessa tese são apresentados na forma de artigo científico

Manuscrito 1 - Publicado na revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* sob o título: *Viability and infectivity of Plasmodium vivax gametocytes in short-term culture*



Viability and Infectivity of *Plasmodium vivax* Gametocytes in Short-Term Culture

Glenda Quaresma Ramos^{1,2}, Djane Clarys Baia-da-Silva^{1,2,3},
 Marcus Vinícius Guimarães Lacerda^{1,2,3}, Wuelton Marcelo Monteiro^{1,2} and
 Stefanie Costa Pinto Lopes^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, ² Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Héitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, ³ Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Bruce Malcolm Russell,
 University of Otago, New Zealand

Reviewed by:

Chiara Andolina,
 Radboud University Nijmegen,
 Netherlands
 Rapatthorn Patrapuvich,
 Mahidol University, Thailand

*Correspondence:

Stefanie Costa Pinto Lopes
 stefaniecplopes@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
 Parasite and Host,
 a section of the journal
 Frontiers in Cellular and
 Infection Microbiology

Received: 04 March 2021

Accepted: 10 May 2021

Published: 01 June 2021

Citation:

Ramos GQ, Baia-da-Silva DC,
 Lacerda MVG, Monteiro WM and
 Lopes SCP (2021) Viability and
 Infectivity of *Plasmodium vivax*
 Gametocytes in Short-Term Culture.
 Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:676276.
 doi: 10.3389/fcimb.2021.676276

The control and elimination of malaria caused by *Plasmodium vivax* both represent a great challenge due to the biological aspects of the species. Gametocytes are the forms responsible for the transmission of the parasite to the vector and the search for new strategies for blocking transmission are essential in a scenario of control and elimination. The challenges in this search in regard to *P. vivax* mainly stem from the lack of a long-term culture and the limitation of studies of gametocytes. This study evaluated the viability and infectivity of *P. vivax* gametocytes in short-term culture. The samples enriched in gametocytes using Percoll (i), using magnetic-activated cell sorting (MACS[®]) (ii), and using non-enriched samples (iii) were evaluated. After the procedures, gametocytes were cultured in IMDM medium for up to 48 h. Cultured *P. vivax* gametocytes were viable and infectious for up to 48 h, however differences in viability and infectivity were observed in the samples after 12 h of culture in relation to 0 h. Percoll-enriched samples were shown to be viable in culture for longer intervals than those purified using MACS[®]. Gametocyte viability after enrichment procedures and short-term culture may provide new avenues in the development of methods for evaluating *P. vivax* TB.

Keywords: malaria, membrane-feeding assay, *Plasmodium vivax*, transmission-blocking, gametocytes, culture

INTRODUCTION

Plasmodium vivax is the leading malaria-causing species worldwide (World Health Organization, 2020) and some severe cases and mortality are reported in endemic areas as in tropical and subtropical regions (Alexandre et al., 2010; Howes et al., 2016; Kotepui et al., 2020). *P. vivax* has unique biological characteristics, such as rapid gametocytogenesis that facilitates transmission and the development of latent forms, known as hypnozoites, which are responsible for relapses months after treatment (Bermúdez et al., 2018; Dhiman, 2019). These features present a great challenge in the control and elimination strategies of vivax malaria.

Gametocytes, which are the sexual stage of the parasite in humans and are the responsible for the transmission to the vector, have been the target of studies that could generate insights into the development of new strategies for blocking transmission (Gebru et al., 2017). However, current

knowledge regarding gametocytes is the result of well-established *in vitro* studies of *Plasmodium falciparum* and experiments with *Plasmodium berghei* in rodents (Ngoto et al., 2019). In *P. vivax*, membrane-feeding assays (MFA) have been used to investigate the period of viability of gametocytes under different conditions (Vallejo et al., 2016; Pereira-Silva et al., 2021), the biological characteristics and dynamics (Vallejo et al., 2016) and candidates for transmission blocking (Pinilla et al., 2018; Fabbri et al., 2021).

Since *P. vivax* cannot be cultivated for long periods, *ex vivo* studies have provided several possibilities for analysis, however their focus is mainly on asexual stages, and few results on viability and infectivity are available regarding gametocytes. Thus, this study evaluates the viability and infectivity of gametocytes in a short-term *ex vivo P. vivax* culture.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

RPMI-1604, Human AB Serum, CF11 cellulose, Giemsa, xanthurenic acid and mercurochrome were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Percoll was obtained from GE-Healthcare (USA). Iscove's Modified Dulbecco's Medium was obtained from Gibco (USA). The LS MACS columns and the MACS separator were obtained from Miltenyi Biotec (UK).

Ethics Statement and Sample Collection

This study was approved by the Research Ethics Committee of FMT-HVD (CAAE approval 84151317.4.0000.0005). Adult volunteers (aged >18 years), presenting at *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD) with *P. vivax* malaria infection diagnosed by blood smears equal to or greater than two crosses (501–10,000 parasites/ μ l) (Ministério da Saúde, 2009) were invited to participate in the study. All study participants provided written informed consent. For each patient, approximately 9 ml of blood were collected *via* venipuncture and placed in a sterile heparinized Vacutainer[®] tube.

Blood Sample Processing

After recruitment, the sample was processed immediately. The blood was centrifuged at 400g for 5 min at 37 °C for plasma separation. Then, the pellet was resuspended with RPMI to a final 50% hematocrit and the leukocytes were removed using a cellulose column (Sripawat et al., 2009). During all procedures, we used a hot plate inside the tissue culture hood and preheated solutions at 37 °C to prevent gametocyte exflagellation (Vera et al., 2015). For all analyses, the initial parasitemia and gametocytemia was determined by light microscopy (magnification 1,000 \times) in 50 fields (200 red blood cells per field) in Giemsa-stained thin blood film (Ministério da Saúde, 2009; Sripawat et al., 2009).

Percoll Gradient Purification

Gametocytes were enriched using Percoll 70% gradient according to Russell et al. (2011), with modifications. A 5 ml

pellet was obtained after depletion of leukocytes and was adjusted to 50% hematocrit using RPMI, and 5-ml aliquots were carefully layered on a 5 ml 70% Isotonic Percoll and centrifuged at 1,200g for 15 min at 37°C, low acceleration and no brake. After the concentrated gametocytes formed on the Percoll interface were collected they were washed twice in 2 ml RPMI by centrifugation at 400g/5 min/37 °C. The percentage of parasites (parasites/total erythrocytes \times 100) and gametocytes (gametocytes/parasites \times 100) was determined on a Giemsa-stained thin film. Gametocytes were evaluated during 48 h (at 12, 24 and 48 h intervals) and 12 h (at 3, 6 and 12 h intervals) of cultivation.

Magnetic Column Purification (MACS[®])

Gametocytes were enriched using magnetic cell sorting (MACS) according to the methodology of Reuling et al. (2017), with modifications. After depletion of the leukocytes, 5 ml of blood was adjusted to a 50% hematocrit using RPMI. The MACS[®]-columns LS were coupled to the magnetic board and 3 ml of RPMI was run through the column once and, subsequently the blood sample. After running the sample, the column was washed with 3 ml of RPMI. This procedure was performed twice, until the eluent was free of red blood cells. Then, the column was detached and placed in a 15-ml centrifuge tube and 5 ml de RPMI was added, and the retained material was pressed through the column with the plunger. The sample was centrifuged (400g/5 min/37 °C) and the percentage of parasites (parasites/total erythrocytes \times 100) and gametocytes (gametocytes/parasites \times 100) was determined from the Giemsa-stained thin film. Gametocytes were analyzed for up to 24 h at intervals of 6, 12 and 24 h.

Non-Enriched Samples

After leukocyte depletion, for each time period, 400 μ l of pellet was cultured in 75 cm² flasks and viability was evaluated for up to 48 h at intervals of 6, 12, 24 and 48 h.

Gametocyte Culture

Enriched samples were diluted to a final parasitemia of 5% with non-infected O positive erythrocytes to yield gametocytemia, ranging from 0.1 to 0.5%, and cultured according to Rangel et al. (2018), with modifications. The samples were adjusted to 2% hematocrit using IMDM supplemented with 20% heat-inactivated human AB serum. For each time period, a total sample for MACS (21 μ l \pm 2 μ l SEM) and Percoll (48 h: 38 μ l \pm 3 SEM; 12 h: 44 μ l \pm 5 SEM) were cultured in 5–15 wells (96-well plates–200 μ l/well) under gas conditions of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ and at a temperature of 37 °C.

Gametocyte Viability

Viability Under Microscopy

Giemsa-stained thin films were prepared (2 μ l) and the gametocyte viability was assessed by counting in a total of 50 fields (200 red blood cells per field). Gametocytes were classified as being viable or non-viable according to the morphology presented (Supplementary Material Figure 1). The slide was

considered negative if no viable gametocytes were found in up to 50–100 fields (Gebru et al., 2017).

Viability According to Exflagellation

Exflagellation tests were performed according to the methodology of Delves et al. (2013), with modifications. An aliquot of 400 μ l of gametocyte culture was centrifuged at 400g for 5 min at 37°C. The pellet cells were resuspended in 10 μ l of RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum and 100 μ M of xanthurenic acid. After 10 min of incubation at room temperature (25°C), 10 μ l were placed in a hemocytometer and the exflagellation centers were counted under a 10 \times lens at a reading of 25 fields.

Experimental Infection in *Anopheles aquasalis* Using a Membrane Feeding Assay (MFA)

Cultured gametocytes (4–14 wells for each time period) were centrifuged (400g/5 min/37°C), the medium was removed and the pellet obtained for samples enriched with MACS[®] or Percoll was resuspended in 400 μ l of uninfected fresh O+ blood to a final 40% hematocrit with heat-inactivated human AB serum. For the non-enriched samples, the gametocytes in the culture were centrifuged and the cell pellet was resuspended to a final 40% hematocrit with heat-inactivated human AB serum.

For each period analyzed, about 100 adult *An. aquasalis* females (3–5 years old) from the colony at Gerência de Entomologia/FMT-HVD were used. The *An. aquasalis* females were artificially fed through a glass feeder (diameter of 3 cm and a blood volume capacity of 1 ml) circuit coated with a Parafilm[®] membrane and the blood was maintained at 37°C via a hose system connected to a thermal bath (Rios-Velásquez et al., 2013).

The sample was offered to the mosquitoes for a period of 45–90 min via MFA. Then, the fully engorged females were separated from the unfed females, transferred to rearing containers and maintained in the insectary at 26°C, 70–80% relative humidity and fed daily on a 10% sugar solution (Santana et al., 2019). After 7 days, the mosquitoes were dissected and the midguts were stained with 2% commercial mercurochrome and examined for the presence of oocysts in order to determine the infection rate (percentage of mosquitoes infected) and infection intensity (number of oocysts/mosquito) (Rios-Velásquez et al., 2013).

Statistical Analysis

The statistical analyses were conducted using GraphPad Prism[®] software, version 5.1. The normality of the data was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. Each time interval was compared with the reference value at 0 h. The statistical treatment of the gametocytes data and number of exflagellation centers were analyzed using ANOVA. For the infection rate and infection intensity, comparisons between groups were analyzed using the Mann–Whitney U test and the Kruskal–Wallis test, respectively. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Viability and Infectivity by Percoll

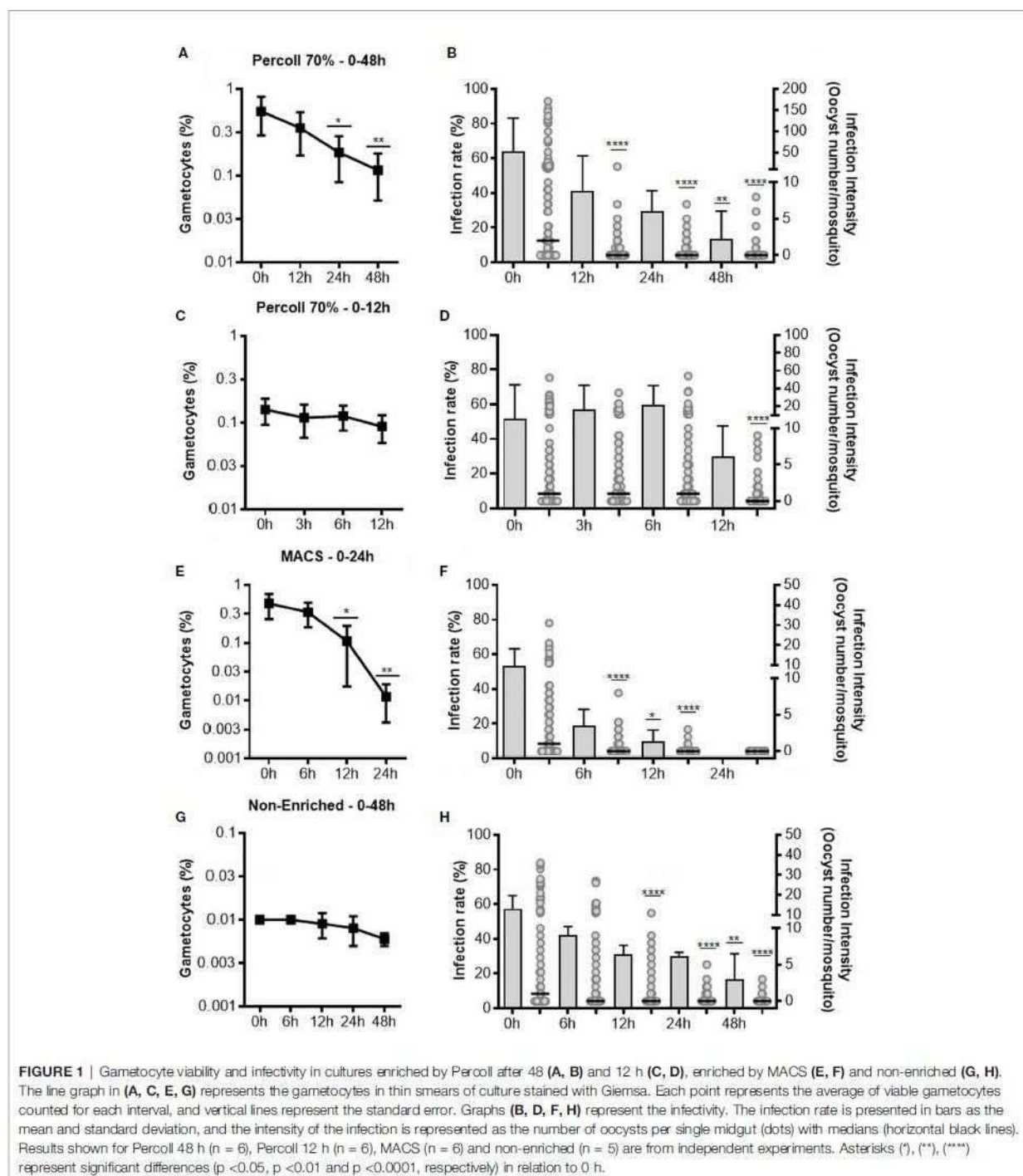
For enrichment using Percoll, we performed two sets of experiments. First, six isolates with initial gametocytemia of 0.09% ($\pm 0.6\%$ SEM) were processed. After Percoll, a mean gametocytemia of 15.25% ($\pm 7\%$ SEM) was obtained. Gametocyte cultures were analyzed for up to 48 h, at 12, 24 and 48 h intervals. The gametocyte counts decreased at the intervals of 24 and 48 h, when compared to 0 h (Figure 1A). Infectious gametocytes were present at all incubation periods. In relation to 0 h, significant decrease was found only at 48 h ($p < 0.0001$) in infection rate and, in the intensity of infection, the number of oocysts decreased at all intervals ($p < 0.0001$) (Figure 1B and Table 1).

In the 48-hour assay, we observed a significant decrease in the infectivity in all incubation periods evaluated. Therefore, we conducted another set of experiments with six isolates (initial gametocytemia of 0.02% $\pm 0.004\%$ SEM), with the objective of evaluating gametocyte viability in periods shorter than 12 h. Thus, 8.2% ($\pm 3.6\%$ SD) of gametocytes were obtained by Percoll 70%. The gametocytes were maintained in culture for up to 12 h, with analysis at intervals of 3, 6 and 12 h. There was no difference in gametocyte counts at all the evaluated intervals in relation to 0 h (Figure 1C). When compared to 0 h, there was no change in the infection rate during 6 h of cultivation, but a decrease was found at 12 h, although it was not significant. For the intensity of infection, a significant decrease was observed only in the 12 h ($p < 0.0001$) of incubation (Figure 1D, Table 1).

Viability and Infectivity by MACS

Although Percoll had a high parasitemia enrichment profile (>40%), a large number of asexual forms were observed in the enriched material (Supplementary Material Figure 2). Thus, to obtain purer gametocyte material, we performed sample enrichment using MACS[®]. For this, six isolates with initial gametocytemia of 0.03% ($\pm 0.01\%$ SEM) were processed and we observed a mean gametocytemia of 59% ($\pm 13.3\%$ SEM) after purification. Considering the intervals analyzed in the Percoll experiments and final yield of the material obtained using MACS[®], the cultures were analyzed for up to 24 h, at the intervals of 6, 12 and 24 h.

A reduction in the gametocyte counts was observed for the intervals of 12 h ($p < 0.05$) and 24 h ($p < 0.01$) when compared to 0 h (Figure 1E). Although morphologically viable gametocytes were observed by microscopy in all intervals, no oocysts were observed in mosquitoes fed with gametocytes cultured for 24 h (Table 1 and Figure 1F). For the infection rates, we observed a reduction at intervals from 12 h ($p < 0.05$) of incubation. Regarding infection intensity, at all analyzed intervals, a reduction in the number of oocysts was observed when compared with the control ($p < 0.0001$), as shown in Figure 1F and Table 1.



Viability and Infectivity in Samples Non-Enriched

To evaluate the viability of gametocytes in the culture without the enrichment procedures, five isolates with gametocytemia of

0.01% ($\pm 0.002\%$ SD) were cultured and analyzed up to 48 h, with analyses conducted at intervals of 6, 12, 24 and 48 h.

Analysis of the culture without any enrichment process indicated low gametocyte counts at all analyzed intervals;

TABLE 1 | Experimental infection in *An. Aquasalis* by membrane feeding assay (MFA).

	Time	Number of mosquitoes examined (Total mosquitoes fed)	Infection Rate % (IQR)	Infection Intensity		
				Mean \pm SEM	Median (Min-Max)	
Percoll 70%	48 h	0 h	126 (241)	64.1 (51.4–87.2)	15.6 \pm 3.2	2 (0–171)
		12 h	161 (249)	41.2 (25.1–57.1)	0.8 \pm 0.1	0 (0–16) ^c
		24 h	111 (199)	29.3 (17.9–39)	0.5 \pm 0.1	0 (0–7) ^c
		48 h	133 (241)	13.7 (0–31.4) ^a	0.3 \pm 0.1	0 (0–8) ^c
	12 h	0 h	163 (272)	51.7 (40–65.2)	4.1 \pm 0.6	1 (0–52)
		3h	125 (227)	57.1 (43.2–72.3)	3.1 \pm 0.5	1 (0–35)
		6 h	185 (317)	60 (49–70)	3.7 \pm 0.5	1 (0–54)
		12 h	149 (260)	30 (18.3–41.6)	0.7 \pm 0.1	0 (0–9) ^c
MACS	24 h	0 h	168 (292)	53.4 (48–61.6)	3.4 \pm 0.4	1 (0–31)
		6 h	135 (154)	18.7 (10.6–28.7)	0.4 \pm 0.1	0 (0–8) ^c
		12 h	140 (239)	9.8 (4–14.5) ^a	0.1 \pm 0.04	0 (0–3) ^c
		24 h	148 (229)	0	0 \pm 0	0 (0–0)
Non-enriched	48 h	0 h	110 (183)	57.4 (51.4–64)	5.4 \pm 0.8	1 (0–36)
		6 h	117 (189)	42.2 (37.2–47)	3.3 \pm 0.5	0 (0–27)
		12 h	100 (175)	31.1 (27.5–35.4)	1.2 \pm 0.2	0 (0–11) ^c
		24 h	118 (178)	29.9 (27.6–31.6)	0.5 \pm 0.08	0 (0–5) ^c
		48 h	90 (161)	16.9 (3.1–31.5) ^b	0.1 \pm 0.05	0 (0–3) ^c

IQR, interquartile range (25th and 75th percentile). ^ap-value \leq 0.05. ^bp-value \leq 0.01. ^cp-value \leq 0.0001.

however, no effect on the gametocyte counts was found in any evaluated interval when compared to 0 h (Figure 1G). The infection rate was reduced when mosquitoes were fed with non-enriched samples cultured up to 48 h ($p < 0.01$), while the intensity of infection was significantly diminished in the intervals of 12 ($p < 0.0001$), 24 ($p < 0.0001$) and 48 h ($p < 0.0001$) when compared to 0 h (Figure 1H and Table 1).

Gametocytes Viability by Exflagellation Assay

For the exflagellation assay, six isolates with initial gametocytemia of 0.03% (\pm 0.01% SEM) were evaluated. After purification using Percoll or MACS, the gametocytemia was enriched and means of 14.83% (\pm 5% SD) and 20% (\pm 3.4% SD), respectively, were obtained under culture conditions, the exflagellation was analyzed for up to 48 h, at 6, 12, 24 and 48 h intervals. As shown in Figure 2, samples purified using the Percoll 70% method showed centers of exflagellation at all the intervals evaluated, with fluctuation of exflagellation centers over time. Statistical differences were found only at 48 h ($p < 0.001$). Exflagellation in the samples processed using MACS[®] and the samples without enrichment showed exflagellation in up to 12 h of cultivation ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 2).

DISCUSSION

The viability of the gametocytes is essential for the success of parasite transmission, and it is also essential when designing transmission blocking studies (Gebru et al., 2017). In this study, via an *ex vivo* culture, we tested the viability period in cultures of

gametocytes using different methods for enrichment of parasites and non-enriched samples.

Enrichment methods have been used previously in order to obtain samples with a high concentration of parasites that allow standardization for experimental analysis (Rangel et al., 2018), since, in addition to heterogeneity, *P. vivax* infections present low parasitemia (Howes et al., 2016). Furthermore, in the majority of infections, gametocytes may be present in low densities (Bousema & Drakeley, 2011). Vera et al. (2015), in an assay using *P. vivax*, showed that Percoll and MACS[®] were suitable for purification of gametocytes, with no significant difference between the two in terms of purification efficacy.

Percoll 70% has been used to obtain ring stages (Russell et al., 2012; Saliba & Jacobs-Lorena, 2012) and early gametocytes in *P. falciparum* (Saliba & Jacobs-Lorena, 2012) and, enrichment using MACS provided material with stages >30 h (Ribaut et al., 2008). In our analysis, we observed that, after purification using Percoll 70% and MACS, the gametocytes were infectious, nevertheless the period of viability in culture showed differences. In samples enriched using Percoll and samples without enrichment, the gametocytes were able to infect mosquitoes for up to 48 h; however the infection rate and intensity decreased significantly after 12 h. In MACS[®] groups, the viability was observed up to 12 h, with significant decreases after 6 h of culture.

In the literature, the life span and infectivity of gametocytes in non-falciparum species can vary from 6 to 12 h after maturation (Hawking et al., 1971; Gautret & Motard, 1999; Armistead et al., 2018). Transcriptome studies in *P. vivax ex vivo* cultures showed that ring conversion to immature gametocytes started after 20 h of culture, with maturation ranging from 17–20 h

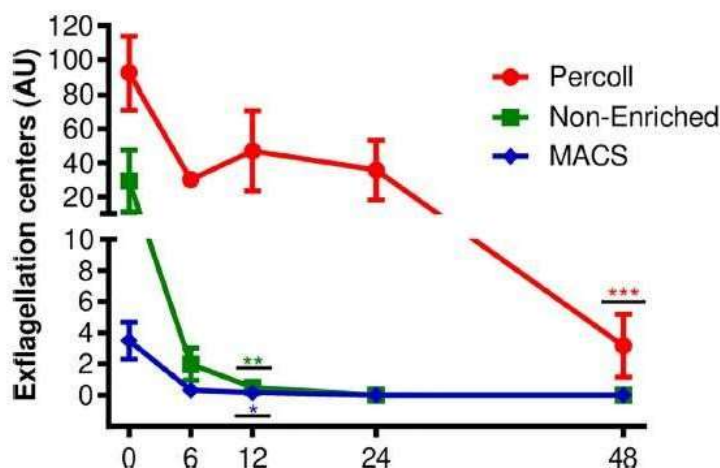


FIGURE 2 | Viability by exflagellation assay. Number of exflagellation centers formed in *P. vivax* culture after Percoll 70% or MACS enriched processes and non-enriched samples. Each point represents the average number of exflagellation centers counted at each time interval, vertical lines represent the standard error. Data are from six independent experiments. Asterisks * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ represent significant differences (using one-way ANOVA) compared to the control (0 h).

(Obaldia et al., 2018). In this study, the differences in the interval of viability between methods may be related to a possible maturation of gametocytes presented in non-enriched and Percoll-enriched samples at intervals after 12 h of cultivation. However, in our study, as well as infectivity, we evaluated the viability of gametocytes using microscopy of blood smears and, unlike *P. falciparum*, the elucidation of gametocytes at different stages of maturation is still not morphologically well known (Baro et al., 2017).

Despite being restricted to the evaluation of male gametocytes, exflagellation assays are extensively used to evaluate the functionality of male gametocytes in cultures (Ruecker et al., 2014; Leba et al., 2015). In our exflagellation assays, Percoll 70% presented the highest number of exflagellation events, which were also observed at all the time intervals.

The non-enriched samples showed exflagellation centers for up to 12 h, despite their infectivity at 48 h. The results maybe a limitation of the assay and are related to the low parasitemia that the non-enriched samples present and, therefore, the absence of exflagellation centers in the evaluated microscopy fields. Unlike the exflagellation assay, the MFA experiments with non-enriched samples showed similarity with the Percoll 70% results in infectivity for up to 48 h. These results maybe provide assays with less complex techniques and processing time, as seen in enrichment methods (Russell et al., 2012).

In our experiments, there were some limitations: i. a low number of mosquitoes analyzed can be observed, and this is mainly due to the percentage of fully engorged (~40%) which can be affected by several factors related to the membrane assay, such as temperature, starvation period, feeding time and mosquito density per cage (Bousema et al., 2012; Vallejo et al., 2016a). However, the mean specimens dissected per assay

(~n = 24) is in consonance with other studies using the same anopheline specimen from the colony and presents means of infectivity (compared to time 0h) similar (Rios-Velázquez et al., 2013; Vera et al., 2015; Baia-Da-Silva et al., 2018; Martins-Campos et al., 2018; Pinilla et al., 2018); ii. due to the logistics, the MFAs were not carried out in paired assays and the exflagellation assay was not compared with infected mosquitoes, which makes it difficult to fully compare the methods.

Overall, our study showed that, in *ex vivo* cultures, gametocytes were viable and infectious for up to 48 h, with significant differences from 12 h. Recently, our group has evaluated methods for testing transmission blocking compound candidates (Fabbri et al., 2021) and, despite being well used, a direct membrane feeding assay (DMFA) can present limitations such as the lack of an exposure time capable of evaluating possible gametocidal activity. In our analysis, we observed that gametocytes cultured within 6 h can be used initially to screen for new agents with anti-gametocyte action and, as such, this allows direct validation of infectious gametocytes. In a malaria control and elimination scenario, the study of gametocyte viability and infectivity are important in order to explore new blocking strategies, and these results contribute by providing new perspectives in the development of the necessary tools for the investigation of agents for blocking transmission.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Research Ethics Committee of Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (CAAE approval 84151317.4.0000.0005). The participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GR performed and acquired all the experimental data, and drafted the manuscript. DB, ML, WM and SL were responsible for reviewing and editing the final manuscript. ML, WM and SL supported funding acquisition. SL supervised the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Alexandre, M. A., Ferreira, C. O., Siqueira, A. M., Magalhães, B. L., Mourão, M. P. G., Lacerda, M. V., et al. (2010). Severe Plasmodium Vivax Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infect. Dis.* 16 (10), 1611–1614. doi: 10.3201/eid1610.100685
- Armistead, J. S., Moraes Barros, R. R., Gibson, T. J., Kite, W. A., Mershon, J. P., Lambert, L. E., et al. (2018). Infection of Mosquitoes From *In Vitro* Cultivated Plasmodium Knowlesi H Strain. *Int. J. Parasitol.* 48 (8), 601–610. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.02.004
- Baia-Da-Silva, D. C., Alvarez, L. C. S., Lizcano, O. V., Costa, F. T. M., Lopes, S. C. P., Orfanó, A. S., et al. (2018). The Role of the Peritrophic Matrix and Red Blood Cell Concentration in Plasmodium Vivax Infection of Anopheles Aquasalis. *Parasites Vectors* 11 (1), 148. doi: 10.1186/s13071-018-2752-5
- Baro, B., Deroost, K., Raiol, T., Brito, M., Almeida, A. C. G., De Menezes-Neto, A., et al. (2017). Plasmodium vivax Gametocytes in the Bone Marrow of an Acute Malaria Patient and Changes in the Erythroid miRNA Profile. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (4), e0005365. doi: 10.1371/journal.pntd.0005365
- Bermúdez, M., Moreno-Pérez, D. A., Arévalo-Pinzón, G., Curtidor, H., and Patarroyo, M. A. (2018). Plasmodium Vivax *In Vitro* Continuous Culture: The Spoke in the Wheel. *In Malaria J.* 17, 301. doi: 10.1186/s12936-018-2456-5
- Bousema, T., Dinglasan, R. R., Morlais, I., Gouagna, L. C., van Warmerdam, T., Awono-Ambene, P. H., et al. (2012). Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected Plasmodium Falciparum Gametocyte Carriers. *PLoS One* 7 (8), e42821. doi: 10.1371/journal.pone.0042821
- Bousema, T., and Drakeley, C. (2011). Epidemiology and Infectivity of Plasmodium Falciparum and Plasmodium Vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 377–410. doi: 10.1128/CMR.00051-10
- Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragan, M. J., et al. (2013). Male and Female Plasmodium Falciparum Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (7), 3268–3274. doi: 10.1128/AAC.00325-13
- Dhiman, S. (2019). "Are Malaria Elimination Efforts on Right Track? An Analysis of Gains Achieved and Challenges Ahead," in *Infectious Diseases of Poverty*. (BioMed Central Ltd), 1–19. doi: 10.1186/s40249-019-0524-x
- Fabbri, C., Trindade, A. O., Andrade, F. S., Souza, M. F., Rios-Velásquez, C. M., Lacerda de, M. V. G., et al. (2021). Transmission-Blocking Compound Candidates Against Plasmodium Vivax Using P. Berghei as an Initial Screening. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 116, e200513. doi: 10.1590/0074-02760200513
- Gautret, P., and Motard, A. (1999). "Periodic Infectivity of Plasmodium Gametocytes to the Vector," in *A Review*. In *Parasite*. (PRINCEPS), 103–111. doi: 10.1051/parasite/1999062103

FUNDING

This study was funded 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 (CAPES; Finance Code 001). WM acknowledges funding support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (PAPAC 005/2019, Universal Amazonas/006/2019, PRÓ-ESTADO and Posgrad calls). ML and WM are CNPq fellows.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.676276/full#supplementary-material>

- Gebru, T., Lalremruata, A., Kremsner, P. G., Mordmüller, B., and Held, J. (2017). Life-Span of *In Vitro* Differentiated Plasmodium Falciparum Gametocytes. *Malaria J.* 16 (1), 330. doi: 10.1186/s12936-017-1986-6
- Hawking, F., Wilson, M. E., and Gammage, K. (1971). Evidence for Cyclic Development and Short-Lived Maturity in the Gametocytes of Plasmodium Falciparum. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene* 65 (5), 549–559. doi: 10.1016/0035-9203(71)90036-8
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., et al. (2016). Global Epidemiology of Plasmodium vivax. *Am. Soc. Trop. Med. Hygiene* 95, 15–34. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141
- Kotepui, M., Kotepui, K. U., Milanez, G. D. J., and Masangkay, F. R. (2020). Prevalence and Risk Factors Related to Poor Outcome of Patients With Severe Plasmodium Vivax Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Analysis of Case Reports. *BMC Infect. Dis.* 20 (1), 363. doi: 10.1186/s12879-020-05046-y
- Leba, L.-J., Musset, L., Pelleau, S., Estevez, Y., Birer, C., Briolant, S., et al. (2015). Use of Plasmodium Falciparum Culture-Adapted Field Isolates for *In Vitro* Exflagellation-Blocking Assay. *Malaria J.* 14 (1), 234. doi: 10.1186/s12936-015-0752-x
- Martins-Campos, K. M., Kuehn, A., Almeida, A., Duarte, A. P. M., Sampaio, V. S., Rodriguez, I. C., et al. (2018). Infection of Anopheles Aquasalis From Symptomatic and Asymptomatic Plasmodium Vivax Infections in Manaus, Western Brazilian Amazon. *Parasites Vectors* 11 (1), 288. doi: 10.1186/s13071-018-2749-0
- Ministério da Saúde. (2009). *Manual De Diagnóstico Laboratorial Da Malária Manual De Diagnóstico*. Available at: http://bvsm.sau.gov.br/bvsm/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf.
- Ngotho, P., Soares, A. B., Hentzschel, F., Achcar, F., Bertuccini, L., and Marti, M. (2019). "Revisiting Gametocyte Biology in Malaria Parasites," in *Fems Microbiology Reviews*. (Oxford University Press), 401–414. doi: 10.1093/femsre/fuz010
- Obaldia, N., Meibalan, E., Sa, J. M., Ma, S., Clark, M. A., Mejia, P., et al. (2018). Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in Plasmodium Vivax Infection. *MBio* 9 (3), e00625-18. doi: 10.1128/mBio.00625-18
- Pereira-Silva, J. W., Martins-Campos, K. M., Sabrina dos Reis Martins, E., de Souza Menezes, A., Guimarães Lacerda, M. V., Costa Pessoa, F. A., et al. (2021). Long-Lasting Infectivity of Plasmodium Vivax Present in Malarial Patient Blood to Anopheles Aquasalis. *Exp. Parasitol.* 222, 108064. doi: 10.1016/j.exppara.2021.108064
- Pinilla, Y. T., Lopes, C. P., Sampaio, S., Andrade, F. S., Melo, G. C., Orfanó, A. S., et al. (2018). Promising Approach to Reducing Malaria Transmission by Ivermectin: Sporontocidal Effect Against Plasmodium Vivax in the South American Vectors Anopheles Aquasalis and Anopheles Darlingi. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12 (2), e0006221. doi: 10.1371/journal.pntd.0006221

- Rangel, G. W., Clark, M. A., Kanjee, U., Lim, C., Shaw-Saliba, K., Menezes, M. J., et al. (2018). Enhanced Ex Vivo Plasmodium Vivax Intraerythrocytic Enrichment and Maturation for Rapid and Sensitive Parasite Growth Assays. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (4), e02519–17. doi: 10.1128/AAC.02519-17
- Reuling, I. J., Stone, W. J. R., Van De Vegte-Bolmer, M., Van Gemert, G. J., Siebelink-Stoter, R., Graumans, W., et al. (2017). Concentration of Plasmodium Falciparum Gametocytes in Whole Blood Samples by Magnetic Cell Sorting Enhances Parasite Infection Rates in Mosquito Feeding Assays. *Malaria J.* 16 (1), 315. doi: 10.1186/s12936-017-1959-9
- Ribaut, C., Berry, A., Chevalley, S., Reybier, K., Morlais, I., Parzy, D., et al. (2008). Concentration and Purification by Magnetic Separation of the Erythrocytic Stages of All Human Plasmodium Species. *Malaria J.* 7, 45. doi: 10.1186/1475-2875-7-45
- Rios-Velásquez, C. M., Martins-Campos, K. M., Simões, R. C., Izzo, T., Dos Santos, E. V., Pessoa, F. A., et al. (2013). Experimental Plasmodium Vivax Infection of Key Anopheles Species From the Brazilian Amazon. *Malaria J.* 12 (1), 460. doi: 10.1186/1475-2875-12-460
- Ruecker, A., Mathias, D. K., Straschil, U., Churcher, T. S., Dinglasan, R. R., Leroy, D., et al. (2014). A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay to Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (12), 7292–7304. doi: 10.1128/AAC.03666-14
- Russell, B., Suwanarusk, R., Line Borlon, C., Costa, F. T. M., Chu, C. S., Rijken, M. J., et al. (2011). A Reliable Ex Vivo Invasion Assay of Human Reticulocytes by Plasmodium vivax. *Blood* (2011) 118 (13), e74–e81. doi: 10.1182/blood-2011-04-348748
- Russell, B., Suwanarusk, R., Malleret, B., Costa, F. T. M., Snounou, G., Kevin Baird, J., et al. (2012). Human Ex Vivo Studies on Asexual Plasmodium Vivax: The Best Way Forward. *Int. J. Parasitol.* 42 (12), 1063–1070. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.08.010
- Saliba, K. S., and Jacobs-Lorena, M. (2012). Production of Plasmodium Falciparum Gametocytes In Vitro. *Methods Mol. Biol. (Clifton N.J.)* 923, 17–25. doi: 10.1007/978-1-62703-026-7_2
- Santana, R. A. G., Oliveira, M. C., Cabral, I., Junior, R. C. A. S., De Sousa, D. R. T., Ferreira, L., et al. (2019). Anopheles Aquasalis Transcriptome Reveals Autophagic Responses to Plasmodium Vivax Midgut Invasion. *Parasites Vectors* 12 (1), 261. doi: 10.1186/s13071-019-3506-8
- Sripawat, K., Kaewpongsri, S., Suwanarusk, R., Leimanis, M. L., Lek-Uthai, U., Phyto, A. P., et al. (2009). Effective and Cheap Removal of Leukocytes and Platelets From Plasmodium Vivax Infected Blood. *Malaria J.* 8 (1), 115. doi: 10.1186/1475-2875-8-115
- Vallejo, A. F., Rubiano, K., Amado, A., Krystosik, A. R., Herrera, S., and Arévalo-Herrera, M. (2016). Optimization of a Membrane Feeding Assay for Plasmodium Vivax Infection in Anopheles Albimanus. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10 (6), e0004807. doi: 10.1371/journal.pntd.0004807
- Vera, O., De Brito, P. B., Albrecht, L., Martins-Campos, K. M., Pimenta, P. F. P., Monteiro, W. M., et al. (2015). Purification Methodology for Viable and Infective Plasmodium Vivax Gametocytes That is Compatible With Transmission-Blocking Assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (10), 6638–6641. doi: 10.1128/AAC.01136-15
- World Health Organization (2020). “Who World Malaria Report 2020,” in *Malaria Report 2020*.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ramos, Baia-da-Silva, Lacerda, Monteiro and Lopes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

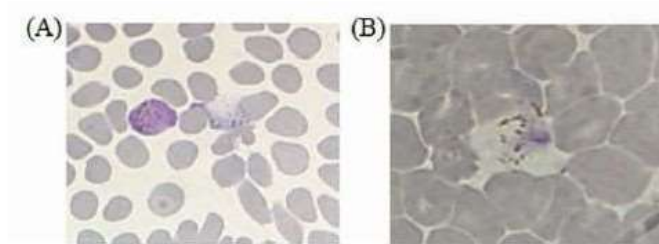
Supplementary Material

Viability and infectivity of *P. vivax* gametocytes in short-term culture

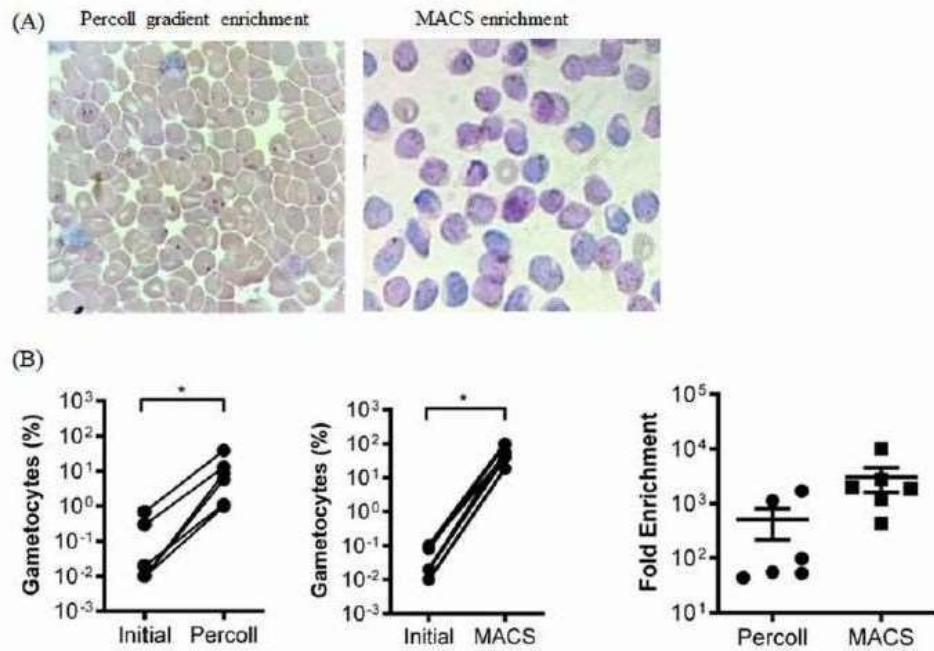
Glenda Quaresma Ramos, Djane Clarys Baia-da-Silva; Marcus Vinicius Guimarães
Lacerda, Wuelton Marcelo Monteiro, Stefanie Costa Pinto Lopes*

* Correspondence: Stefanie Costa Pinto Lopes: stefaniecplopes@gmail.com

Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Viability observed under microscopy. A) Viable gametocyte and
B) Non-viable gametocytes



Supplementary Figure 2. Enrichment methods: (A) Giemsa staining of purified material from Percoll or MACS samples. (B) Initial and enriched gametocytes (Paired Student's t test statistics; * $p < 0.05$) and Fold gametocytes enrichment of isolates using the different methods. Each dot represents the isolates ($n=6$) and bars represents mean (larger) and standard error.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

No que se refere a *P. vivax* diversos fatores da própria infecção acarretam limitações neste estudo. As infecções por *P. vivax* são caracterizadas como baixas e assíncronas, na qual todos os estágios estão presentes na circulação periférica. Os métodos de enriquecimento são bem utilizados para obter amostras com elevadas parasitemia que possibilita a padronização entre os experimentos. Os gametócitos, na maioria das infecções, representam a menor proporção entre os parasitos.

Para avaliar o tempo de viabilidade, amostras sanguíneas foram enriquecidas por MACS e Percoll, ou foram cultivadas sem enriquecimento. Em todas as análises os gametócitos foram infectivos e, entre os métodos, foram observadas diferenças no tempo de infectividade. Enquanto Percoll e sem enriquecimento apresentou um tempo de infecção em até 48h, MACS mostrou infectividade em até 12h de cultivo. Esses resultados podem estar relacionados com a presença de gametócitos imaturos, no Percoll e sem enriquecimento, que durante o tempo de cultivo tornaram-se maduros e infectivos. Em contrapartida, MACS resultou em uma separação de gametócitos maduros e por isso apresentaram menor tempo de infectividade (até 12h). No entanto, em *P. vivax* não há métodos eficazes que resulte em amostras puras de gametócitos, além disso, não há distinção clara entre gametócitos imaturos e maduros. Dados complementares sobre a maturação de gametócitos são necessários para corroborar essa hipótese.

De forma geral, os melhores resultados foram observados em até 6h de cultivo. Desta forma, a perspectiva deste trabalho está em realizar ensaios de drogas com potencial ação de bloqueio (gametocitocida) que permita um tempo de incubação prévia e então possam ser validados em ensaios *in vivo*, infecções experimentais com *Anopheles*.

5. CONCLUSÃO

Do presente trabalho, concluiu-se que:

- Gametócitos são viáveis e infectivos em cultivo *ex vivo* a curto prazo;
- Dentre os métodos de processamento, os gametócitos apresentaram maior tempo de viabilidade em amostras enriquecidas por Percoll e sem enriquecimento;
- Gametócitos cultivados em até 6h podem ser usados como *screening* para drogas com ação de bloqueio que permite a validação direta com gametócitos infectivos (0h).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World malaria report 2019 [Internet]. [cited 2020 Jun 5]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019>
2. Jeyaprakasam NK, Liew JWK, Low VL, Wan-Sulaiman WY, Vythilingam I. Plasmodium knowlesi infecting humans in Southeast Asia: What's next?. Vol. 14, PLoS neglected tropical diseases. NLM (Medline); 2020. p. e0008900.
3. Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU, et al. High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia. Malar J. 2014;13(1):168.
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(5):695-702.
5. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob Heal. 2017;5(10):e1038-46.
6. Health Organization W. A framework for malaria elimination Global Malaria Programme.
7. Amir A, Cheong FW, de Silva JR, Liew JWK, Lau YL. Plasmodium knowlesi malaria: Current research perspectives [Internet]. Vol. 11, Infection and Drug Resistance. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 1145-55.
8. Trends in Global Malaria Burden. Available from: <https://malariaatlas.org/trends/region/MAP/GLOBAL>
9. Epidemiológico B, Especial N. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico. Available from: <http://bvsmms.saude.gov.br>. Acesso em: 20 de abril de 2021
10. Pan American Health Organization, World Health Organization. Epidemiological

Update Malaria in the Americas Situation summary. Washington; 2019 Nov. Available from: www.paho.org. Acesso em: 20 de abril de 2021.

11. Saúde M da. Guia de tratamento da malária no Brasil Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde www.saude.gov.br/bvs. 2019. Available from: www.saude.gov.br/malaria. Acesso em: 20 de abril de 2021.
12. Florens L, Washburn MP, Dale Raine J, Anthony RM, Graingerk M, David Haynes J, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. 2002.
13. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiūnas G, Marti M. *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host [Internet]. Vol. 18, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2020. p. 177-89.
14. 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 [Internet]. Vol. 9, The Lancet Infectious Diseases. 2009. p. 555-66.
15. Eaton P, Zuzarte-Luis V, Mota MM, Santos NC, Prudêncio M. Infection by *Plasmodium* changes shape and stiffness of hepatic cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2012 J;8(1):17-9.
16. Weiss GE, Gilson PR, Taechalertrpaisarn T, Tham WH, de Jong NWM, Harvey KL, et al. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):1004670.
17. Ngwa CJ, Rosa TF de A, Pradel G. The Biology of Malaria Gametocytes. In: *Current Topics in Malaria*. InTech; 2016.
18. Bennink S, Kiesow MJ, Pradel G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. Vol. 18, *Cellular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 905-18.
19. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. Vol. 12, *Current Opinion in Microbiology*. NIH Public Access; 2009. p. 394-400.

20. Painter HJ, Campbell TL, Llinás M. The Apicomplexan AP2 family: Integral factors regulating Plasmodium development. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Mar 1;176(1):1-7.
21. Campbell TL, de Silva EK, Olszewski KL, Elemento O, Llinás M. Identification and Genome-Wide Prediction of DNA Binding Specificities for the ApiAP2 family of regulators from the malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2010;6(10).
22. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*. 2014;507(7491):248-52.
23. Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK, Otto TD, Pfander C, Dickens NJ, et al. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium. *Nature*. 2014;507(7491):253-7.
24. Brancucci NMB, Goldowitz I, Buchholz K, Werling K, Marti M. An assay to probe Plasmodium falciparum growth, transmission stage formation and early gametocyte development. *Nat Protoc*. 2015;10(8):1131-42.
25. Tibúrcio M, Dixon MWA, Looker O, Younis SY, Tilley L, Alano P. Specific expression and export of the Plasmodium falciparum Gametocyte EXported Protein-5 marks the gametocyte ring stage. *Malar J*. 2015;14(1):334.
26. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;172(2):57-65.
27. Josling GA, Williamson KC, Llinás M. Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annu Rev Microbiol*. 2018;72:501-19.
28. Orfano AS, Duarte APM, Molina-Cruz A, Pimenta PF, Barillas-Mury C. Plasmodium yoelii nigeriensis (N67) Is a Robust Animal Model to Study Malaria Transmission by South American Anopheline Mosquitoes. Snounou G, editor. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167178.
29. Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleda C, Joice R, Cisteró P, et al. Molecular evidence for the localization of plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. *Blood*. 2014;123(7):959-66.

30. Eichner M, Diebner HH, Molineaux L, Collins WE, Jeffery GM, Dietz K. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: Parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(5):497-501.
31. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. Vol. 24, *Clinical Microbiology Reviews.* Clin Microbiol Rev; 2011. p. 377-410.
32. Bozdech Z, Mok S, Hu G, Imwong M, Jaidee A, Russell B, et al. The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 O;105(42):16290-5.
33. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, Ma S, Clark MA, Mejia P, et al. Bone marrow is a major parasite reservoir in *plasmodium vivax* infection. *MBio.* 2018;9(3). A
34. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, et al. A research Agenda to underpin Malaria Eradication. *PLoS Med.* 2011;8(1):e1000406.
35. Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, et al. High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *J Infect Dis.* 2009;199(3):445-50.
36. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Who cares?. Vol. 7, *Malaria Journal.* BioMed Central; 2008. p. 1-18.
37. Galinski MR, Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*. Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Academic Press; 2013. p. 1-26.
38. Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, et al. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(5):507-11.
39. Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, Fernandez-Reyes D, Fagan T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology.* 1999. p. 927-37.

40. Ganguly AK, Ranjan P, Kumar A, Bhavesh NS. Dynamic association of PfEMP1 and KAHRP in knobs mediates cytoadherence during Plasmodium invasion. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-9.
41. Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori Persahabatan CR, Persahabatan Raya J. Demographic Risk Factors for Severe and Fatal Vivax and Falciparum Malaria Among Hospital Admissions in Northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):984-91.
42. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda M V., et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1611-4.
43. Beg MA, Khan R, Baig SM, Gulzar Z, Hussain R, Smego RA. Cerebral involvement in benign tertian malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(3):230-2.
44. Mukhtar MM, Eisawi OA, Amanfo SA, Elamin EM, Imam ZS, Osman FM, et al. Plasmodium vivax cerebral malaria in an adult patient in Sudan. *Malar J.* 2019;18(1):1-3.
45. Makkar RPS, Mukhopadhyay S, Monga A, Monga A, Gupta AK. Plasmodium vivax malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis.* 2002;6(5):263-5.
46. Tovar-Acero C, Velasco MC, Avilés-Vergara PA, Ricardo-Caldera DM, Alvis EM, Ramirez - Montoya J, et al. Liver and kidney dysfunction, hypoglycemia, and thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria patients at a Colombian Northwest region. *Parasite Epidemiol Control.* 2021 May 1;13:e00203.
47. Lacerda MVG, Alexandre MAA, Santos PD, Arcanjo ARL, Alecrim WD, Alecrim MGC. Idiopathic thrombocytopenic purpura due to vivax malaria in the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* 2004 Apr 1;90(2):187-90.
48. Medina-Morales DA, Montoya-Franco E, Sanchez-Aristizabal V d. P, Machado-Alba JE, Rodríguez-Morales AJ. Severe and benign Plasmodium vivax malaria in Emberá (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. *J Infect Public Health.* 2016 Mar 1;9(2):172-80.

49. Naing C, Whittaker MA, Nyunt Wai V, Mak JW. Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3071.
50. Nautiyal A, Singh S, Parameswaran G, DiSalle M. Hepatic dysfunction in a patient with *Plasmodium vivax* infection. *MedGenMed Medscape Gen Med*. 2005;7(1):8.
51. Kaur C, Pramanik A, Kumari K, Mandage R, Dinda AK, Sankar J, et al. Renal detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* in malaria associated acute kidney injury: A retrospective case-control study. *BMC Res Notes*. 2020;13(1):1-7.
52. Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 8, *The Lancet Infectious Diseases*. 2008. p. 449-54.
53. Tanios MA, Kogelman L, McGovern B, Hassoun PM. Acute respiratory distress syndrome complicating *Plasmodium vivax* malaria. *Crit Care Med*. 2001;29(3):665-7.
54. Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(7):655-9.
55. Field JW, Shute PG. The Microscopic Diagnosis of Human Malaria. II. A Morphological Study of the Erythrocytic Parasites. *Microsc Diagnosis Hum Malaria II A Morphol Study Erythroeytic Parasites*. 1956;(24).
56. 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. A
57. Carvalho PA, Diez-Silva M, Chen H, Dao M, Suresh S. Cytoadherence of erythrocytes invaded by *Plasmodium falciparum*: Quantitative contact-probing of a human malaria receptor. *Acta Biomater*. 2013 May 1;9(5):6349-59.
58. 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.
59. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. Plasmodium vivax: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis. *Adv Parasitol.* 2012;80:151-201.
60. Barber BE, Russell B, Grigg MJ, Zhang R, William T, Amir A, et al. Reduced red blood cell deformability in Plasmodium knowlesi malaria. *Blood Adv.* 2018 Feb 27;2(4):433-43.
61. Silva-Filho JL, Dos-Santos JC, Judice C, Beraldi D, Lima D, Nakaya H, et al. Total parasite biomass but not peripheral parasitaemia is associated with endothelial and haematological perturbations in Plasmodium vivax patients. *medRxiv.* 2021;2021.03.19.21253933.
62. White NJ. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. *Malar J.* 2011;10(1):297. A
63. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in Plasmodium vivax relapse. *Malar J [Internet].* 2014];13(1):1-16.
64. Douglas NM, Simpson JA, Phyo AP, Siswantoro H, Hasugian AR, Kenangalem E, et al. Gametocyte dynamics and the role of drugs in reducing the transmission potential of plasmodium vivax. *J Infect Dis.* 2013;208(5):801-12.
65. Katsuragawa TH, Gil LHS, Tada MS, Silva ADA, Costa JDAN, Araújo MDS, et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *PLoS One.* 2010;5(2).
66. Treatment Of Uncomplicated Malaria Caused By P. Vivax, P. Ovale, P. Malariae Or P. Knowlesi - Guidelines for the Treatment of Malaria - NCBI Bookshelf. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294428/#ch6.s10>.
67. Graves PM, Gelband H, Garner P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing P. falciparum transmission. Vol. 2014, *Cochrane Database of Systematic*

Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2014.

68. Tan KR, Hwang J. Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of *Plasmodium vivax*. *J Travel Med*. 2018 J;25(1):1-2.
69. Rishikesh K, Saravu K. Primaquine treatment and relapse in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog Glob Health*. 2016;110(1):1-8.
70. Almeida ED, Vieira JLF. Factors associated with non-adherence to the treatment of vivax malaria in a rural community from the Brazilian Amazon Basin. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(2):248-51.
71. Thomas D, Tazerouni H, Sundararaj KGS, Cooper JC. Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of *Plasmodium vivax*. Vol. 160, *Acta Tropica*. Elsevier B.V.; 2016. p. 35-8.
72. Martín Ramírez A, Lombardía González C, Soler Maniega T, Gutiérrez Liarte Á, Domingo García D, Lanza Suárez M, et al. Several *Plasmodium vivax* relapses after correct primaquine treatment in a patient with impaired cytochrome P450 2D6 function. *Malar J*. 2020 J;19(1):259.
73. Bennett JW, Pybus BS, Yadava A, Tosh D, Sousa JC, McCarthy WF, et al. Primaquine Failure and Cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* Malaria . *N Engl J Med [Internet]*. 2013;369(14):1381-2.
74. Taylor WRJ, Thriemer K, von Seidlein L, Yuentrakul P, Assawariyathipat T, Assefa A, et al. Short-course primaquine for the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria: a multicentre, randomised, placebo-controlled non-inferiority trial. *Lancet*. 2019;394(10202):929-38.
75. Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium Vivax* Resistance To Chloroquine? *Lancet*. 1989 Nov 18;334(8673):1183-4.
76. Rijken MJ, Boel ME, Russell B, Imwong M, Leimanis ML, Phyo AP, et al. Chloroquine resistant vivax malaria in a pregnant woman on the western border of Thailand. *Malar J* =. 2011 =;10:113. =
77. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of

chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct 1;14(10):982-91.

78. Alecrim MDGC, Alecrim W, Macedo V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1999;32(1):67-8.
79. Marques MM, Costa MRF, Santana Filho FS, Vieira JLF, Nascimento MTS, Brasil LW, et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):342-7.
80. De Santana Filho FS, Arcanjo ARDL, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon [8] [Internet]. Vol. 13, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2007. p. 1125-6.
81. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* (80-) [Internet]. 1976;193(4254):673-5.
82. McCarthy JS, Griffin PM, Sekuloski S, Bright AT, Rockett R, Looke D, et al. Experimentally Induced Blood-Stage *Plasmodium vivax* Infection in Healthy Volunteers. 2013.
83. Larrouy G, Magnaval J, Moro F. Obtaining intraerythrocytic forms of *Plasmodium vivax* by in vitro culture. *Biol Med*. 1981;
84. Brockelman CR, Tan-Ariya P, Laovanitch R. Observation on Complete Schizogony of *Plasmodium vivax* in Vitro. *J Protozool* [Internet]. 1985;32(1):76-80.
85. Golenda CF, Li J, Rosenberg R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997;94(13):6786-91.
86. Roobsoong W, Tharinjaroen CS, Rachaphaew N, Chobson P, Schofield L, Cui L, et al. Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2015;14(1):297.
87. Udomsangpetch R, Somsri S, Panichakul T, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Yang

- Z, et al. Short-term in vitro culture of field isolates of *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. *Parasitol Int.* 2007 Mar;56(1):65-9.
88. Borlon C, Russell B, Sriprawat K, Suwanarusk R, Erhart A, Renia L, et al. Cryopreserved *Plasmodium vivax* and cord blood reticulocytes can be used for invasion and short term culture. *Int J Parasitol.* 2012;42(2):155-60.
 89. Russell B, Suwanarusk R, Line Borlon C, Costa FTM, Chu CS, Rijken MJ, et al. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. 2011;
 90. Noulin F, Borlon C, Van Den Abbeele J, D'Alessandro U, Erhart A. 1912-2012: A century of research on *Plasmodium vivax* in vitro culture. *Trends Parasitol [Internet].* 2013;29(6):286-94.
 91. Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Marin C, Santos M, Castellanos J, Beier JC, et al. Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. Vol. 106, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz*; 2011. p. 202-11.
 92. Galinski MR, Barnwell JW. Nonhuman Primate Models for Human Malaria Research. In: *Nonhuman Primates in Biomedical Research.* Elsevier Inc.; 2012. p. 299-323.
 93. Zeeman AM, Kocken CHM. Non-human primate models and in vitro liver stage cultures as alternatives in malaria drug development. Vol. 23, *Drug Discovery Today: Disease Models.* Elsevier Ltd; 2017. p. 17-23.
 94. Joyner C, Barnwell JW, Galinski MR. No more monkeying around: Primate malaria model systems are key to understanding *Plasmodium vivax* liver-stage biology, hypnozoites, and relapses. *Front Microbiol.* 2015; 145.
 95. Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med.* 1989;169(5):1795-802.
 96. Russell B, Malleret B, Costa FTM, Suwanarusk R, Malleret B, Snounou G, et al. Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: The best way forward *Cryptosporidium* culture and therapeutic platform development View project

Randomised Trial of 3 Artemisinin Combination Therapy for Malaria in Pregnancy View project Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: The best way forward. *Artic Int J Parasitol*. 2012.

97. Rangel GW, Clark MA, Kanjee U, Goldberg JM, MacInnis B, José Menezes M, et al. *Plasmodium vivax* transcriptional profiling of low input cryopreserved isolates through the intraerythrocytic development cycle. Barry AE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008104.
98. Shaw-Saliba K, Clarke D, Santos JM, Menezes MJ, Lim C, Mascarenhas A, et al. Infection of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. 2016.
99. Dixon MWA, Peatey CL, Gardiner DL, Trenholme KR. A green fluorescent protein-based assay for determining gametocyte production in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Feb 1;163(2):123-6.
100. Schwank S, Sutherland CJ, Drakeley CJ. Promiscuous expression of α -tubulin ii in maturing male and female *plasmodium falciparum* gametocytes. *PLoS One*. 2010;5(12):e14470.
101. Adjalley SH, Johnston GL, Li T, Eastman RT, Eklund EH, Eappen AG, et al. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmissionblocking activity by methylene blue. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2011;108(47):E1214.
102. Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M, et al. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*. 2005 J;121(5):675-87.
103. Peatey CL, Watson JA, Trenholme KR, Brown CL, Nielson L, Guenther M, et al. Enhanced gametocyte formation in erythrocyte progenitor cells: A site-specific adaptation by *plasmodium falciparum*. Vol. 208, *Journal of Infectious Diseases*. *J Infect Dis*; 2013. p. 1170-4.
104. Buchholz K, Burke TA, Williamson KC, Wiegand RC, Wirth DF, Marti M. A High-Throughput Screen Targeting Malaria Transmission Stages Opens New Avenues for

Drug Development. *J Infect Dis.* 2011;203(10):1445. A

105. Yoeli M. Note on the experimental infection of *Anopheles elutus* with *Plasmodium falciparum* by feeding through a prepared animal membrane. *Riv di Malariol.* 1938;17:62-6.
106. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, et al. Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected *Plasmodium falciparum* Gametocyte Carriers. Kumar N, editor. *PLoS One.* 2012;7(8):e42821.
107. 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 D;10(1):12569.
108. Vallejo AF, Rubiano K, Amado A, Krystosik AR, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Optimization of a Membrane Feeding Assay for *Plasmodium vivax* Infection in *Anopheles albimanus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 J;10(6).
109. Pereira-Silva JW, Martins-Campos KM, Sabrina dos Reis Martins E, de Souza Menezes A, Guimarães Lacerda MV, Costa Pessoa FA, et al. Long-lasting infectivity of *Plasmodium vivax* present in malarial patient blood to *Anopheles aquasalis*. *Exp Parasitol.* 2021;108064.
110. 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 Feb 14;12(2).
111. Fabbri C, Trindade AO, Andrade FS, Souza MF de, Ríos-Velásquez CM, Lacerda MVG de, et al. Transmission-blocking compound candidates against *Plasmodium vivax* using *P. berghei* as an initial screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2021;116:e200513.
112. Qiu Y, Zhao Y, Liu F, Ye B, Zhao Z, Thongpoon S, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* HAP2 as a transmission-blocking vaccine candidate. *Vaccine.* 2020 Mar

- 17;38(13):2841-8.
113. Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, et al. Plasmodium vivax gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. *Vaccine*. 2012 Feb 27;30(10):1807-12.
 114. 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(1):1-25.
 115. Martins-Campos KM, Kuehn A, Almeida A, Duarte APM, Sampaio VS, Rodriguez ÍC, et al. Infection of Anopheles aquasalis from symptomatic and asymptomatic Plasmodium vivax infections in Manaus, western Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):288.
 116. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HRC, Guedes BAM, Orfanó AS, et al. The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection. *PLoS Negl Trop Dis* . 2011 Nov [cited 2021 Apr 27];5(11):1317. Available from: /pmc/articles/PMC3206008/
 117. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Pinheiro WD, Tadei WP, Secundino NFC, et al. Anopheles aquasalis infected by Plasmodium vivax displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and plasmodia. *PLoS One*. 2010;5(3):e9795.
 118. Bahia AC, Oliveira JHM, Kubota MS, Araújo HRC, Lima JBP, Ríos-Velásquez CM, et al. The Role of Reactive Oxygen Species in Anopheles aquasalis Response to Plasmodium vivax Infection. *PLoS One*. 2013;8(2):57014.
 119. Da Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Póvoa MM. Susceptibility of Anopheles aquasalis and An. darlingi to Plasmodium vivax VK210 and VK247. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):547-50.
 120. 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):460.

121. Baia-Da-Silva DC, Alvarez LCS, Lizcano OV, Costa FTM, Lopes SCP, Orfanó AS, et al. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):148.
122. Santana RAG, Oliveira MC, Cabral I, Junior RCAS, De Sousa DRT, Ferreira L, et al. *Anopheles aquasalis* transcriptome reveals autophagic responses to *Plasmodium vivax* midgut invasion. *Parasites and Vectors*. 2019;12(1):261.
123. Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantra A, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. Activities of Artesunate and Primaquine against Asexual- and Sexual-Stage Parasites in *Falciparum* Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1329-34.
124. Douglas NM, Simpson JA, Phyo AP, Siswanto H, Hasugian AR, Kenangalem E, et al. Gametocyte dynamics and the role of drugs in reducing the transmission potential of *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis*. 2013;208(5):801-12.
125. Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day N, White NJ. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(3):378-84.
126. Nacher M, Silachamroon U, Singhasivanon P, Wilairatana P, Phumratanapapin W, Fontanet A, et al. Comparison of artesunate and chloroquine activities against *Plasmodium vivax* gametocytes. *Antimicrob Agents Chemother* . 2004 J;48(7):2751-2.
127. Kosasih A, Koepfli C, Dahlan MS, Hawley WA, Baird JK, Mueller I, et al. Gametocyte carriage of *Plasmodium falciparum* (pfs25) and *Plasmodium vivax* (pvs25) during mass screening and treatment in West Timor, Indonesia: a longitudinal prospective study. *Malar J* . 2021;20(1):177.
128. Leba LJ, Musset L, Pelleau S, Estevez Y, Birer C, Briolant S, et al. Use of *Plasmodium falciparum* culture-adapted field isolates for in vitro exflagellation-blocking assay. *Malar J*. 2015;14(1):234.
129. Popovici J, Vantaux A, Primault L, Samreth R, Piv EP, Bin S, et al. Therapeutic and

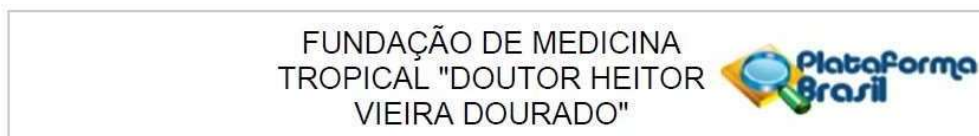
transmission-blocking efficacy of dihydroartemisinin/ piperazine and chloroquine against *Plasmodium vivax* Malaria, Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1516-9.

130. 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.

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1. Procedimentos do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

7.1.1. Parecer de aprovação do projeto



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implementação de uma Plataforma para busca por novos compostos contra os diferentes estágios de Plasmodium vivax

Pesquisador: Stefanie Costa Pinto Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 84151317.4.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.584.969

Apresentação do Projeto:

Vide parecer 2.538.497 de 21/03/2018

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer 2.538.497 de 21/03/2018

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer 2.538.497 de 21/03/2018

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer 2.538.497 de 21/03/2018

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide parecer 2.538.497 de 21/03/2018

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com o documento "Carta de respostas às pendências, anexada a esta PB em 27/03/2018"

Todas as pendências foram acatadas.

PENDÊNCIA 1.

Folha de Rosto sem assinatura do pesquisador principal. Solicita-se inclusão da folha de rosto

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.969

assinada.

Peço desculpas pela inclusão do documento sem a assinatura. Na nova submissão o Documento correto foi anexado à plataforma.

PENDÊNCIA 2.

Solicita-se incluir Curriculum dos pesquisadores envolvidos no projeto.

Bem como, a atividade de cada participante tendo em vista a complexidade do projeto.

Conforme solicitado foi inserido à plataforma o CV Lattes de cada um dos pesquisadores envolvidos no projeto e um item (7) foi inserido no projeto descrevendo o papel de cada um deles no desenvolvimento do projeto.

PENDÊNCIA 3.

Foram identificadas algumas divergências entre os textos do projeto original, PB_informação básica, TALE e TCLE.

1º No item 5 letra A. Projeto principal. Obtenção de amostra o pesquisador informa que serão incluídos indivíduos acima de 18 anos com diagnóstico positivo para malária. E serão coletados 10 ml de sangue. Não informa os critérios de exclusão.

2º Na PB_informação básica, o pesquisador informa a exclusão de crianças abaixo de 12 anos. E serão coletados cerca de 20 ml de sangue de cada participante.

3º No TCLE e TALE informa ao participante a retirada de 20 ml de sangue. Diante do exposto, solicita-se readequação/atenção do pesquisador quanto às informações prestadas. Pois entende-se que se trata de um único projeto.

De fato há algumas incongruências nos diferentes documentos do projeto que já foram corrigidas na nova submissão. Serão coletados 20ml de sangue venoso de indivíduos diagnosticados com malária vivax com parasitemia maior igual a uma cruz, atendidos na FMT –HVD, sendo maiores de 12 anos de idade e que não tenham tomado nenhuma medicação antimalárica nos últimos 60 dias.

4º Referente ao objetivo geral no projeto principal, identificouse a seguinte colocação. O objetivo geral deste subprojeto. Citação diferente observada na PB. O objetivo geral deste projeto. Diante disto questiona-se: este projeto faz parte de um projeto maior? Guardachuva? Se faz, favor informar.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.969

Este projeto não faz parte de um projeto maior e portanto foi corrigido onde encontravase este subprojeto.

PENDÊNCIA/SUGESTÃO 4

No item 6. Projeto principal o pesquisador informa resultados preliminares com suas respectivas publicações. Diante disto, entendese que todas as fases do projeto já foram desenvolvidas, com comprovada competência da equipe técnica. Sendo assim, mediante o "título" entende-se que as etapas ainda serão desenvolvidas. Porem, após leitura do projeto na integra, comprova--se que o trabalho está em fase de implementação e não desenvolvimento. Diante disto, apenas como sugestão se o pesquisador considerar pertinente o titulo pode ser modificado de forma que traga melhor compreensão ao leitor.

Entendo a consideração do assessor e a sugestão foi acatada pela pesquisadora. De Fato a maioria das técnicas previstas já foram executadas com êxito e tratase da implementação destas técnicas e melhorias das mesmas para identificação de novas drogas com atividade antimalárica.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_999344.pdf	27/03/2018 15:35:22		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_2703.pdf	27/03/2018 15:34:24	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Declaração de	ANUENCIAFMT_cep.pdf	27/03/2018	Stefanie Costa Pinto	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.969

Instituição e Infraestrutura	ANUENCIAFMT_cep.pdf	15:33:13	Lopes	Aceito
Outros	Cartaderespostas_Pendencias.pdf	27/03/2018 13:54:25	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_2703.pdf	27/03/2018 13:46:18	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2703.pdf	27/03/2018 13:45:45	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_270318.pdf	27/03/2018 13:44:03	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_PauloPimenta.pdf	27/03/2018 13:42:08	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_PauloNogueira.pdf	27/03/2018 13:41:30	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_MarcusLacerda.pdf	27/03/2018 13:32:33	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_CamilaFabbri.pdf	27/03/2018 10:14:23	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_GlendaRamos.pdf	27/03/2018 10:13:37	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_FabioCosta.pdf	27/03/2018 10:11:41	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_ItalaPiauilino.pdf	27/03/2018 10:11:09	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Curriculo_YuryChaves.pdf	27/03/2018 09:56:27	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 06 de Abril de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

7.1.2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

IMPLEMENTAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS CONTRA OS DIFERENTES ESTÁGIOS 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 240 pessoas (homem ou mulher). 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 de 20 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 a Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes, 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) 99342-6163 (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 **“DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA PARA BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS CONTRA OS DIFERENTES ESTÁGIOS DE *Plasmodium vivax*”**

Data: / /

Endereço:.....

.....

Telefone: (...)-..... Polegar direito

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

..... Data: / /

7.1.3. Questionário



IMPLEMENTAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA A BUSCA POR NOVOS
COMPOSTOS CONTRA OS DIFERENTES ESTÁGIOS 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? _____
9. JÁ ESTÁ EM USO DE ANTIMALÁRICO? () SIM () NÃO
10. SE SIM, QUAL? _____
11. É PORTADOR DE ALGUMA 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

7.2. Procedimentos operacionais padrões

7.2.1. 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	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 20/01/2018
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

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

6.3. 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.

7.2.2. 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-ISCOVE'S MODIFIED <i>DULBECCO'S</i> MEDIUM)		
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
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

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

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

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 20º até o uso.

7.2.3. Protocolo de preparação de percoll 70%

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	PERCOLL 70%
Idioma da versão original	PT

Elaborado por: Glenda Ramos	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 8/04/2018
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para o preparo do Percoll 70%.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratório de Cultura

3. DEFINIÇÕES

Não se aplica

4. RESPONSABILIDADES

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 70%, utilizar todos os EPIs (luvas, máscara e touca).

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

Materiais

- Falcon 15ml
- Pipetas pasteur
- Percoll

- PBS 10X

- PBS 1X

Equipamentos

- Fluxo Laminar

- Centrífuga

6. PROCEDIMENTOS

6.1. Preparo da amostra para enriquecimento

Após a passagem da amostra pela coluna de celulose, centrifugar por 5 min a 1500 RPM e descartar o sobrenadante. A amostra deve ser ressuspensa com meio RPMI incompleto na proporção 1:1.

6.2. Percoll Isotônico

Adicionar 9 partes de percoll para 1 parte de PBS 10X. Reservar até o uso.

6.3. Percoll 70%

Adicionar 7 partes de percoll isotônico para 3 partes de PBS 1X. Delicadamente, despejar a amostra, como preparada no item 6.3.1, sobre o Percoll 70% na proporção 1:1. Centrifugar por 20 min a 1500 RPM, sem freio e sem aceleração.

Após a centrifugação, coletar o anel formado na solução. Lavar 3x com meio RPMI para a retirada de resíduos de Percoll.

7.2.4. Protocolo de preparação de coluna magnética MACS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_002_v08_PT
Título	PREPARAÇÃO DA COLUNA MAGNÉTICA (MACS) PARA O ENRIQUECIMENTO DE PARASITOS

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
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para o preparo do enriquecimento por coluna magnética (MACS)

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

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

3. SIGLAS

MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
------	--

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica

5. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de cultura

6. Recursos necessários

Materiais

Coluna Magnética

Quadro Magnético

Tubo Falcon 15ml

Reagentes

- Meio RPMI Incompleto

7. Procedimentos

Preparo da amostra para enriquecimento

Após a passagem da amostra pela coluna de celulose, centrifugar por 5 min a 1500 RPM e descartar o sobrenadante. A amostra deve ser ressuspendida com meio RPMI incompleto na proporção 1:1.

Proceder para a separação magnética.

Coluna Magnética

Coloque a coluna no quadro magnético. (Atenção com a força do imã!), posicionar um tubo falcon de 15ml para recuperar o material de passagem.

Realizar a lavagem da coluna, adicionando 3ml de meio RPMI incompleto. Descartar o meio e seguir com a adição da amostra. Para melhor enriquecimento repetir a passagem da amostra 2x sem desacoplar a coluna do quadro magnético.

Ao final da passagem, ainda acoplada ao quadro, adicionar mais 3ml de meio RPMI incompleto para a retirada de resíduos presentes ao final da coluna. Repetir esse procedimento até o eluente ficar livre de células.

Posteriormente, quando nenhum resíduo for observável, desacoplar a coluna do quadro e posicionar em um falcon de 15ml. Primeiramente adicionar 3ml de meio RPMI incompleto,

após a passagem adicionar mais 2ml de meio RPMI e então, com o embolo pressionar através da coluna cuidadosamente para a retirada total dos parasitos.

Centrifugar a amostra a 400g por 5min e realizar os procedimentos subsequentes.

7.2.5. Protocolo de infecção experimental de mosquitos anofelinos - MFA

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 - MFA		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Rosa Santana	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Henrique Silveira	Data de aplicação: 15/04/2018
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Nome	Versão	Alterações realizadas
		Adaptado do POP_MAL_LB_013_v02D_PT

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

Técnicos, alunos de mestrado, alunos de doutorado, pos-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 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 (contendo 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. Centrífuga

7. PROCEDIMENTOS

Condições Gerais do Experimento

O experimento de infecção experimental deverá ocorrer na sala de infecção com temperatura 26°C e 80% de umidade.

- Pode-se utilizar membrana sintética (Ex.: parafilme).

- O tubo com a amostra de sangue deverá permanecer em temperatura a 37°C.

Preparação dos Insetos

1. Separar (cerca de 100 ou 200 fêmeas) fêmeas de mosquitos com idade de 3 a 5 dias, as quais foram alimentadas previamente somente em solução açucarada (retira-se o açúcar 24 horas antes);
2. Acondicionar as fêmeas em potes ou copos apropriados para a infecção experimental.

Nota: A quantidade de mosquitos utilizada no grupo teste deverá ser a mesma a ser utilizada no grupo controle, caso seja necessário

Preparação do sangue

Ao início do dia em que se fará a infecção deve-se entrar em contato com a pessoa responsável no Ambulatório de Malaria para avisar que neste dia irá precisar de amostras de sangue dos pacientes. Ao chegar paciente o mesmo será convidado a participar do estudo e após a assinatura do TCLE, poderá ser realizada a coleta do sangue.

Nota: As amostras devem ser processadas ou não de acordo com o objetivo do estudo.

Preparação das membranas

O parafilme deverá ser cortado em tamanho de 5cmX5cm e esticado de modo que cubra a superfície do alimentador que deverá se manter fixo em cima das gaiolas para que o mosquito possa realizar o repasto sanguíneo (Figura 1).



Fonte: Acervo Pessoal
Figura 1. Alimentação artificial por membrana

Montagem do circuito de alimentação

O sistema de infecção experimental consiste em um Banho Maria a 37°C e um sistema de circulação de água ligado ao alimentador artificial.

O sangue contendo os parasitos e colocado no alimentador artificial previamente montado com a membrana de parafilme e então colocado sobre o pote que contém os insetos (Figura 2).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 2. Circuito de alimentação artificial por membrana

O tempo mínimo da infecção experimental é de 30 minutos.

Ao término da alimentação apenas os mosquitos alimentados com sangue deverão ser retirados dos potes de infecção e repassados para as gaiolas onde permanecerão até o momento da dissecação e deverão ser mantidas na sala dos infectados com solução açucarada a 10% em temperatura entre 25-26°C e umidade de 80%.

Referências

1. Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, Valle D. Parametros de biosseguranca para Insetarios e infectorios de vetores (Aplicacao e adaptacao das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissao Tecnica de Biosseguranca da Fiocruz). 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Diretoria do Instituto Oswaldo Cruz, 64pp, 2005. v. 1. 64pp.
2. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRAO de Infeccao Experimental de Anofelinos. Centro de Pesquisas Rene Rachou (CPqRR/Fiocruz), Minas Gerais

7.2.6. Protocolo para dissecção 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 DISSECÇÃO DE INTESTINO MÉDIO E DETECÇÃO MICROSCÓPICA DA INFECÇÃO DE ANOFELINOS POR <i>Plasmodium</i> spp		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Rosa Almeida	Revisado por: Djane Baia	Aprovado por: Henrique Silveira	Data de aplicação: 15/04/2018
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Nome	Versão	Alterações realizadas
		Adaptado do POP_MAL_LB_014_v02D_PT

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de dissecção 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.

3. DEFINIÇÕES

Dissecção e uma técnica de anatomia utilizada para separar órgãos e visualiza-los. Em anofelinos pode se aplicado por exemplo para retirada do intestino médio para confirmação da infecção através da visualização da presença ou não de oocistos e dessa forma estimar a taxa e intensidade da infecção.

4. RESPONSABILIDADES

Técnicos, alunos de mestrado, alunos de doutorado, pos-doutorado e pesquisadores dos laboratórios da rede, envolvidos na execucao da infeccao 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 - MFA

6. MATERIAIS

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

- Lupa Estereoscópica
- Microscópio

7. PROCEDIMENTOS

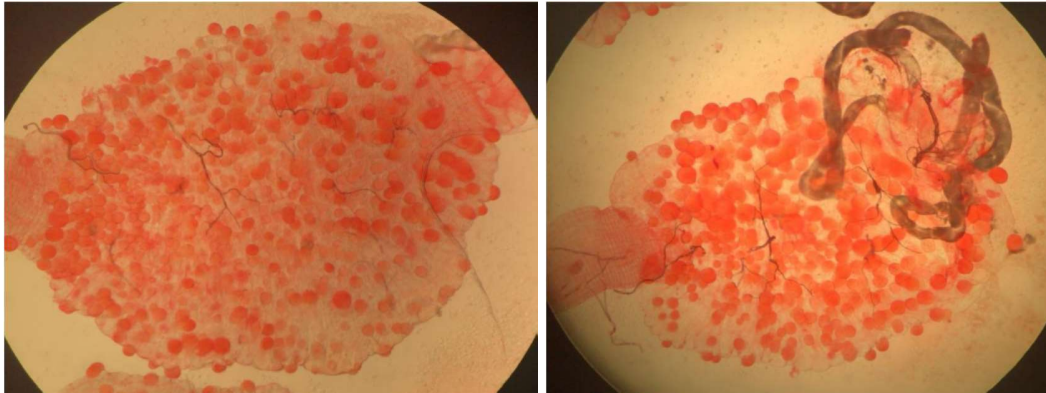
Dissecção dos anofelinos

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 dissecção 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* (Figura 1).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 1. Intestino Médio de *Anopheles darlingi*, corados com mercurocromo 2%, com oocistos de *Plasmodium vivax* 7 dias após a infecção.

Referências

2. Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, Valle D. Parametros de biosseguranca para Insetarios e infectorios de vetores (Aplicacao e adaptacao das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissao Tecnica de Biosseguranca da Fiocruz). 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Diretoria do Instituto Oswaldo Cruz, 64pp, 2005. v. 1. 64pp.
3. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRAO de Infeccao Experimental de Anofelinos. Centro de Pesquisas Rene Rachou (CPqRR/Fiocruz), Minas Gerais