



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



**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Plasmodium vivax*
COLETADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA A ANTIMALÁRICOS
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

MACEJANE FERREIRA DE SOUZA

MANAUS

2021

MACEJANE FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Plasmodium vivax*
COLETADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA A ANTIMALÁRICOS
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação 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, como requisito para obtenção de grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientadora: **Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes**

MANAUS

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

F383aa Souza, Macejane Ferreira de

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmodium vivax* coletados na amazônia brasileira a antimaláricos por citometria de fluxo. Manaus : [s.n], 2021. 89 f.: il.; 29 cm.

Dissertação – PGSS (Doenças Tropicais e Infecciosas (Mestrado)
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientadora: Stefanie Costa Pinto Lopes

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. Sensibilidade *ex vivo* 4. Microscopia Óptica 5. Citometria de Fluxo

I. Lopes, Stefanie Costa Pinto (Orient.).

II. Universidade do Estado do Amazonas.

III. Avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmodium vivax* coletados na Amazônia brasileira a antimaláricos por citometria de fluxo

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Plasmodium vivax*
COLETADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA A ANTIMALÁRICOS
POR CITOMETRIA DE FLUXO****MACEJANE FERREIRA DE SOUZA**

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

Banca Julgadora:

Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes
Presidente

Dra. Anna Caroline Campos Aguiar
Membro

Dra. Anne Cristine Gomes de Almeida
Membro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oneide e Marco Aurélio, o meu mais profundo reconhecimento por todos os ensinamentos.

A todos aqueles que me incentivaram nesta jornada, meus mais sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de estar aqui e viver esse sonho.

À minha mãe, Oneide de Paula, por ser minha primeira incentivadora e viver meus sonhos comigo, mesmo que para isso eu tivesse que estar longe de casa. Sempre me ensinou que educação é o melhor caminho para conseguir alcançar meus objetivos, aconselhando em todos os momentos necessários.

Ao meu pai, Marco Aurélio, que da sua maneira me deu incentivo para nunca desistir de ser sempre melhor e buscar evolução pessoal e profissional.

Ao meu irmão Mairon de Paula, pelo companheirismo de sempre e por me presentear com meu sobrinho Miguel, que trouxe alegria em momentos difíceis.

Ao meu primo Jackson Ferreira, Tia Francisca, Tia Lúcia e Tia Agenora, por me acolherem em Manaus e me darem todo apoio no início da minha jornada aqui.

Agradeço à minha orientadora, Dra Stefanie Lopes, pela oportunidade de viver esse momento tão almejado e importante da minha vida pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim e pela paciência e ensinamentos nesses anos como sua aluna. O seu amor pela pesquisa é uma grande inspiração para todos nós.

À minha primeira orientadora na iniciação científica, Dra. Camila Fabbri, por me ensinar a dar os primeiros passos no universo da pesquisa científica e pela paciência e disponibilidade para ajudar sempre que necessário. Obrigado pela ajuda até aqui e por fazer parte desse momento da minha vida.

Ao amigo e colaborador do projeto, Dr. Yury Chaves, que foi sempre tão prestativo e disposto a ensinar tudo que podia. Muito obrigada por tudo.

Aos colegas do grupo de pesquisa em malária da Dra Stefanie Lopes, que estiveram sempre dispostos a colaborar, muito obrigada.

Aos amigos Dr Geraldo Majela e Iria Cabral, pelos conselhos, amizade e incentivo à jornada na pesquisa científica.

Aos amigos “Brauers”, que conheci na pesquisa e que se tornaram grandes companheiros, me proporcionando lindos momentos durante todo esse processo. Muito obrigada, Ademir Bentes, Amanda Carvalho, Érick Frota, Lucas Ferreira, Regila Melo, Francys Sayara e Eunice Brandão.

Agradeço à minha amiga irmã, Dayanne Kamylla Barros, pela parceria na faculdade, pela amizade sincera e por, graças a Deus, ingressar comigo no mestrado. Obrigada por dividir os momentos de aflição, felicidade, tristeza, frustrações e conquistas. Que a nossa amizade permaneça pela vida, faremos grandes parcerias se DEUS permitir minha amiga. Fazer pesquisa com você foi um dos maiores presentes que eu poderia ter recebido.

À amiga Alessandra Santos, pela amizade tão doce e presente de sempre. Agradeço imensamente a Deus pela sua vida e por poder compartilhar com você essa vitória e os nossos sonhos futuros.

Às amigas queridas, Érica Gomes, Valéria Valle e Josemary Cordeiro, que foram anjos e caminharam junto comigo na faculdade, passando por todos os desafios possíveis e que foram companheiras nos momentos mais difíceis. Essa caminhada não seria a mesma sem vocês.

Às queridas amigas Andressa Cunha e Paula Jordana, pela amizade tão importante e por entenderem as minhas ausências nesse período. Obrigada por tudo.

À toda equipe da gerência de Malária, à Dona Marta e equipe, pela colaboração que permitiu as coletas das amostras para o projeto e também aos amigos do laboratório do IPCCB. Minha gratidão pela ajuda de todos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos por 2 anos.

À Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical FMT-HVD,
Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB), pelo programa e infraestrutura
cedida para execução do projeto.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

O projeto foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para o desenvolvimento da pesquisa e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da bolsa de estudo durante os 24 meses de realização do projeto.

RESUMO

Mundialmente, 2,85 bilhões de pessoas correm o risco de infecção por malária por *Plasmodium vivax*, sendo este o principal causador da malária no Brasil, onde os casos estão concentrados na Amazônia. Diante do surgimento da resistência do parasito aos antimaláricos, se tornou urgente a necessidade de desenvolvimento de estratégias para avaliar e validar a eficácia destes contra o parasito. Para o monitoramento da sensibilidade, o ensaio de amadurecimento *ex vivo* do isolado na presença dos fármacos é sugerido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em *P. vivax* a determinação da susceptibilidade do parasita por microscopia óptica é preconizada, porém é laborioso e exige profissionais treinados. Em vistas a isso, estudos demonstraram que a citometria de fluxo tem o potencial de proporcionar uma quantificação rápida e robusta do desenvolvimento do parasita *ex vivo*. Diante do exposto, esse projeto teve por objetivo avaliar a sensibilidade a antimaláricos de isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira, através da análise por microscopia óptica e citometria de fluxo. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes com malária vivax na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) que foram levadas ao laboratório para processamento. Primariamente, leucócitos foram removidos através de coluna de celulose e gradiente de Percoll a 70% foi realizado em metade da amostra para enriquecimento da parasitemia. A suspensão de parasitas enriquecidos ou não (hematócrito 2% em meio IMDM 20% soro AB) foram adicionadas a placas de 96 poços impregnadas previamente com os antimaláricos selecionados e em diferentes concentrações, ou controle sem adição de drogas. O parasito foi incubado a 37 °C e em atmosfera hipóxica por aproximadamente 48h. A sensibilidade aos fármacos foi avaliada através da determinação da concentração inibitória em 50% (IC₅₀) nos diferentes isolados (enriquecidos ou não) através da avaliação por microscopia óptica (MO; contagem de esquizontes em 200 parasitas assexuados em gota espessa) e citometria de fluxo (CF; determinação da porcentagem de parasitas maduros) através de simples e dupla marcação (SYBR; SYBR e Dihidroetídeo). A média da IC₅₀ dos isolados enriquecidos, analisados por MO e CF dupla e simples marcado foram, respectivamente: Cloroquina - CQ (52,23; 65,48; 59,38), Mefloquina -MQ (80,23; 57,20; 29,89), Artesunato - ART (4,56; 2,49; 5,89), Atovaquona – ATV (14,97; 13,32; 2,05). Em amostras não enriquecidas: CQ (44,99; 7,89; 44,49), MQ (52,97; 61,93; 49,45), ART (2,09; 1,04; 8,44) e ATV (11,30; 10,20; 6,68). Os resultados demonstram que as duas técnicas de análise têm boa correlação, confirmando que a citometria é uma boa ferramenta para análise de sensibilidade de *P. vivax* aos fármacos. Ainda, os resultados em amostras enriquecidas sugerem que parece não haver prejuízo do parasito nos testes mesmo nesta condição.

Palavras Chaves: malária; *Plasmodium vivax*; Sensibilidade *ex vivo*; Ensaio de maturação de esquizontes; Citometria de fluxo

ABSTRACT

Worldwide, 2.85 billion people are at risk of *Plasmodium vivax* malaria infection, which is the main cause of malaria in Brazil, where cases are concentrated in the Amazon region. Given the emergence of parasite resistance to antimalarials, it became urgent to develop strategies to evaluate and validate their efficacy against the parasite. For the monitoring of parasite drug sensitivity, the *ex vivo* maturation assay of isolates (SMA) in the presence of drugs is suggested by the World Health Organization (WHO). In *P. vivax*, the determination of the susceptibility of the parasite by optical microscopy is recommended, but it is laborious and requires trained professionals. In view of this, studies have shown that flow cytometry has the potential to provide rapid and robust quantification of the development of the *ex vivo* parasite. Therefore, this project aimed to evaluate the sensitivity to antimalarials of *P. vivax* isolates from the Brazilian Amazon, through analysis by optical microscopy and flow cytometry. Blood samples were collected from patients with vivax malaria at the Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) who were taken to the laboratory for processing. Primarily, leukocytes were removed through cellulose column and Percoll gradient 70% was performed in half of the sample to enrich parasitemia. The suspension of enriched or unenriched parasites (hematocrit 2% in IMDM 20% Serum AB) were added to the 96 wells plates previously impregnated with the selected antimalarials at different concentrations, or control without the addition of drugs. The parasite was incubated at 37°C in a hypoxic atmosphere for approximately 48 h. Drug sensitivity was evaluated by determining the 50 % inhibition concentration (IC₅₀) in the different isolates (enriched or not) by optical microscopy evaluation (OM; schizont count in 200 asexual parasites in thick smears) and flow cytometry (FC; determination of the percentage of mature parasites) by simple and double staining (SYBR Green; SYBR Green and Dihydroethidium). The mean IC₅₀ of the enriched isolates analyzed by OM and double and single FC were, respectively: Chloroquine - CQ (52.23; 65.48; 59.38), Mefloquine -MQ (80.23; 57.20; 29.89), Artesunate - RT (4.56; 2.49; 5.89), Atovaquone - ATV (14.97; 13.32; 2.05). In non-enriched samples: CQ (44.99; 7.89; 44.49), MQ (52.97; 61.93; 49.45), ART (2.09; 1.04; 8.44) and ATV (11.30; 10.20; 6.68). The results show that the two techniques have a good correlation, confirming that flow cytometry is a tool for analyzing sensitivity of *P. vivax* to drugs. Still, the results in enriched samples suggest that no impairment in parasite maturation was observed in this condition.

Keywords: malaria; *Plasmodium vivax*; *ex vivo* sensitivity; Schizont maturation assay; flow cytometry

RESUMO LEIGO

A Malária *vivax* é a forma da doença mais comum no Brasil e a maioria dos casos são registrados na região Amazônica. Apesar dos grandes avanços no controle, alguns desafios dificultam a sua eliminação, como a falha no tratamento. Sabendo disso, cientistas têm estudado novos medicamentos e também monitorado os que são utilizados atualmente. Esses estudos que verificam se os medicamentos ainda funcionam, precisam de análise em microscópio, que é bastante trabalhoso e precisa de profissional bem treinado para realizá-lo. Logo, este estudo quis verificar se é possível fazer esses testes com um método mais automatizado, chamado citometria de fluxo e se é possível comparar esses resultados com os da microscopia. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de pacientes com malária *vivax* e a estas foram adicionados os medicamentos para verificar se eram capazes de matar o parasita nas placas no laboratório em um período de cerca de 48 horas. Depois, o resultado do ensaio foi avaliado pelas duas técnicas, para saber se esses seriam parecidos ou não. Os resultados foram comparados e mostraram que as duas técnicas produzem resultados bem parecidos, sugerindo que a citometria de fluxo é uma boa ferramenta para ser utilizada em testes de sensibilidade.

Palavras Chaves: malária, *vivax*, medicamentos, sensibilidade, microscopia óptica, citometria de fluxo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de países endêmicos para malária.....	1
Figura 2: Mapa de risco de infecção por município, Brasil, 2019.....	3
Figura 3: Casos de Malária notificados na região amazônica e diferença percentual mensal, 2018 a 2020.....	4
Figura 4: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	5

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ACT	Derivados de Artemisinina
ART	Artesunato
ATV	Atovaquona
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Citometria de fluxo
CQ	Cloroquina
CSP	Proteína do circunsporozoíto
DHE	Dihidroetideo
DMSO	Dimetilsulfóxido
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
G6PDd	Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase).
IC50	Concentração inibitória 50%
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<i>K13</i>	<i>Kelch 13</i>
MDR	Multirresistência à drogas – (multidrug resistance)
MO	Microscopia Óptica
MQ	Mefloquina
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato - (<i>Phosphate Buffer Salin</i>)
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PNCM	(Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária)
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
pvcrt-o	Gene de resistência do <i>P. vivax</i> à cloroquina
pvm-dr-1	Gene de resistência do <i>P. vivax</i> à múltiplas drogas
SG	<i>SYBR Green</i>
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
%	Percentual
µL	Microlitros
<	Menor
≥	Maior ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária e aspectos epidemiológicos	1
1.2 Ciclo do <i>Plasmodium</i>	4
1.3 Tratamento	7
1.4 Desafios dos ensaios e análise da sensibilidade à drogas em <i>Plasmodium vivax</i> ..	10
1.5 Relevância do estudo	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	15
3.1 Manuscrito a ser enviado para a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	15
4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	46
5 CONCLUSÃO	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7 ANEXOS E APÊNDICES.....	52
7.1 Procedimentos operacionais padrão utilizados na dissertação	52
7.2 Parecer ético.....	78
7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	82
7.4 Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE).....	84
7.5 Cronograma de atividades	86
7.6 Produção Científica como colaborador no período de mestrado	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária e aspectos epidemiológicos

A malária é uma doença infecciosa e endêmica causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, o qual é transmitido pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Cinco espécies são responsáveis pela malária humana: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. As espécies *P. vivax* e *P. falciparum* são responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade e morbidade, sendo o *P. vivax* o mais disseminado em todo o mundo (1).

Os primeiros sintomas, usualmente, são: febre, às vezes acompanhada de calafrios, suor, dor de cabeça, falta de apetite, dor no corpo e outros sintomas que podem se assemelhar a sinais ou sintomas de outras doenças febris. Esses aparecem cerca de 10-15 dias após a picada do mosquito infectado e surgem durante o ciclo eritrocítico do parasito (1, 2). Se um indivíduo estiver infectado com malária e não for diagnosticado e tratado de forma correta, com medicamentos antimaláricos eficazes, a doença pode progredir rapidamente e até levá-lo a óbito (2,3).

Considerada um grave problema de saúde pública no mundo, é uma das doenças de maior impacto na morbidade e na mortalidade da população nos países situados nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Em 2019, quase metade da população mundial estava em risco de contrair a doença. Foram estimados cerca de 229 milhões de casos, que causaram 409 mil mortes (1).

A maioria desses casos ocorreram na África Subsaariana, 213 milhões (93%), seguido pela Região Sudeste da Ásia (3,4%) e Mediterrâneo Oriental (2,1%). Crianças menores de 5 anos são o grupo mais vulnerável afetado pela malária, sendo que neste último levantamento, representavam 67% (272.000) de todas as mortes por malária no mundo (1). Na região das Américas, em 2019, ocorreram 753.700 casos e 338 óbitos (3).

Enquanto *P. falciparum* predomina no continente africano, *P. vivax* é a espécie mais prevalente nas outras áreas onde a doença é endêmica, como sul e sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental, leste do Mediterrâneo, América Central e América do Sul (1).

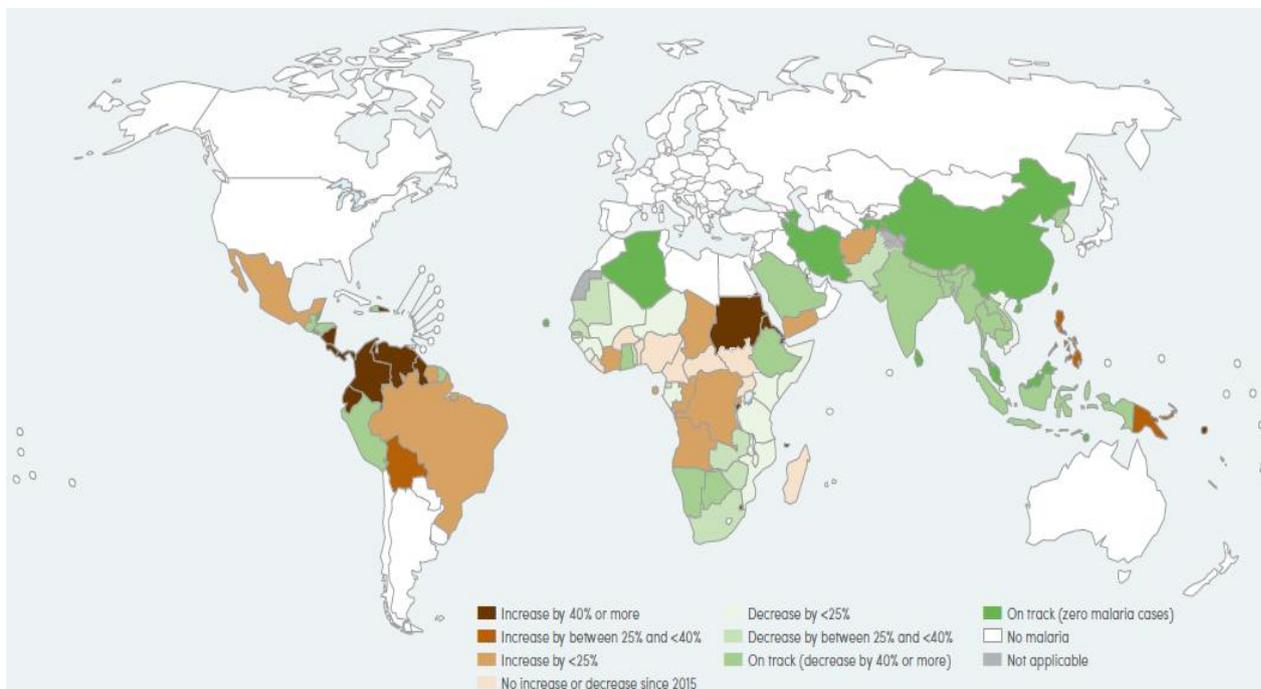


Figura 1. Mapa de países endêmicos para malária, mostrando o progresso na redução da incidência de casos de malária GTS 2015 – 2020. Fonte: estimativas da OMS.

Na América, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países e territórios estão em risco para malária, das quais quase 80% causada por *P. vivax*. Três países – Brasil, Colômbia e Venezuela (República Bolivariana) respondem por 80% de todos os casos estimados (1, 4).

No Brasil, a ocorrência de malária se concentra na região Amazônica, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins e responsável por cerca de 99,5% da carga de malária no país. Na região extra-amazônica, composta pelas demais unidades federativas e o Distrito Federal, apesar das poucas notificações, a doença não pode ser negligenciada, pois se observa uma alta letalidade (4).

A espécie prevalente das infecções é *P. vivax*, responsável por aproximadamente 85% dos casos, seguida do *P. falciparum*. Embora a doença seja endêmica na Região

Amazônica, dados do SIVEP (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica) apontam uma queda dos casos de forma gradativa ao decorrer dos anos devido a esforços governamentais para a diminuição da transmissão através de campanhas com ações profiláticas, tratamento dos pacientes infectados e o nivelamento de financiamento para os esforços de controle contra a doença (4).

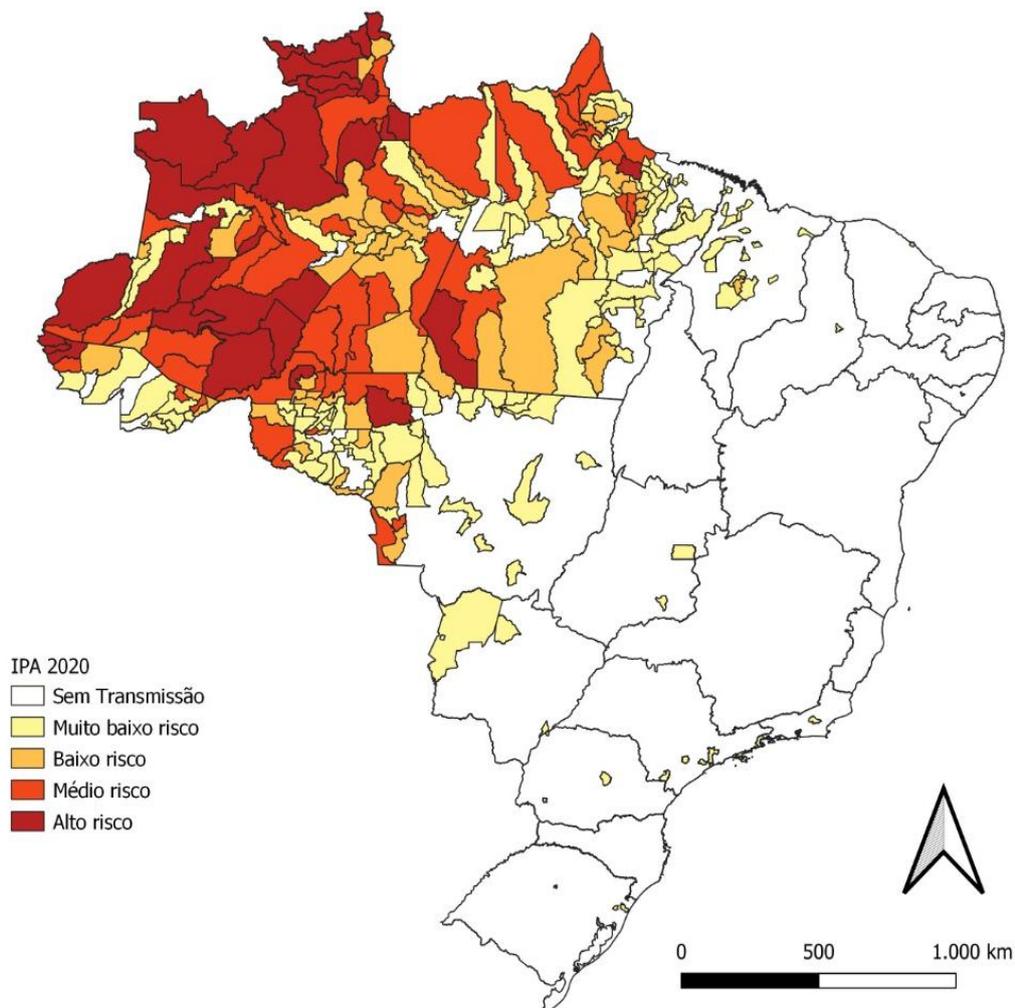


Figura 2: Mapa de risco de infecção por município, Brasil, 2020. Fonte: Ministério da Saúde/ IPA: Índice Parasitário Anual.

Dados do PNCM (Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária) mostram que no ano de 2019, o Brasil notificou 156.918 casos de malária, uma redução de 19% em relação ao ano anterior. Em 2020 foram registrados 134.524 casos no país, com redução de 14% em relação ao ano de 2019 (Figura 3). Dos casos notificados na região amazônica em 2020, 85% foram causados por *P. vivax*, seguido de *P. falciparum* (4).

Foi elaborada em 2015, a Estratégia Técnica Global para Malária da Organização Mundial da Saúde (OMS), que tem como meta a redução de pelo menos 90% dos casos e óbitos no mundo até 2030 em relação a 2015, a eliminação de malária em pelo menos 35 países e evitar a reintrodução da malária em países livres da transmissão (1,4).

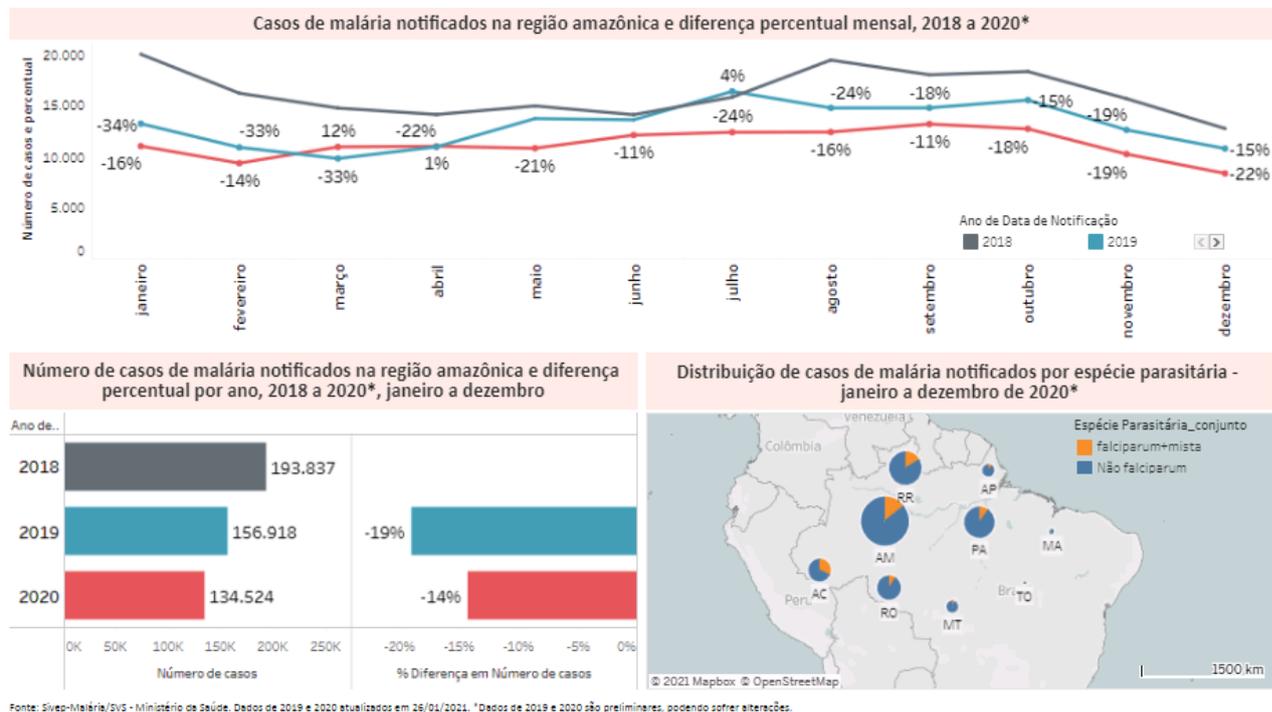


Figura 3: Casos de Malária notificados na região amazônica e diferença percentual mensal, 2018 a 2020. Fonte: Sivep-Malária/SVS – Ministério da Saúde.

1.2 Ciclo do *Plasmodium*

As espécies de *Plasmodium* são parasitos heteroxênicos, os quais necessitam de dois hospedeiros para completar seu ciclo, sendo um invertebrado, fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e o vertebrado. Neste último, ocorre a chamada fase assexuada, que inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles* injeta formas de esporozoítos do parasito na derme do hospedeiro, durante a realização do seu repasto sanguíneo (5).

Apenas parte desses parasitos que são depositados na pele, entram nos capilares, de forma que muitos são drenados para os vasos linfáticos e eliminados. Os esporozoítos param nos sinusóides do fígado e passam através das células endoteliais ou células de Kupffer, macrófagos residentes no fígado, para obter acesso aos hepatócitos subjacentes (6). No processo de invasão, há interação de diferentes

proteínas. Destaca-se a participação ativa da proteína do circunsporozoito (CSP) e a proteína relacionada à trombospondina (TRAP) presentes no esporozoíto que interagem com diferentes proteoglicanos na superfície dos hepatócitos do hospedeiro, permitindo a invasão do parasito (7).

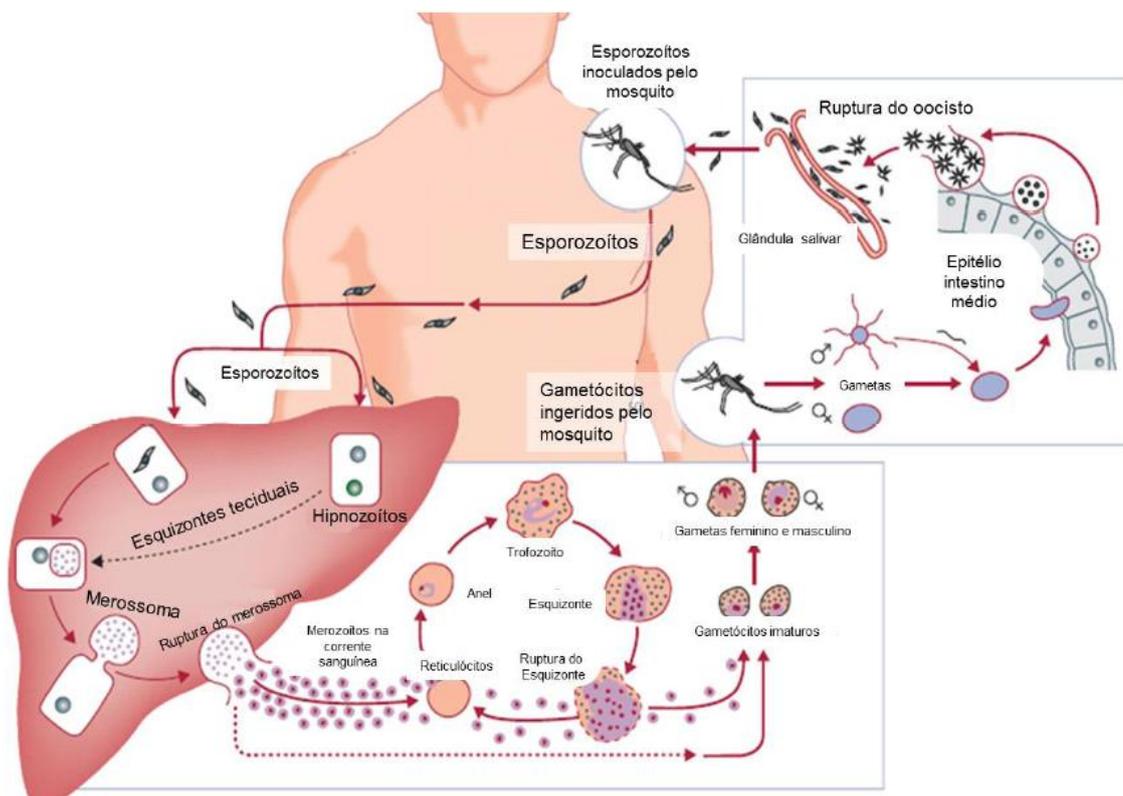


Figura 4: Ciclo biológico do *Plasmodium*. Fonte: Adaptado Mueller et al (2009).

Ao adentrar, os esporozoítos geralmente migram através de alguns hepatócitos antes de se estabelecerem em um para a diferenciação em milhares de merozoítos (8). Dentro da célula, o parasita sofre então um processo conhecido como esquizogonia pré-eritrocítica, onde o núcleo divide-se por mitose numa replicação contínua, sem divisão da membrana, dando origem a uma estrutura conhecida como esquizonte (9).

Esse processo leva cerca de 8 dias para *P. vivax* e 6 para *P. falciparum* e milhares de merozoítos são produzidos. Em média, o número de merozoítos por esquizonte tecidual é de 10.000 em *P. vivax* e 40.000 em *P. falciparum*. Estes merozoítos são então liberados na corrente sanguínea em vesículas denominadas merossoma, de forma orquestrada e assim se inicia o ciclo eritrocítico (10).

Há ainda que se considerar uma importante particularidade em relação à malária causada por *P. vivax* e *P. ovale*, que são as espécies capazes de desenvolver formas evolutivas chamadas de hipnozoítos e têm seu desenvolvimento interrompido na fase hepática. Tornam-se formas dormentes/latentes que darão continuidade ao desenvolvimento após um longo período, que pode durar semanas, meses ou até anos, e assim são responsáveis por permitir recaídas da doença (11).

Os merozoítos liberados dos merossomas, agora na corrente sanguínea, irão invadir os eritrócitos. Para que isso ocorra, é iniciado um processo de reorientação apical do parasito, que contém organelas e estruturas incluindo micronemas e roptrias e que facilitam a invasão após contato com os eritrócitos. As micronemas contêm adesinas envolvidas na ligação dos eritrócitos, enquanto das roptrias liberam proteínas após o envolvimento inicial da célula hospedeira para facilitar o processo de invasão e formar o vacúolo parasitóforo onde os merozoítos se replicam e formam células-filhas (12).

Essa divisão assexuada, que a depender da espécie, dura em média 48 a 72 horas, é conhecida como esquizogonia eritrocítica, onde os trofozoítos jovens – conhecidos como anéis – amadurecem, evoluindo para trofozoítos maduros, os quais os núcleos se dividem e originam finalmente os esquizontes. Ocorrerá então a ruptura destes, liberando novos merozoítos na corrente sanguínea, que irão infectar outros eritrócitos, iniciando novamente o ciclo assexuado. Nesta fase, ocorrem os primeiros sinais e sintomas da malária, que por sua vez, são inespecíficos e semelhantes aos sintomas de outras doenças infecciosas. Caracteriza-se por: febre, dor de cabeça, falta de apetite, dor no corpo, vômito e calafrios. Estes sintomas acontecem por conta da lise das hemácias pelo parasita (13).

Os merozoítos podem ainda se diferenciar em formas sexuadas, os gametócitos (femininos e masculinos) pelo processo chamado gametocitogênese (14). Ainda não está bem evidenciado qual o estímulo necessário para a produção de gametócitos, mas têm-se duas hipóteses: a primeira é que os merozoítos são geneticamente programados para se diferenciar em gametócitos antes da invasão ao eritrócito. A segunda é que na

invasão do eritrócito, fatores ambientais ou de estresse estão envolvidos e levam ao desenvolvimento dos gametócitos (15).

Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito faz a ingestão desses gametócitos e dá início ao ciclo sexuado. Essa fase de reprodução ocorre dentro do intestino médio do inseto. Durante a gametogênese, o gametócito masculino se divide em até oito microgametas flagelados – processo denominado exflagelação – enquanto o gametócito feminino se desenvolve em um único macrogameta (16). A fertilização de um macrogameta por um microgameta resulta na formação de um zigoto que sofre meiose e se desenvolve em um oocineto, uma forma móvel com organelas apicais. Este por sua vez, penetra na parede intestinal do mosquito e para perto da lâmina basal do intestino médio. Neste ambiente o oocineto se forma e se transforma em um oocisto, dentro do qual o parasita se replica assexuadamente, formando vários milhares de esporozoítos (esporogonia). Após a ruptura do oocisto, esses esporozoítos migram e invadem as glândulas salivares, onde podem ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto (17,18).

1.3 Tratamento

Os antimaláricos disponíveis, podem ser divididos da seguinte forma: Compostos aril-amino-álcool (Quinina, Quinidina, Halofantrina, Lumefantrina, Cloroquina, Amodiaquina, Mefloquina, entre outros), compostos de antifolato (Proguanil, Pirimetamina, Trimetoprima, entre outros) e compostos derivados de Artemisinina (Dihidroartemisinina, Artesunato, Artemeter) (19,20). Esses compostos atuam contra estágios eritrocíticos assexuados do parasita. Existem os de ação rápida (Cloroquina, Quinina e Mefloquina) e de ação lenta (Pirimetamina, Sulfonamidas e Sulfona). Além das drogas contra os estágios sanguíneos assexuados, os compostos hipnozoitocidas têm como alvo os hipnozoítos no fígado, enquanto as drogas gametocitocidas destroem as formas eritrocíticas sexuais do parasita na corrente sanguínea, evitando a transmissão da malária pelo mosquito (21).

Quinolinas (afetam a polimerização da hemozoína), antifolatos (bloqueiam as enzimas diidrofolato redutase e diidropteroato sintetase do parasita) e Artemisinina e

derivados (diversos mecanismos de ação), são administrados isoladamente ou em combinação para tratar a malária (20,22).

1.4 Resistência

Diante da busca pelo controle e eliminação da malária, o surgimento da resistência do parasito aos medicamentos utilizados no tratamento tem se tornado um grande desafio. É importante conhecer as terminologias de recorrência, recrudescência, recaída e resistência (4Rs). A recorrência é a recorrência de parasitemia assexuada após o tratamento (apenas em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*) ou uma nova infecção. Recrudescência é a recorrência da parasitemia assexuada após o tratamento da infecção com a mesma infecção que causou a doença original. Recaída é a recorrência de parasitemia assexuada em *P. vivax* e *P. ovale* malária derivada de estágios persistentes do fígado de hipnozoítos persistentes. A resistência é a capacidade de uma cepa do parasita sobreviver e / ou se multiplicar, apesar da administração e absorção adequadas de um medicamento antimalárico na dose normalmente recomendada (1,23)

A resistência aos antimaláricos surge devido à seleção de parasitos com mutações genéticas ou amplificações de genes que conferem suscetibilidade reduzida. Pode ser causada por uma mudança na estrutura, função ou quantidade de uma proteína. Esse processo é mediado por mudança genética, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) ou variação do número de cópias. Devido ao fato de a resistência aos medicamentos antimaláricos estar se tornando um obstáculo para o sucesso da terapia antimalárica, a vigilância e pesquisas que monitorem a sensibilidade do parasita aos fármacos são necessárias. Sempre surgirão cepas de parasitas resistentes, exigindo a geração contínua de novas moléculas com eficácia terapêutica (1,24).

Entre os fatores que podem influenciar no surgimento da resistência estão a taxa de mutação do parasito, carga parasitária e a baixa adesão às diretrizes de tratamento da malária (25). A dosagem inadequada, propriedades farmacocinéticas fracas e medicamentos falsos levam à exposição inadequada de medicamentos aos parasitos. Antimaláricos de baixa qualidade; antimaláricos falsificados sem ingrediente farmacêutico ativo podem ajudar e estimular o surgimento de resistência (26).

O *P. vivax* continua sendo um desafio para controle da malária no mundo, com a morbidade e mortalidade e devido à sua propensão a causar infecções recorrentes (28). Na maioria das áreas onde a espécie é endêmica, o tratamento de primeira linha permanece com uso de CQ + Primaquina (PQ), com CQ eliminando a infecção no estágio sanguíneo e PQ fornecendo cura radical dos estágios sanguíneos (assexuado e sexuados) e do fígado (hipnozoítos) (27).

Sabe-se que a resistência à CQ em *P. falciparum* está associada a mutações nos genes *pfprt-0* e *pfmdr-1*, porém estudos análogos investigando genes ortólogos de *P. vivax* não demonstram essa mesma relação. Apesar de as mesmas proteínas transportadoras parecerem estar envolvidas com a resistência à cloroquina em *P. vivax*, até o momento não foram encontradas mutações associadas à resistência à droga nesta espécie de parasito (28).

Neste sentido, estudo realizado em Manaus, observou o aumento na expressão dos genes *pvprt-0* e *pvm-dr-1* em isolados provenientes de pacientes que apresentaram falha terapêutica devido à resistência à cloroquina. Neste mesmo estudo os autores também encontraram aumento na expressão desses genes em isolados de pacientes que apresentaram complicações clínicas, sugerindo uma relação entre complicações graves de *P. vivax* e resistência à cloroquina (29).

Outro fator a ser levado em consideração é a possibilidade de falhas na ativação metabólica da primaquina. Para eliminar os hipnozoítos, a primaquina precisa ser ativada pela isoenzima 2D6 do citocromo P450 humano (CYP2D6), que é convertido em metabólitos oxidados que são responsáveis pela atividade anti-hipnozoítos (30) O CYP2D6 é responsável pelo metabolismo de 20-25% dos medicamentos usados clinicamente e há mais de 46 alelos principais do *CYP2D6* conhecidos, que podem ser determinados e predizer um fenótipo de metabolização do CYP2D6 (fraco, intermediário, normal e ultrarápido) (31). Foi sugerido que um metabolismo reduzido da primaquina devido a deficiências na função do CYP2D6 pode estar relacionado a recaídas de *P. vivax* (32,33,34).

Importante ressaltar que PQ pode resultar em hemólise significativa em pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDd). Esta é a enzimopatia hereditária mais comum no mundo, com uma faixa de prevalência de 2% a 40%. O Guia de tratamento da malária no Brasil recomenda que pessoas com deficiência suspeita ou confirmada de G6PD (atividade abaixo de 30%) tratem com PQ na dose semanal (0,75 mg/dose) por 8 semanas para reduzir o risco de hemólise e melhorar a tolerabilidade a distúrbios gastrointestinais (35,52).

Na África e na América do Sul, a resistência à CQ ao *P. falciparum* apareceu pela primeira vez em 1978 e 1996, respectivamente, sendo que no *P. vivax* foi relatado pela primeira vez em 1989 em Papua-Nova Guiné (36,37). Os primeiros relatos de malária vivax resistentes à CQ na América Latina foram da Colômbia (38) e Brasil (39).

A resistência à Artemisinina e seus derivados também são fenômenos emergentes e preocupantes no tratamento da malária (40). Essa terapia é utilizada no tratamento de *P. falciparum* e em alguns países também para o *P. vivax*, tendo início de ação rápido, mas eliminados logo (meia-vida de cerca de 1 h) dos humanos, desta forma sendo essencial combiná-los com drogas de eliminação lenta para matar os parasitos residuais (41). São potentes agentes antimaláricos e a OMS recomenda o uso de análogos da Artemisinina em combinação com outros medicamentos para o tratamento da malária, a fim de controlar a resistência (42). Na sub-região do Grande Mekong na Ásia, a resistência aos medicamentos à base de ACT é emergente. A resistência à artemisinina em *P. falciparum* está associada a polimorfismos *pfkelch13* que codificam o domínio da hélice *Kelch 13 (K13)* do parasito, que consequentemente serve como um marcador molecular na vigilância da resistência (43).

A vigilância da resistência aos antimaláricos pode ser realizada por meio de estudos *in vivo*, como estudos de eficácia terapêutica, estudos *in vitro* / *ex vivo* de cultura de parasitos da malária e estudos moleculares avaliando marcadores conhecidos de resistência aos antimaláricos. Os dados obtidos com o teste de eficácia terapêutica, realizado de acordo com o protocolo padrão da OMS, são mais úteis para atualizar as políticas nacionais de tratamento, enquanto o teste *in vitro* e os marcadores moleculares

podem fornecer informações adicionais importantes sobre a alteração dos padrões de resistência (44,45).

1.4 Desafios dos ensaios e análise da sensibilidade a drogas em *Plasmodium vivax*

Diante da diminuição da sensibilidade do *P. vivax* à CQ, a necessidade de desenvolver novas drogas para o tratamento de parasitos da espécie é urgente e leva a discussão de ferramentas para avaliar e validar a eficácia de antimaláricos contra este parasita. É importante ressaltar que a maioria dos estudos são realizados em *P. falciparum*, que é facilmente cultivado por longo período, diferente de *P. vivax* onde o cultivo somente é alcançado por curto prazo (46).

A falta de uma cultura *in vitro* contínua limita as pesquisas sobre a biologia de *P. vivax*, bem como sobre a fisiopatologia e o desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas e ferramentas diagnósticas para combater e eliminar essa doença tropical negligenciada (41). Poucos estudos descrevem a cultura de *P. vivax in vitro* a longo prazo e atualmente, a única forma prática e reprodutível de testar a eficácia de quimioterápicos contra a espécie é usar isolados de pacientes humanos coletados a fresco ou criopreservados em ensaios *ex vivo* (47,48).

Os testes de sensibilidade a drogas envolvem a comparação fenotípica de isolados frescos ou descongelados de *P. vivax*, cultivados até a maturação em estágio de esquizonte, na presença e ausência de medicamentos antimaláricos (48). Estes ensaios fornecem dados sobre a sensibilidade intrínseca de *P. vivax*, de forma que uma das características mais importantes desses estudos *ex vivo* é que um grande número de medicamentos antimaláricos padrão e novos podem ser testados simultaneamente contra populações-alvo dessa espécie (49).

No entanto, o uso desses isolados apresentam desafios, como baixa densidade parasitária, populações de parasitas assíncronas e morte significativa de parasitas durante a maturação intraeritrocítica *ex vivo*. Além disso, o ensaio padrão para medir a eficácia antimalárica contra *P. vivax* é uma modificação do laborioso microteste da OMS baseado em microscopia óptica, exigindo técnicos de microscopia altamente treinados (50).

O exame microscópico de gota espessa corada com Giemsa continua sendo o método padrão ouro para a detecção, quantificação, especificação e estadiamento de parasitos da malária em estágio sanguíneo. A quantificação do crescimento do parasito por esta técnica é relativamente simples, barata e adequada para uso em ambientes de campo (51,52).

No entanto, este método tem várias deficiências significativas. É laborioso, depende das habilidades de microscopistas bem treinados para identificar corretamente as diferentes espécies de parasitas e estágios e demanda considerável tempo para realização das leituras. Parasitemias muito baixas podem não ser detectadas por gota espessa, mesmo por microscopistas bem treinados. A variabilidade entre os microscopistas afeta amplamente a interpretação, enfatizando a necessidade de ensaios rápidos e mais simples que mantenham a precisão (52).

A quantificação de parasitas baseada em citometria de fluxo (CF) tem sido proposta com o objetivo de aumentar a precisão e objetividade das leituras. Além de medir o tamanho da célula e o conteúdo intracelular com base na luz espalhada, os avanços em corante fluorescente aumentaram a aplicabilidade desta técnica para distinguir diferentes tipos de células em amostras biológicas. Os eritrócitos maduros carecem de DNA nuclear e desta forma, é possível distinguir eritrócitos parasitados de eritrócitos não infectados, especialmente aqueles em uma cultura livre de leucócitos (53).

Fluorocromos de ligação em DNA e RNA estão disponíveis comercialmente. Alguns utilizados são o Hoechst, SYBR Green, laranja de tiazole, laranja de acridina, hidroetideo, SYTO-16 e YOYO-1. Esta técnica é capaz de analisar milhares de células em um curto espaço de tempo. Cada célula se alinha na corrente de fluxo e é exposta a diferentes comprimentos de onda de luz gerada a partir da fonte de laser. Tem o potencial de proporcionar uma quantificação rápida e robusta do crescimento do parasita *ex vivo* e tem como vantagem identificar diferentes fases do parasita e quantificá-las (54).

A aplicação de métodos baseados nesta técnica a isolados de *P. vivax* foi relatada pela primeira vez por Malleret et al (2011) (55). Russell e colaboradores modificaram este método de coloração dupla, demonstrando a viabilidade da quantificação baseada em CF da susceptibilidade à CQ e ao ART em isolados de campo de *P. falciparum* e *P. vivax* (56). Esses estudos mostraram boa correlação entre os métodos baseados em microscopia de luz (MO) e CF.

O surgimento de resistência a múltiplas drogas, incluindo à artemisinina e drogas parceiras, é uma preocupação de saúde pública e ameaça a sustentabilidade do esforço global em andamento para reduzir a carga da doença. A Estratégia Técnica Global para a Malária 2016–2030 apela aos países e parceiros globais que monitorem a eficácia dos medicamentos antimaláricos para que os tratamentos mais apropriados possam ser selecionados para as políticas nacionais (1,46).

1.5 Relevância do estudo

O *P. vivax* é uma das espécies mais prevalentes no mundo e o surgimento da resistência do parasito, trouxe a necessidade urgente de ferramentas que auxiliem no monitoramento contínuo, necessário para informar as políticas de tratamento em países onde a malária é endêmica e para garantir a detecção precoce e resposta à resistência aos medicamentos.

A microscopia óptica é o método padrão ouro e o mais comum para determinar os efeitos antimaláricos no desenvolvimento intraeritrocítico em cultura de *Plasmodium*, mas é laborioso e necessita de microscopista treinado. Trabalhos anteriores mostraram a citometria de fluxo como uma técnica promissora, capaz de otimizar a leitura de amostras..

Diante do exposto este trabalho visa avaliar a sensibilidade dos isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira a diferentes antimaláricos, pela técnica de maturação de esquizontes por duas abordagens, a microscopia óptica e citometria de fluxo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Plasmodium vivax* coletados na amazônia brasileira a antimaláricos por citometria de fluxo.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a sensibilidade (IC_{50}) de isolados de *Plasmodium vivax* da Amazônia brasileira, frente aos antimaláricos: Cloroquina, Mefloquina, Artesunato e Atovaquona;
- Comparar os valores de sensibilidade aos antimaláricos, obtidos pelas técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo;
- Comparar os valores de sensibilidade aos antimaláricos, obtidos em amostras marcadas somente com corante fluorescente SYBR Green e com SYBR Green e Dihidroetideo;
- Comparar a sensibilidade (IC_{50}) de isolados de *Plasmodium vivax* em amostras enriquecidas ou não por Percoll 70%.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

3.1 Manuscrito a ser enviado para a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Title: Sensitivity evaluation of *Plasmodium vivax* isolates collected in the Brazilian Amazon to antimalarials by flow cytometry

Macejane Ferreira de Souza^{1,2}, Yury Oliveira Chaves^{1,4}, Camila Fabbri^{1,3,4}, Paulo Afonso Nogueira^{1,4}, Fábio Trindade Maranhão Costa⁵, Stefanie Costa Pinto Lopes^{1,2,4*}

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

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

³ Centro Universitário Fametro, Manaus, Amazonas, Brazil

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

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

Corresponding author: Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia. Instituto Leônidas & Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Rua Terezina, 476. Adrianópolis. 69057-070. Manaus – Amazonas – Brazil. Phone: (+55) 92-3621-2334. E-mail: stefaniecplopes@gmail.com

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

ABSTRACT

Background: Estudos de sensibilidade antimalárica *ex vivo* em *Plasmodium vivax* ainda dependem da determinação microscópica da maturação de esquizontes. Embora sensível, é laborioso e depende de microscopista treinado. A citometria de fluxo tem demonstrado potencial como ferramenta de avaliação, sendo ainda necessário validar um protocolo padronizado para uma determinação precisa e objetiva dos resultados.

Objectives: Comparar a aplicabilidade da técnica de citometria de fluxo com o método “padrão ouro” de microscopia óptica, na determinação da sensibilidade *ex vivo* de

Plasmodium vivax a antimaláricos selecionados. **Methods/findings:** O ensaio de maturação de esquizontes foi realizado em placas de 96 poços, pré-doseadas com os antimaláricos selecionados, para avaliar a susceptibilidade *ex vivo* de isolados de *P. vivax* coletados e enriquecidos ou não por Percoll 70%. Foram cultivados por aproximadamente 48 horas, em atmosfera hipóxica a 37°C. Após cultivo, foram confeccionadas gotas espessas para leitura por microscopia óptica. As amostras também foram marcadas com os corantes fluorescentes SYBR Green e Dihidroetideo (concentração 0,5x e 5 ug/ml, respectivamente) para leitura em citômetro de fluxo e posterior avaliação da fluorescência. Após obtenção das IC50, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre a sensibilidade vista por microscopia óptica e citometria de fluxo e também entre a simples e dupla marcação de corantes. As amostras enriquecidas tornaram mais evidente, qualitativamente, a dose dependência do efeito antimalárico e revelou uma maior similaridade entre as IC50 das técnicas de avaliação (CF e MO). **Conclusion:** A quantificação por citometria de fluxo demonstrou boa correlação com os dados obtidos por microscopia óptica, mostrando ser uma ferramenta viável para avaliar a susceptibilidade antimalárica *ex vivo* de *Plasmodium vivax*.

Keywords: malaria; *Plasmodium vivax*; In vitro sensitivity; Schizont maturation inhibition assay; flow cytometry

Sponsorship: FAPESP,CAPES

INTRODUCTION

A malária é considerada um grave problema de saúde pública mundial, sendo uma das doenças de maior impacto na morbidade e na mortalidade da população nos países situados nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Entre as cinco espécies capazes de infectar humanos, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as mais comuns, sendo esta última a mais amplamente distribuída geograficamente ⁽¹⁾.

Diante da busca pelo controle e eliminação da doença, o surgimento da resistência do parasito aos medicamentos antimaláricos se tornou um grande desafio e trouxe a necessidade urgente de vigilância e pesquisas que monitorem a sensibilidade do parasita aos fármacos disponíveis ^(1,2). Uma das principais ferramentas de vigilância da resistência aos antimaláricos são estudos *in vitro* / *ex vivo* de cultura de parasitas. Ressalta-se que a maioria dos estudos são realizados em *P. falciparum*, que é facilmente cultivado a longo período, diferente de *P. vivax* onde o cultivo somente é alcançado por um curto prazo ⁽³⁾.

O teste de sensibilidade antimalárica *ex vivo* depende amplamente da determinação microscópica da maturação dos esquizontes. Este método, no entanto, é laborioso, demorado e depende das habilidades de microscopistas bem treinados para identificar corretamente as diferentes espécies de parasitas e estágios. Além disso, grandes variações inter e intraobservador do estadiamento do parasita são frequentemente observadas ⁽⁴⁾.

A quantificação de parasitas baseada em citometria de fluxo (CF) tem sido proposta com o objetivo de aumentar a precisão e objetividade das leituras. Além de medir o tamanho da célula e o conteúdo intracelular com base na luz espalhada, os avanços em corante fluorescente aumentaram a aplicabilidade desta técnica para distinguir as características das células ⁽⁵⁾. Os eritrócitos maduros carecem de DNA nuclear e desta forma, é possível distinguir eritrócitos parasitados dos não infectados, especialmente aqueles em uma cultura livre de leucócitos ⁽⁶⁾.

Esta técnica tem o potencial de proporcionar uma quantificação rápida e robusta do amadurecimento do parasita *ex vivo* e tem como vantagem identificar diferentes fases do parasita e quantificá-la, sendo assim proposta com o objetivo de aumentar a precisão e objetividade das leituras ⁽⁷⁾.

Neste trabalho comparamos a aplicabilidade da técnica de citometria de fluxo com o método “padrão ouro” de microscopia óptica, na determinação da sensibilidade *ex vivo* de *Plasmodium vivax* a antimaláricos selecionados.

MATERIAL AND METHODS

Coleta de amostras

Este estudo foi conduzido na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no estado do Amazonas, Brasil, de Março de 2020 a Outubro de 2021. Um total de 72 amostras de sangue (18 mL de sangue coletado em tubo com heparina de sódio) foram coletadas de pacientes com monoinfecção por *P. vivax*. Os critérios de inclusão incluíram uma parasitemia igual ou superior a duas cruzes, idade igual ou superior a 12 anos e nenhum tratamento antimalárico durante as quatro semanas anteriores. Os pacientes foram entrevistados, convidados a participar do estudo e após aceite foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), sendo este último utilizado em casos de pacientes menores de 18 anos, sob aprovação e assinatura do responsável. As Infecções por *P. vivax* foram confirmadas através de diagnóstico de gota espessa, técnica preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), coradas com Giemsa e examinadas por microscopistas experientes ⁽⁸⁾. As amostras foram transportadas para o laboratório da gerência de malária do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB), na FMT-HVD, Manaus, Amazonas, Brasil, dentro do prazo de cerca de 15 minutos após a coleta, para garantir a viabilidade da amostra. Toda a pesquisa foi conduzida de acordo com as diretrizes institucionais para a experimentação humana. Após a coleta, os pacientes foram encaminhados para a consulta médica e todos receberam o tratamento conforme preconizado pelo Ministério da Saúde ⁽⁹⁾.

Fixação de drogas em placa de 96 poços

Os medicamentos antimaláricos Cloroquina (CQ), Mefloquina (MQ), Artesunato (ART) e Atovaquona (ATV), foram obtidos do fabricante Sigma Aldrich. Foram preparadas soluções estoque da droga na concentração de 1mg/mL ou 0,5 mg/mL, a depender do antimalárico, em diluente apropriado (água deionizada, etanol 70% ou DMSO (Dimetilsulfóxido)). As soluções de uso foram diluídas em metanol 50%, nas suas respectivas concentrações desejadas para os testes. As placas de 96 poços foram pré-doseadas diluindo a solução de uso em metanol a 50%, contendo 8 concentrações em série (diluições de duas vezes), mais 8 poços livres, para controle sem droga e controle negativo (sem parasito), seguido pela evaporação *overnight*. Os intervalos de concentração para cada antimalárico foram: CQ (1,37-3.000nM) ^(1,10), MQ (1,37-3.000 nM)⁽¹⁾, ART (0,027-60 nM) ^(11,12) e ATV (0,027-60 nM) ⁽¹³⁾. Todas as placas foram armazenadas a 4°C até o uso (com validade de 1 mês). Com o intuito de validar as concentrações das drogas pré-fixadas nas placas, utilizou-se a cepa 3D7 de *P. falciparum*, onde de forma randomizada, duas foram utilizadas dentro de um lote de quinze placas.

Processamento das amostras

Um esfregaço sanguíneo foi feito para verificar o estágio do parasito e somente as amostras com pelo menos 40% em estágio de trofozoíto jovem (anel) foram utilizadas. Estando elegíveis para o experimento, foram centrifugadas por 5 minutos a 400 g para retirada do plasma e lavadas 3 vezes com meio de lavagem RPMI 1640, para serem passadas na coluna de celulose a fim de realizar a depleção de leucócitos ⁽¹⁴⁾. A papa de hemácia obtida foi ressuspensa em meio R[PMI e centrifugada novamente, para então

ser preparada a solução de parasito, onde parte desta será utilizada no procedimento a ser descrito abaixo.

Enriquecimento das amostras com Percoll 70%

Foi preparada uma solução de Percoll isotônico, adicionando 9 partes de Percoll absoluto (fabricante Sigma Aldrich) para 1 parte de PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X concentrado. Para o Percoll 70%, foram usadas 7 partes de Percoll isotônico para 3 partes de PBS 1X. Então a solução de parasitos, foi diluída na proporção de 1:1 em meio RPMI, a qual foi delicadamente adicionada sobre o Percoll 70% também na proporção 1:1 e então centrifugada por 20 minutos a 1500 g, sem freio e baixa aceleração. Após a centrifugação, foi coletada a interface entre as soluções que foi lavada três vezes com meio RPMI para a retirada de resíduos de Percoll. Em seguida, foi feito um esfregaço sanguíneo para verificar a parasitemia obtida no Percoll 70%. O pellet foi reajustado com hemácia sadia para obtenção do volume de papa necessário para o preparo da solução de cultivo, e assim suceder com o procedimento de cultura do parasito. Esse processo foi realizado para, além de enriquecer, concentrar as formas mais jovens (anéis) do parasito na amostra, essenciais para os ensaios de maturação.

Ensaio de sensibilidade a drogas em cultura ex vivo

A susceptibilidade de drogas de isolados de *P. vivax ex vivo* foi avaliada pelo ensaio de maturação de esquizontes ⁽¹⁵⁾. 200 µl da solução de parasito enriquecido ou não por gradiente de Percoll 70% foi ressuspensa em meio IMDM suplementado com 20% de soro humano inativado, em um hematócrito final de 2%. Metade da placa de 96 poços fixada com as drogas pré-doseadas, mais um grupo controle sem droga (controle

positivo) e outro com controle sem parasitos (controle negativo) foi utilizada para a amostra não enriquecida. À outra metade adicionou-se a amostra enriquecida, utilizando o mesmo padrão para os controles positivo e negativo. Em seguida, foi incubado em atmosfera hipóxica (candle jar) a 37,5 °C, por até 48h em média, para amadurecimento dos parasitos. A incubação foi interrompida quando obtido > 40% de parasitos em estágio de esquizontes no controle positivo determinado por MO ou até 48 horas de cultivo.

Quantificação de parasitas por microscopia óptica

Foram confeccionadas gotas espessas de cada poço que foram então coradas pelo método de Walker e examinadas microscopicamente. O número de esquizontes maduros por 200 parasitas em estágio assexuado foi determinado para cada concentração de droga e também para o poço controle positivo.

Validação da concentração de uso de corantes fluorescentes para Citometria de fluxo

Amostras de *P. vivax* foram enriquecidas ou não por Percoll 70% e cultivadas em placas sem drogas para obtenção de > 40% de esquizontes. Foram utilizados os corantes de ácido nucleico SYBR Green I (SG, Invitrogen-Molecular Probes), solução estoque 10.000 x concentrado em DMSO e Dihidroetídeo (DHE, Sigma-Aldrich). O DHE foi diluído conforme instruções do fabricante (5mg/ml). Foram avaliadas as concentrações de 0,5x; 1x; 2x e 4x de SYBR GREEN e DHE nas concentrações de 2,5; 5 e 10 µg/ml, em duplicata para cada condição. A marcação dos parasitas foi realizada de acordo com protocolo descrito anteriormente ⁽¹⁶⁾. Brevemente, ao término do cultivo, a suspensão de parasitas nos poços foi homogeneizada e 50 µl de cada poço foi adicionado a uma nova

placa. A estes foi adicionado 50 µl da solução contendo os corantes (simples SYBR Green ou junto ao DHE), seguido de incubação por 20 minutos a 37° C. Após este período foi adicionado 200 µl de PBS 1x gelado para paralisar a reação e então ser realizada a leitura da amostra em citômetro BD FACSCanto II TM. Após aquisição pelo equipamento, os dados brutos foram gerados pelo software FlowJo. Para melhor construção de *gates*, eritrócitos não infectados (controle negativo) foram também corados nas mesmas condições para definição da população negativa.

Avaliação da sensibilidade da detecção em amostras com baixa parasitemia por Citometria de fluxo (CF)

Uma amostra positiva foi enriquecida por Percoll e depois preparada solução final 2%. Após esse processo, a solução foi diluída serialmente (base 2) por 10 vezes em placa de 96 poços contendo o mesmo volume de solução de hemácias não infectadas no mesmo hematócrito. Cada condição de parasitemia foi testada em duplicata. Este ensaio foi realizado após definição da concentração de corantes. Foi marcado com SYBR Green 0,5x concentrado em PBS 1x.

Quantificação de parasitas por citometria de fluxo (CF).

As amostras foram analisadas usando um laser duplo (azul: 488 nm, 50 mW de estado sólido; vermelho: 640 nm, diodo 30 mW) equipado para análise de placas de 96 poços de alto rendimento (BD FACSCanto II TM). O laser azul foi utilizado para a detecção de ambos os corantes (SG em FL1: 530 ± 15 nm; DHE em FL2: 585 ± 20 nm). As células foram selecionadas de acordo com seu perfil Tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A). A população de células foi analisada adicionalmente nos perfis FSC-A/FL1-A. A população de esquizontes maduros foi definida com base no poço de controle positivo e

aplicado a todos os poços tratados com drogas. O procedimento de a coloração dupla de DHE e SG foi aplicado conforme protocolo previamente descrito ⁽¹⁶⁾. Para aquisição de dados, 100.000 eventos totais foram analisados.

Análise estatística

A concordância entre os métodos de quantificação foi avaliada pela análise de Bland-Altman usando dados de IC₅₀ obtidos com ambos os métodos (MO e CF) ⁽¹⁷⁾. A normalidade dos dados foi verificada utilizando o método Shapiro-Wilk. A comparação entre grupos foi feita usando o teste ANOVA/Kruskal-Wallis e post test de Tukey/Dunn's. O teste de Wilcoxon ou teste *t* de Student foi realizado para comparar dois grupos pareados. Todas as análises estatísticas e os gráficos utilizaram o software GraphPad Prism (versão 8.0.2) O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$ para todos os testes.

ETHICS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FMT-HVD sob o seguinte número CAAE: 18921019.0.0000.0005.

RESULTS

Descrição da quantidade de amostras e seu uso nos ensaios realizados

Foram coletadas um total de 72 amostras de sangue de pacientes com malária vivax. As trinta e oito primeiras foram coletadas com intuito da padronização da concentração de uso de corantes fluorescentes na CF. Destes, 30 (78,9%) não tinham a quantidade de trofozoítos jovens (anéis) necessária para ensaio. Desta forma, optou-se pela utilização de algumas que continham maior porcentagem de trofozoíto maduro, que foram deixados em cultivo por 24h em média ou até obtenção de > 40% de esquizontes. De um total de 14 amostras usadas, três (21,4%) foram utilizadas com sucesso nos testes, cinco (35,7%) não tiveram amadurecimento suficiente, três (21,4%) não tiveram sucesso na marcação pelos corantes e análise por citometria e três (21,4%) contaminaram durante o cultivo.

Trinta e quatro amostras foram coletadas para ensaio *ex vivo* de sensibilidade a antimaláricos de *P. vivax*. Destas, apenas nove (26,5%) tinham > 40% de anéis. Seis (66,7%) resultaram em testes bem-sucedidos e três (33,3%) tiveram amadurecimento insuficiente. Importante ressaltar que essas três amostras que não amadureceram nos testes de sensibilidade, se deram por problemas técnicos na estufa utilizada para cultura.

A concentração 0,5x de SG evidencia adequadamente a parasitemia por citometria de fluxo e é capaz de detectar baixas concentrações do parasito

Duas amostras foram utilizadas para avaliar a capacidade de distinguir as células infectadas das não infectadas, por citometria de fluxo, utilizando diferentes concentrações de SYBR Green. Neste ensaio, utilizando o gráficos de pontos (Figura 1), observou-se que a concentração de 0,5x a distinção entre estas populações ficou mais clara uma vez que os eventos positivos ficaram mais bem evidenciados na *gate*, sendo possível quantificar a parasitemia sem haver perda dos eventos positivos, diferente das demais concentrações. Além disso, a segmentação das populações entre positiva e negativa fica ainda mais evidente e a *gate* melhor delimitada na amostra enriquecida por Percoll 70% (Figura 2).

Não obstante, nos ensaios de diluição de parasitemia, a concentração de 0,5x foi capaz de evidenciar os eventos positivos mesmo nas maiores diluições, ou seja, menores densidades de parasitos, demonstrando a especificidade e sensibilidade de detecção de parasitos corados pela CF e desta maneira a linearidade da queda na parasitemia ao longo da diluição com eritrócitos não infectados (Figura 3).

Sendo, desta maneira, esta concentração validada e escolhida para dar prosseguimento aos ensaios de avaliação de atividade antimalárica.

A dupla marcação nas concentrações de SG 0,5x e DHE 5 ug/ml detectou melhor a gate de parasitas nos ensaios de padronização

Os ensaios de maturação não levam em conta a percentagem de células positivas, mas sim a percentagem de parasitas que sofreram a maturação, ou seja, em que houve aumento no número de núcleos, levando, portanto, a uma maior quantidade de DNA que por conseguinte leva a maior absorção de corantes e assim, aumento da intensidade de fluorescência. A marcação com SG mostrou-se eficiente em diferenciar as células positivas das não infectadas, no entanto não há clara distinção de subpopulações (jovens e maduras) dentro dos eventos positivos. Para isso tem sido proposto o uso de dupla marcação com SG E DHE ⁽⁵⁾.

Como é possível observar na Figura 4, usando a dupla marcação há uma segmentação das populações duplo positivas e pode-se delimitar no gráfico de pontos duas *gates*, sendo uma de parasitas no estágio de trofozoítos e outra dos esquizontes, que corresponde ao grupo de eventos com os níveis mais altos de DNA (SG, eixo *y* / (DHE, eixo *x*).

A marcação simples e dupla com corantes de DNA fluorescentes de isolados de P. vivax levam a resultados similares de IC₅₀ na metodologia de CF.

Seis isolados foram utilizados para determinar e comparar a IC₅₀ de diferentes drogas antimaláricas por CF utilizando a marcação simples (SG) e dupla (SG e DHE) com corantes de DNA. Os dados de IC₅₀ mostraram-se similares para as drogas avaliadas utilizando a marcação simples ou dupla, tanto nas amostras enriquecidas por Percoll quanto naquelas não enriquecidas (Figura 5). Desta maneira, pode-se demonstrar que após a determinação da *gate* de esquizontes, a marcação simples é capaz de

determinar a percentagem de maturação de parasitas podendo ser suficiente para a determinação de IC₅₀.

A determinação de susceptibilidade de P. vivax às drogas antimaláricas por citometria de fluxo é similar à da microscopia óptica

A fim de avaliar se a citometria de fluxo pode ser utilizada para determinar a susceptibilidade de isolados de *P. vivax* às drogas antimaláricas, calculamos a IC₅₀ de quatro drogas antimaláricas em seis isolados utilizando as técnicas de citometria de fluxo por simples e dupla marcação e de microscopia óptica, em amostras enriquecidas ou não (Table 1). Ao comparar estas técnicas, não foram observadas diferenças entre todas as condições e antimaláricos testados, e portanto, as técnicas têm resultados similares (Figura 6). Nas análises de Bland-Altman também foi possível observar boa concordância entre os métodos (figuras 7,8,9 e 10).

DISCUSSION

A ausência de uma cultura a longo prazo de *P. vivax*, tem limitado o estudo desta espécie que vem tornando-se prevalente em áreas onde as medidas de controle parecem eficazes para a malária falciparum ⁽¹⁸⁾. A avaliação da susceptibilidade de *P. vivax* aos medicamentos hoje disponíveis baseiam-se em dados clínicos havendo poucos estudos de susceptibilidade *ex vivo*, que poderiam antecipar a detecção da perda de eficácia dos medicamentos ⁽³⁾. Isto deve-se em grande parte pelo fato de que estes ensaios *ex vivo* são bastante laboriosos e necessitam de técnicos treinados para avaliação por MO ⁽¹⁵⁾.

Apesar de ser o padrão ouro para avaliação da sensibilidade *ex vivo*, a literatura ressalta a subjetividade dos resultados da MO ^(3,15). A quantificação baseada nesta técnica requer preparação de gota espessa de cada poço das diferentes condições de droga ou não, secagem das gotas, coloração Giemsa, seguida de leitura em microscópio óptico. Considerando o tempo de preparação e análise das duas técnicas, fica evidente a vantagem da CF, que pode ser concluída logo após o término do cultivo com simples preparo de coloração e aquisição em citômetro de fluxo. Há ainda que se considerar o volume de amostra para análise, que no caso da CF necessita de bem menos material.

A utilização da quantificação baseada em CF traz uma automatização importante do processamento de amostras de ensaios de sensibilidade. Uma análise comparativa do método de coloração única com SG e o de coloração dupla com SG mais DHE foi realizada de acordo com a literatura anterior ⁽⁵⁾, e os achados aqui corroboram com este trabalho. Os resultados em ambas as condições foram comparáveis e parecem adequados para avaliar a susceptibilidade do parasito aos medicamentos antimaláricos. Destaca-se portanto, as vantagens do uso de coloração única com SG, de forma que

não há necessidade de executar controles de coloração única em cada experimento para compensar a sobreposição espectral que ocorre quando métodos de coloração dupla usam corantes fluorescentes com espectros próximos de excitação / emissão, como é aplicado para SG e DHE. Portanto, a simples marcação facilita muito a análise de dados brutos de FC, além do seu custo benefício.

Um aspecto importante observado neste trabalho, foi que nos testes com leitura por CF, quando houve contaminação de isolados durante o cultivo, esta técnica foi sensível para detectar mesmo em casos bem discretos, que poderiam não ser detectados por microscopia óptica e gerar um dado não condizente com a ação do antimalárico testado.

Entretanto, é importante mencionar outra limitação dos ensaios *ex vivo*: as baixas parasitemias das amostras coletadas levam a uma demanda maior de tempo de leitura das lâminas e perda da sensibilidade do ensaio. Devido a isto, neste trabalho optou-se por realizar o enriquecimento da parasitemia por Percoll 70%, de metade de cada amostra coletada, considerando que as baixas parasitemias são um entrave para o seguimento dos testes. Ficou evidente que não houve diferença na susceptibilidade do parasito aos antimaláricos, em amostras enriquecidas frente às não enriquecidas (Figura 7), e, portanto, não parece haver uma seleção de parasitas de estádios distintos da amostra inicial por este processamento que pudesse interferir no ensaio antimalárico. Importante ressaltar que em amostras enriquecidas, a leitura da gota espessa se deu de forma muito mais rápida, devido à quantidade de parasitos por campo, o que otimizou o tempo de leitura total dos ensaios.

Para as análises dos resultados, após obtenção das IC_{50} , fez-se a exclusão dos *outliers* nos resultados da MQ e ATV, pois esses fugiam da normalidade e poderiam causar anomalias nas análises posteriores. O critério de exclusão foi valores de IC_{50} maiores que a maior concentração testada, 3000nM e 60nM, respectivamente.

Destacamos ainda que o baixo número de isolados utilizados nos ensaios deve-se à dificuldade de selecionar amostras com mais de 40% de anéis, sendo este um limitante para o estudo, pois para os ensaios de sensibilidade por maturação de esquizontes, este é um fator indispensável. Tivemos um total de 72 amostras coletadas. Destas 17 (23,6%) tinham a quantidade mínima necessária de anéis.

Mais ensaios são necessários para que se tenha uma análise mais robusta dos resultados.

CONCLUSION

Os resultados mostraram uma boa correlação entre a microscopia óptica e citometria de fluxo, sugerindo que esta parece ser uma boa ferramenta para ensaio de sensibilidade. São necessários mais ensaios para uma análise mais robusta.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para o desenvolvimento da pesquisa e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo durante os 24 meses de realização do projeto. Agradecemos também a todos os pacientes e funcionários da Fundação de Medicina Tropical que contribuíram com este estudo.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MF wrote the original draft and performed project administration, all methodologies, and formal data analyses. YOC supported the methodology and analysis of flow cytometry and data analysis. CF was responsible for reviewing and editing the final manuscript and data analysis. PAN supported the flow cytometry methodology. FTMC supported the acquisition of financing. SCPL was responsible for supervision, project administration, formal analysis, data curation, validation and review and editing of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2020. Geneva: WHO press; 2020.
2. Muller O. Challenges for control and elimination in the 21st century. *Malaria Afri.* 2011;60:193
3. Russell B, Suwanarusk R, Malleret B, Costa FT, Snounou G, Kevin Baird J, Nosten F, Renia L. 2012. Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: the best way forward. *Int J Parasitol* 42:1063–1070. doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.010.
4. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WA, Jordon RG, Duong S, Muth S, Sismadi P, Bangs MJ, Prescott WR, Baird JK, Wongsrichanalai C. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. *Malar J.* 2006 Oct 25; 5():92.
5. Russell, B. et al. Field-based flow cytometry for ex vivo characterization of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* antimalarial sensitivity. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n. 10, p. 5170-4, Oct 2013. ISSN 1098-6596.
- 6- Saul A, Myler P, Mangan T, Kidson C *Plasmodium falciparum*: automated assay of erythrocyte invasion using flow cytometry. *Exp Parasitol.* 1982 Aug; 54(1):64-71
7. Malleret B, Claser C, Ong AS, Suwanarusk R, Sriprawat K, Howland SW, Russell B, Nosten F, Rénia L A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development *Sci Rep.* 2011; 1():118
8. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WA, Jordon RG, Duong S, Muth S, Sismadi P, Bangs MJ, Prescott WR, Baird JK, Wongsrichanalai C. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching,

testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency *Malar J*. 2006 Oct 25; 5():92.

9. Malaria treatment guide in Brazil / Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance, Department of Immunization and Communicable Diseases. – Brasília: Ministry of Health, 2020.

10. Basco et al. In Vitro Activity of Pyrimethamine, Cycloguanil, and Other Antimalarial Drugs Against African Isolates and Clones of *Plasmodium falciparum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1994; 50(2):193-9.

11. Rebelo, M., Tempera, C., Fernandes, J.F. et al. Assessing anti-malarial drug effects ex vivo using the haemozoin detection assay. *Malar J* 14, 140 (2015).

12. Kwansa-Bentum et al. *Plasmodium falciparum* isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. *Malaria Journal* 2011, 10:187

13. Khositnithikul et al, 2008. In vitro atovaquone/proguanil susceptibility and characterization of the cytochrome b gene of *Plasmodium falciparum* from different endemic regions of Thailand. *Malar J*. 2008; 7: 23.

14. Sriprawat K, Kaewpongsri S, Suwanarusk R, Leimanis ML, Lek-Uthai U, Phyto AP, Snounou G, Russell B, Renia L, Nosten F. Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *Plasmodium vivax* infected blood. *Malar J*. 2009 Jun 2; 8():115.

15. Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J Simple in vitro assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan; 47(1):170.

16. Russell B, Malleret B, Suwanarusk R, Anthony C, Kanlaya S, Lau YL, Woodrow CJ, Nosten F, Renia L Citometria de fluxo baseada em campo para caracterização ex vivo da sensibilidade antimalárica de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. Outubro de 2013; 57 (10): 5170-4.
17. Bland JM, Altman DG *Lanceta* Métodos estatísticos para avaliar a concordância entre dois métodos de medição clínica. 8 de fevereiro de 1986; 1 (8476): 307-10.
18. A research schedule to underpin malaria eradication. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodríguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M *PLoS Med*. 2011 Jan 25; 8(1):e1000406.
19. Russell B, Chalfain F, Prasetyorini B, Kenangalem E, Piera K, Suwanarusk R, et al. Determinants of in vitro drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1040–5.

Table 1. Ensaio de inibição em *P. vivax* e *P. falciparum*

Drug	IC ₅₀ (nM) of <i>P.vivax</i> (MO)		IC ₅₀ (nM) of <i>P.vivax</i> (CF) SG + DHE		IC ₅₀ (nM) of <i>P.vivax</i> (CF) SG		IC ₅₀ (nM) of <i>P.falciparum</i> cepa 3D7 (CF) DHE
	E	SE	E	SE	E	SE	
CQ	52,23 ± 11,43	44,99 ± 22,21	65,48 ± 39,97	7,89 ± 8,18	59,38 ± 32,57	44,49 ± 56,34	145,3 ± 2,68
MQ	80,23 ± 94,53	52,97 ± 35,07	57,20 ± 33,01	61,93 ± 44,07	29,89 ± 26,29	49,45 ± 61,59	112 ± 2,12
ART	4,56 ± 4,58	2,09 ± 1,03	2,49 ± 1,56	1,04 ± 0,56	5,89 ± 5,39	8,44 ± 14,75	2,2 ± 0,33
ATV	14,97 ± 9,14	11,30 ± 8,34	13,32 ± 11,52	10,20 ± 9,26	2,05 ± 1,85	6,68 ± 7,70	2,56 ± 0,39

Média da IC₅₀ de cada antimalárico testado e desvio padrão, na condição de enriquecimento ou não, em 6 isolados independentes. A média da IC₅₀ em *P. falciparum* foi calculada a partir de 2 isolados testados. E: Enriquecido; SE: Sem enriquecimento; MO: Microscopia óptica; CF: Citometria de fluxo; SG: SYBR Green; DHE: Dihidroetídeo;

FIGURE AND LEGENDS

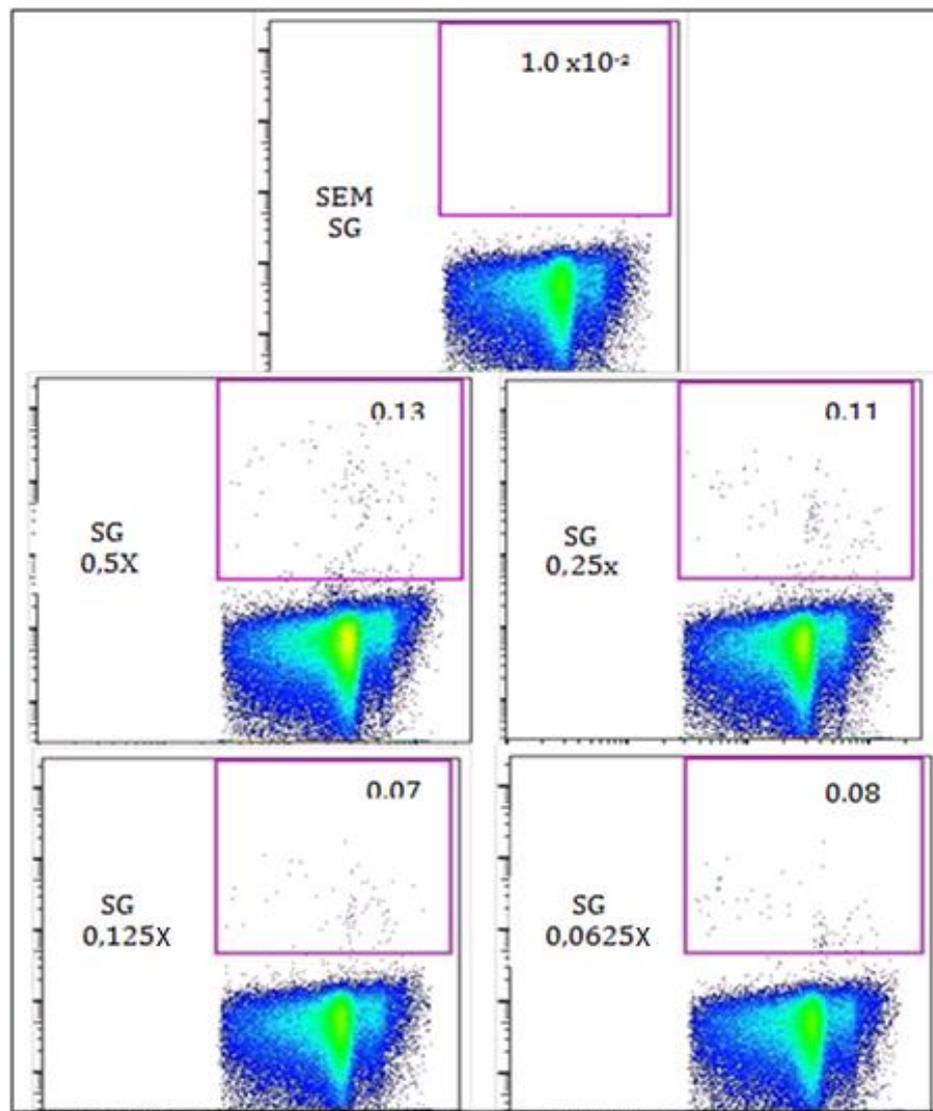


Figura 1: Comparação da distinção de células infectadas ou não em amostras de *P. vivax* não enriquecidas por Percoll 70%, em diferentes concentrações de corante SYBR Green. As hemácias individuais foram analisadas em Gráfico de pontos SSC-H / SYBR Green, em amostra não enriquecida. A gate de hemácias infectadas está indicada na imagem e o número dentro de cada uma representa a porcentagem da parasitemia. A concentração de SG a 0,5x foi a selecionada para os ensaios de sensibilidade a antimaláricos pela melhor detecção das células parasitadas. SG: SYBR Green.

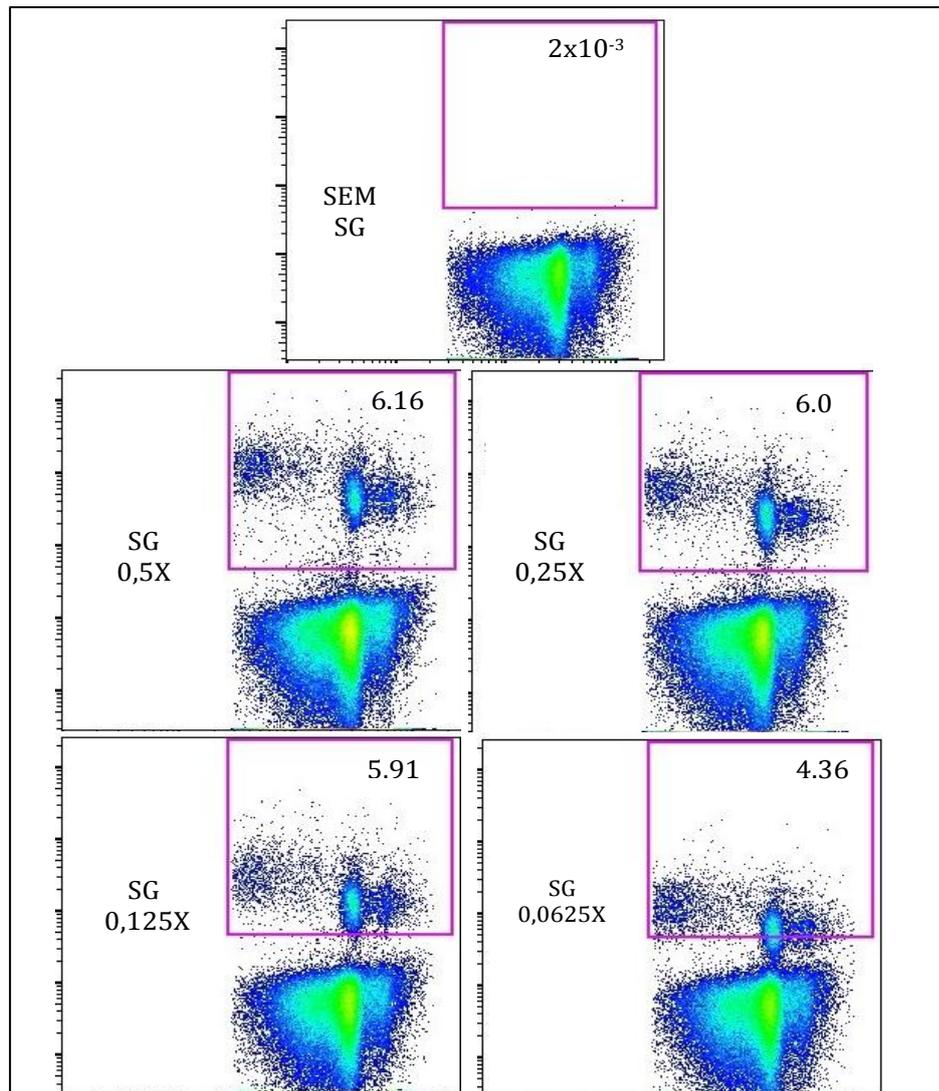


Figura 2: Comparação da distinção de células infectadas ou não em amostras de *P. vivax* enriquecidas por Percoll 70%, em diferentes concentrações de corante SYBR Green. As hemácias individuais foram analisadas em Gráfico de pontos SSC-H / SYBR Green, em amostra enriquecida. A gate de hemácias infectadas está indicada na imagem e o número dentro de cada uma representa a porcentagem da parasitemia. A concentração de SG a 0,5x foi a selecionada para os ensaios de sensibilidade a antimaláricos pela melhor detecção das células parasitadas. SG: SYBR Green.

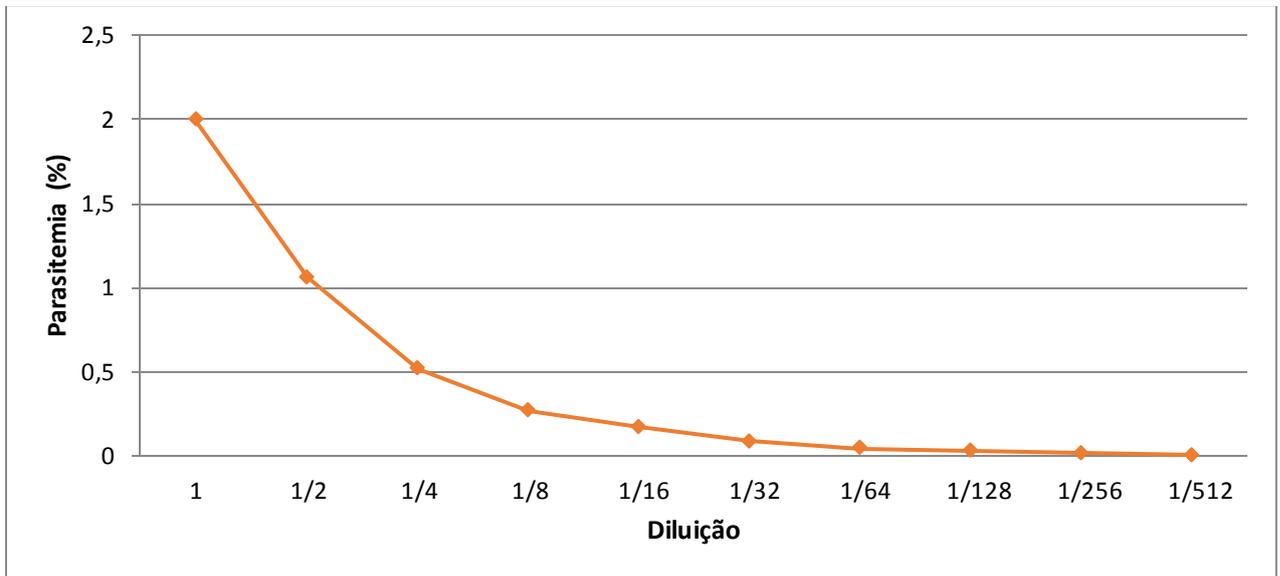


Figura 3. Curva decrescente de parasitemia de amostras de *P. vivax* diluída serialmente com hemácias não infectadas determinada por citometria de fluxo. Cada ponto no gráfico de linhas demonstra uma concentração de parasita em diluição seriada, em um isolado de *P. vivax* enriquecido, após 24h de cultivo. A concentração de corante SYBR Green utilizada foi 0,5x.

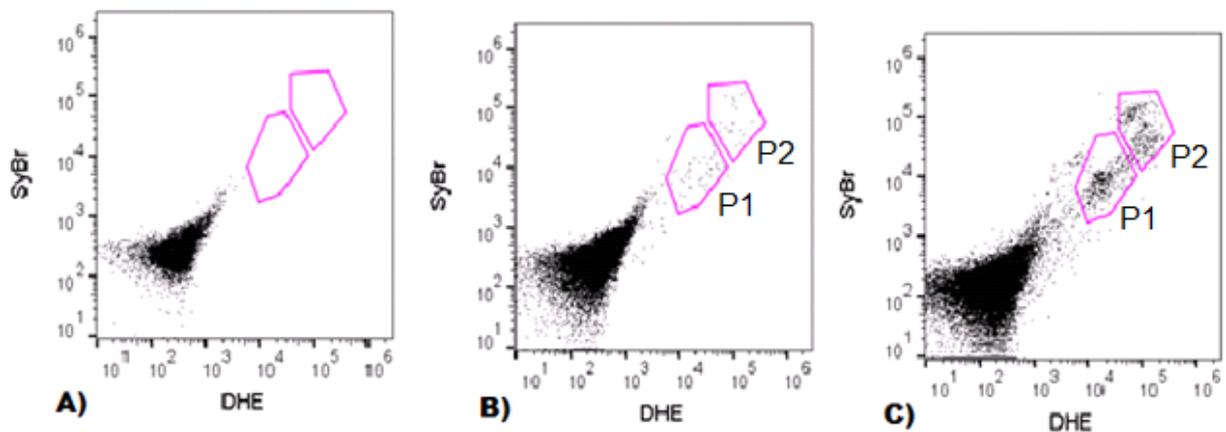


Figura 4. Resultados representativos da estratégia de detecção da gate de esquizontes, em gráfico de pontos por citometria de fluxo. O isolado de *P. vivax* foi marcado com SG e DHE (0,5x e 5ug/ml). A gate que representa os eventos de esquizontes é indicada em cada gráfico, em P2. P1: Trofozoítos; A) Amostra negativa B) Amostra positiva sem enriquecimento; C) Amostra positiva enriquecida.

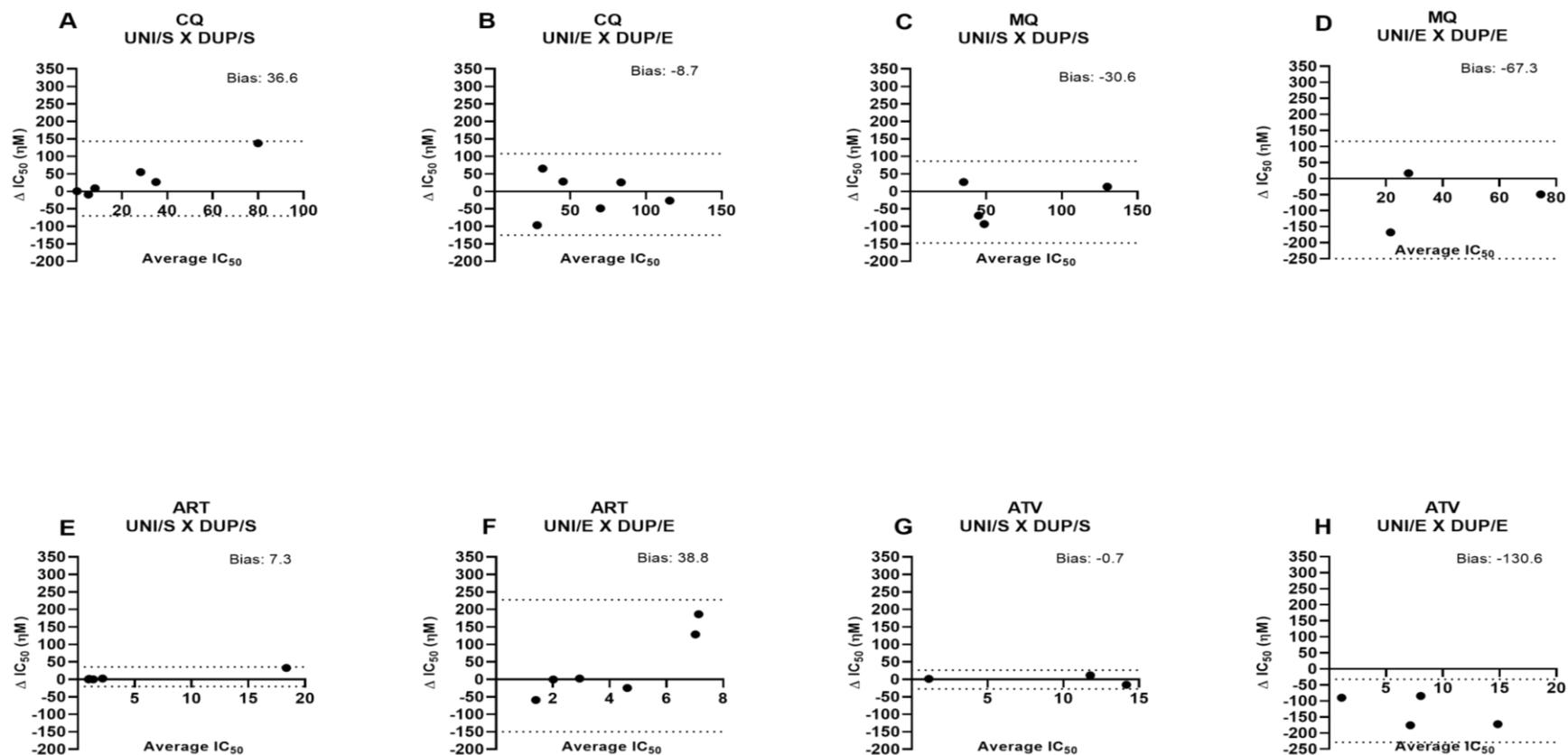


Figura 5 – Correlação entre a sensibilidade detectada por simples e dupla marcação de corantes fluorescentes para citometria de fluxo, em amostras enriquecidas ou não, através da análise de Bland-Altman. Os seis pontos em cada gráfico representam a IC_{50} obtida em cada isolado nos ensaios de sensibilidade de *P. vivax* aos antimaláricos testados. A e B: Cloroquina; C e D: Mefloquina; E e F: Artesunato; G e H: Atovaquona. As linhas pontilhadas representam os limites de 95 % de concordância superior e inferior. Bias: Diferença média; UNI: Simples marcação com SG; DUP: dupla marcação com SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E: Enriquecido. A análise mostrou não haver diferença em entre os grupos avaliados, para todos os antimaláricos testados.

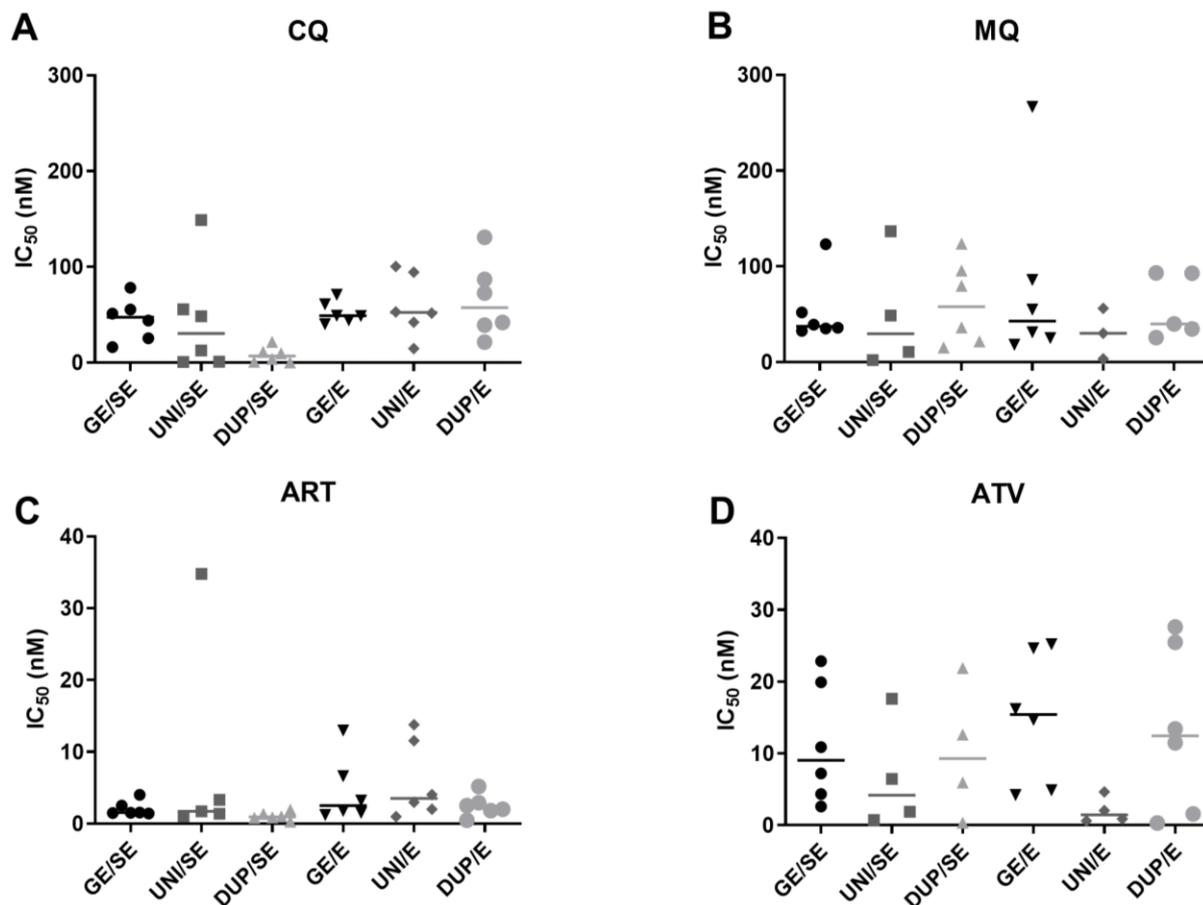


Figura 6. Comparação entre as diversas condições de microscopia óptica e citometria de fluxo. Os gráficos estão expressos em resultados individuais (pontos) e medianas (traço) das IC₅₀ de cada antimalárico testado. Os grupos foram comparados usando teste ANOVA ou Kruskal-Wallis. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$ para todos os testes. Não houve diferença em nenhum dos grupos, em todos os antimaláricos e condições testadas. GE: Gota Espessa; UNI: Simples marcação com SG; DUP: dupla marcação com SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E:Enriquecido. CQ: Cloroquina; MQ: Mefloquina; ART: Artesunato; ATV: Atovaquona.

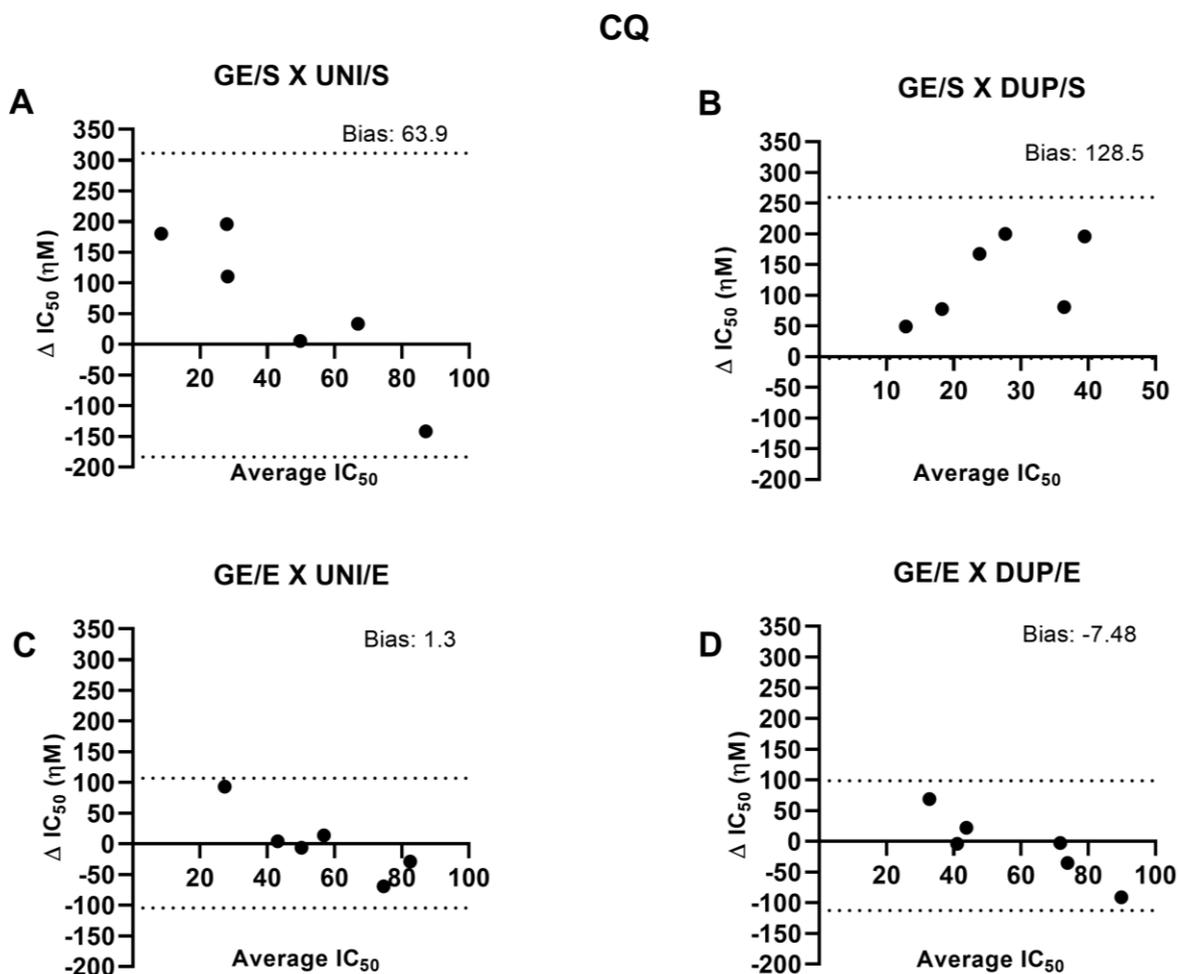


Figura 7 - Concordância entre os métodos de quantificação, em amostras enriquecidas ou não, avaliadas pela análise de Bland-Altman. Cada ponto no gráfico representa os dados derivados da IC_{50} de seis isolados, testados quanto à sensibilidade à Cloroquina (CQ) em *P. vivax*, comparando a Citometria de Fluxo com a microscopia óptica. As linhas pontilhadas representam os limites de 95 % de concordância superior e inferior. Bias: diferença média; GE: Gota Espessa; UNI: Marcado somente com SG; DUP: SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E: Enriquecido.

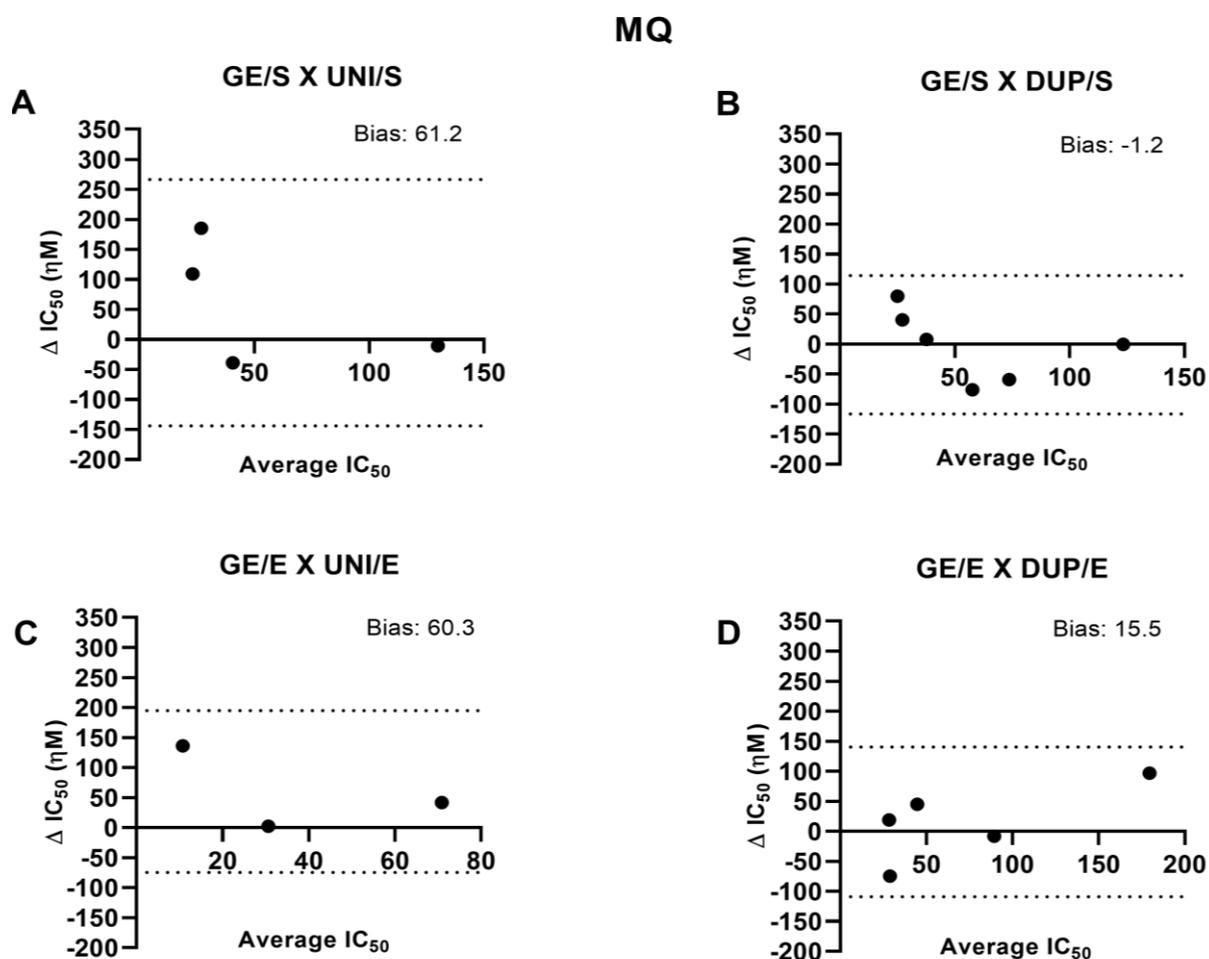


Figura 8 - Concordância entre os métodos de quantificação, em amostras enriquecidas ou não, avaliadas pela análise de Bland-Altman. Cada ponto no gráfico representa os dados derivados da IC_{50} de seis isolados, testados quanto à sensibilidade à Mefloquina (MQ) em *P. vivax*, comparando a Citometria de Fluxo com a microscopia óptica. As linhas pontilhadas representam os limites de 95 % de concordância superior e inferior. Bias: Diferença média; GE: Gota Espessa; UNI: Marcado somente com SG; DUP: SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E: Enriquecido.

ART

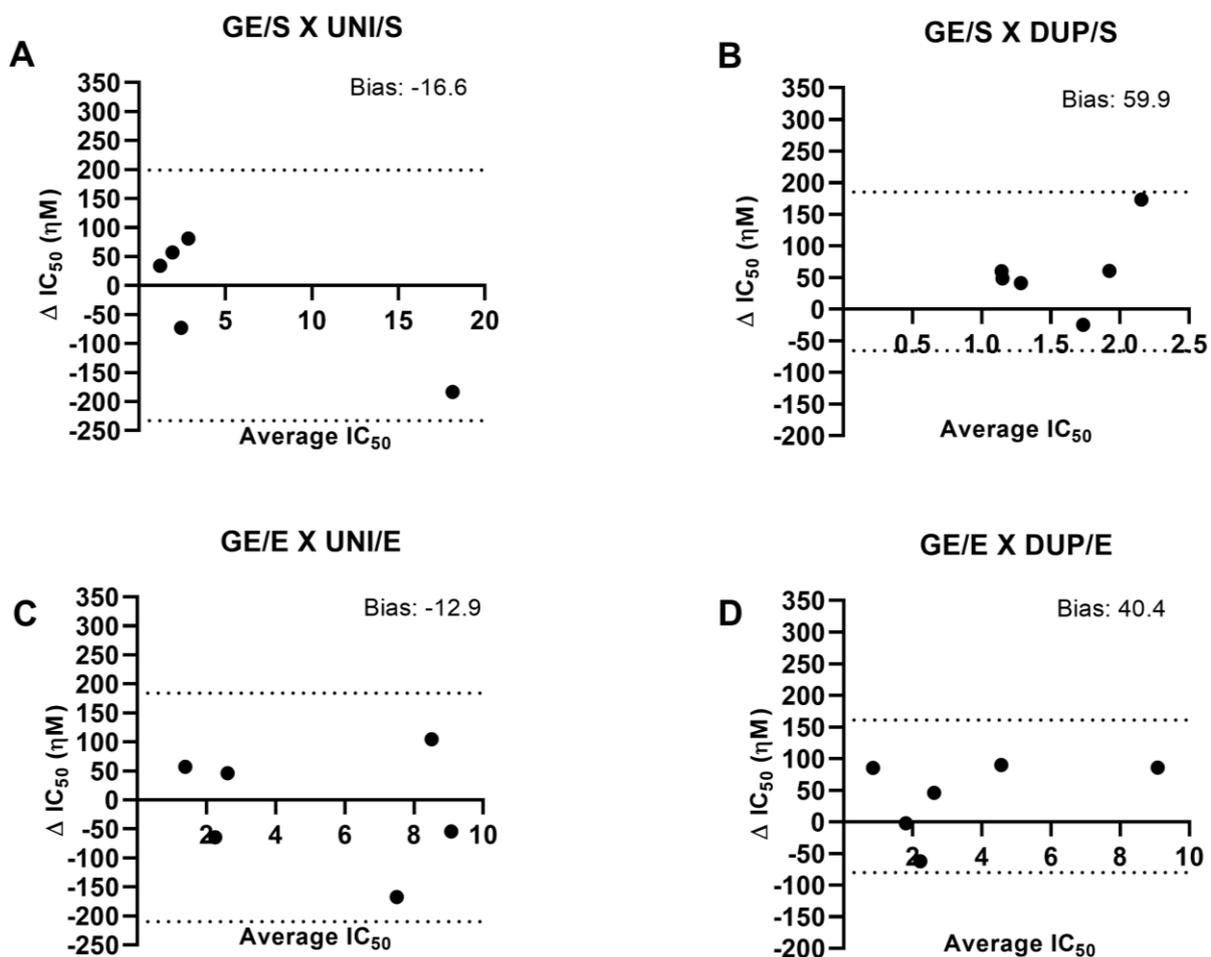


Figura 9 - Concordância entre os métodos de quantificação, em amostras enriquecidas ou não, avaliadas pela análise de Bland-Altman. Cada ponto no gráfico representa os dados derivados da IC_{50} de seis isolados, testados quanto à sensibilidade ao Artesunato (ART) em *P. vivax*, comparando a Citometria de Fluxo com a microscopia óptica. As linhas pontilhadas representam os limites de 95 % de concordância superior e inferior. Bias: Diferença média; GE: Gota Espessa; UNI: Marcado somente com SG; DUP: SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E: Enriquecido.

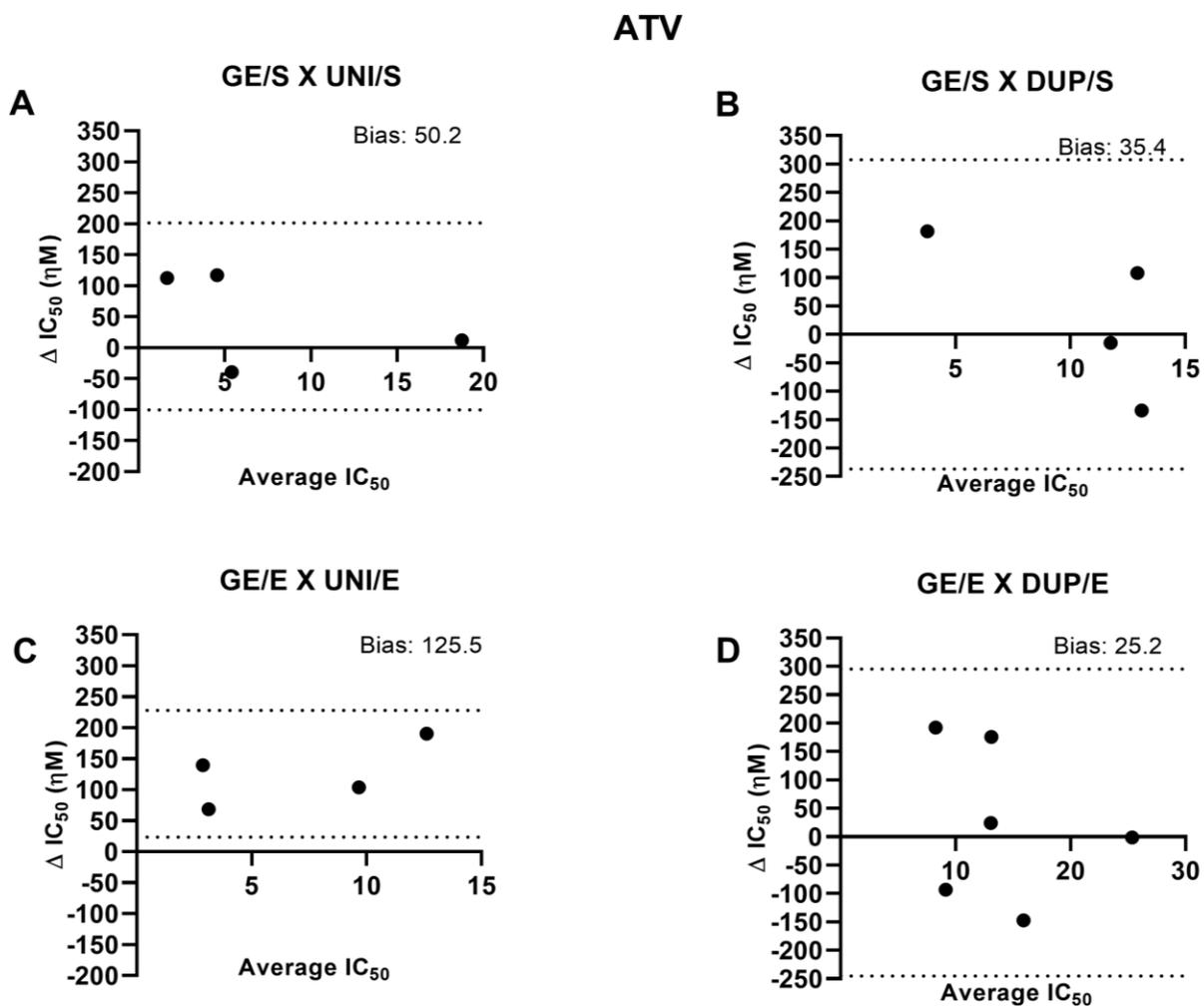


Figura 10 - Concordância entre os métodos de quantificação em amostras enriquecidas ou não, avaliadas pela análise de Bland-Altman. Cada ponto no gráfico representa os dados derivados da IC_{50} de seis isolados, testados quanto à sensibilidade à Atovaquona (ATV) em *P. vivax*, comparando a Citometria de Fluxo com a microscopia óptica. As linhas pontilhadas representam os limites de 95 % de concordância superior e inferior. Bias: Diferença média; GE: Gota Espessa; UNI: Marcado somente com SG; DUP: SG e DHE; SE: Sem enriquecimento; E: Enriquecido.

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

A dificuldade em obter amostras com mais de 40% de anéis foi um limitante, pois para os ensaios de sensibilidade por maturação de esquizontes, este é um fator indispensável. Desta forma, boa parte das amostras coletadas foi descartada por não ter este requisito mínimo.

Mais ensaios são planejados para que tenhamos uma análise mais robusta dos resultados. Uma alíquota de cada amostra foi devidamente criopreservada em nitrogênio líquido e planejamos descongelar para fazer os mesmos testes e comparar os resultados com a amostra fresca.

5 CONCLUSÃO

- Os isolados de *Plasmodium vivax* foram sensíveis frente aos antimaláricos selecionados para teste;

- Houve correlação entre os resultados da IC₅₀ analisados por microscopia óptica e citometria de fluxo, sugerindo que esta última parece ser uma boa ferramenta para otimizar os ensaios de sensibilidade a antimaláricos;

- O método baseado em simples marcação com SG produziu resultados comparáveis à dupla marcação, mostrando ser suficiente para condução das análises de ensaio de sensibilidade em *Plasmodium vivax*;

- O enriquecimento por Percoll 70% mostrou-se vantajoso quanto ao aumento da parasitemia, sem prejuízo na condução dos ensaios.

São necessários mais ensaios para uma análise mais robusta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2020. Geneva: WHO press; 2020.
2. Bartoloni A, Zammarchi L (2012) Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 4 (1):e2012026.
3. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673-9.
4. Brazil. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Communicable Disease Surveillance Department. Health Surveillance Guide. (2019).
5. Sidjanski S.; Vanderberg J.P. Delayed migration of Plasmodiums porozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **57**: 426-429.
6. Baer K, Roosevelt M, Clarkson AB Jr., Van Rooijen N, Schnieder T, Frevert U. 2007. Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* 9: 397–412.
7. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, Ménard R, Amino R. 2013. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med* 210: 905–915.
8. Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for plasmodium sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem*. 2001;276(29):26784-91.
9. Pradel G, Garapaty S, Frevert U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol*. 2002;45(3):637-51.
10. Sturm A, Heussler V. Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med Microbiol Immunol*. 2007;196 (3):127-33.
11. Markus MB. Malaria: origin of the term "hypnozoite". *J Hist Biol*. 2011;44(4):781-6.
12. Chen L, Xu Y, Wong W, Thompson JK, Healer J, Goddard-Borger ED, et al. Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to Plasmodium falciparum protein CyRPA. *Elife*. 2017;6

13. Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol.* 2004;34(13-14):1413-29.
14. Josling GA, Llinas M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(9):573-87.
15. Contreras-Ochoa C, Ramsey JM. [*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocyte stages are neglected in vaccine development]. *Salud Publica Mex.* 2004;46(1):64-70.
16. Ashley, E.; Mcgready, R; Proux, S; Nosten, F. Malaria. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v.4, p.159-173, 2006.
17. Sinden RE, Butcher GA, Billker O, Fleck SL. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol.* 1996;38:53-117.
18. Paul RE, Brey PT, Robert V. *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends Parasitol.* 2002;18(1):32-8.
19. Kumar S, Bhardwaj TR, Prasad DN. Drug targets for resistant malaria: Historic to future perspectives. *Singh RK Biomed Pharmacother.* 2018 Aug; 104():8-27.
20. J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Current perspectives on the mechanism of action of artemisinin. *Golenser Grau GE Int J Parasitol.* 2006 Dec; 36(14):1427-41.
21. Alam A, Goyal M, Iqbal MS, Pal C, Dey S, Bindu S, Maity P, Novel antimalarial drug targets: hope for new antimalarial drugs. *Bandyopadhyay U Expert Rev Clin Pharmacol.* 2009 Sep; 2(5):469-89.
22. Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaia AP, Fortes F, Goldman I, Lucchi N, Stennies G, MacArthur JR, Udhayakumar V. Efficacy of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uíge Provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan; 59(1): 437-43.
23. New WHO guidelines for the treatment of malaria. *Reyburn HBMJ.* 2010 May 28; 340():c2637.
24. Paget-McNicol S, Saul A. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 2001 May; 122(Pt 5):497-505.

25. Muller O. Challenges for control and elimination in the 21st century. *Malaria Afri.* 2011;60:193
26. Das, S. et al. Association between prevalence of chloroquine resistance and unusual mutation in *pfmdr-1* and *pfprt* genes in India. *Am J Trop Med Hyg*, v. 88, n. 5, p. 828-34, May 2013. ISSN 1476-1645.
27. Gisely M, Wuelton, M. Expression Levels of *pvprt-o* and *pvmdr-1* Are Associated with Chloroquine Resistance and Severe *Plasmodium vivax* Malaria in Patients of the Brazilian Amazon. *Plos One*, v. 9, p. e105922, 2014.
28. John GK, Douglas NM, von Seidlein L, Nosten F, Baird JK, White NJ, Price RN *Malar J.* Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. 2012 Aug 17; 11():280.
29. Baird JK et al.. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jul; 22(3):508-34.
30. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 May-Jun; 42(3):267-78.
31. Fogh S, Jepsen S, Effersøe P *Trans R.* Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73(2):228-9.
32. Phillips EJ, Keystone JS, Kain KC. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. *Clin Infect Dis.* 1996 Nov; 23(5):1171-
33. Arias, A. E.; Corredor, A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. *Trop Med Parasitol*, v. 40, n. 1, p. 21-3, Mar 1989. ISSN 0177-2392.
34. Garavelli, P. L.; Corti, E. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*: the first case in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 86, n. 2, p. 128, 1992 Mar-Apr 1992.
35. White NJ. Counter perspective: Artemisinin resistance: facts, fears, and fables..*Am J Trop Med Hyg.* 2012 Nov; 87(5):785.
36. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J.* 2011 Sep 13; 10():263.

37. Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck HP Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. *Malar J.* 2006 Dec 19; 5():126.
38. GEN *Plasmodium falciparum* Community Project Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. *Malaria. Elife.* 2016 Mar 4; 5():
39. Vestergaard LS, Ringwald P Am J Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Trop Med Hyg.* 2007 Dec; 77(6 Suppl):153-9.
40. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodríguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M Organization WH. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. 2009.
41. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.* 2011 Jan 25; 8(1):e1000406.
42. Russell B, Suwanarusk R, Malleret B, Costa FT, Snounou G, Kevin Baird J, Nosten F, Renia L. 2012. Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: the best way forward. *Int J Parasitol* 42:1063–1070. doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.010.
- 43 - KOSAISAVEE, V. et al. *Plasmodium vivax*: isotopic, PicoGreen, and microscopic assays for measuring chloroquine sensitivity in fresh and cryopreserved isolates. *Exp Parasitol*, v. 114, n. 1, p. 34-9, Sep 2006. ISSN 0014-4894.
- 44- Marfurt, J., Chalfein, F., Prayoga, P., Wabiser, F., Kenangalem, E., Piera, K.A., Machunter, B., Tjitra, E., Anstey, N.M., Price, R.N., 2011. Ex vivo drug susceptibility of ferroquine against chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4461– 4464.
45. Russell BM, Udomsangpetch R, Rieckmann KH, Kotecka BM, Coleman RE, Sattabongkot J Simple in vitro assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan; 47(1):170-3.
46. Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung . *Centralblatt für Bakteriologie Giemsa G.* Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der **37** , 308–311 (1904).

47. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WA, Jordon RG, Duong S, Muth S, Sismadi P, Bangs MJ, Prescott WR, Baird JK, Wongsrichanalai C. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. *Malar J.* 2006 Oct 25; 5():92.
48. Russell, B. et al. Field-based flow cytometry for ex vivo characterization of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* antimalarial sensitivity. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n. 10, p. 5170-4, Oct 2013. ISSN 1098-6596.
49. Saul A, Myler P, Mangan T, Kidson C *Plasmodium falciparum*: automated assay of erythrocyte invasion using flow cytofluorometry. *Exp Parasitol.* 1982 Aug; 54(1):64-71.
50. Malleret B, Claser C, Ong AS, Suwanarusk R, Sriprawat K, Howland SW, Russell B, Nosten F, Rénia L A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development *Sci Rep.* 2011; 1():118.
51. Russell B, Malleret B, Suwanarusk R, Anthony C, Kanlaya S, Lau YL, Woodrow CJ, Nosten F, Renia L Citometria de fluxo baseada em campo para caracterização ex vivo da sensibilidade antimalárica de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* Outubro de 2013; 57 (10): 5170-4.
- 52 - Malaria treatment guide in Brazil / Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance, Department of Immunization and Communicable Diseases. – Brasília: Ministry of Health, 2020.

7 ANEXOS E APÊNDICES

7.1 Procedimentos operacionais padrão utilizados na dissertação

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

Código POP	POP_IPCCB_LAB_	Versão 02	
Título	Procedimento operacional padrão para preparação de meios de cultura: RPMI, IMDM, meio completo para <i>P. vivax</i> , meio completo para <i>P. falciparum</i>		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Glenda Q. Ramos	Revisado por: Camila Fabbri	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas
Camila Fabbri	2	Alterações no procedimento, adição de referências, mudança para o novo modelo de POP

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de preparo dos meios de cultura utilizados no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a produção de meios de cultura no IPCCB.

3. DEFINIÇÕES

Meios de Cultura: Os meios de culturas são preparações químicas geralmente usadas para a realização de análises laboratoriais, que possuem na sua fórmula nutrientes entre outras substâncias que provém as condições necessárias para que

os microrganismos inoculados se multipliquem em um meio artificial, para entre outras funções, o seu estudo e análise.

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM): Em 1976, Guilbert e Iscove demonstraram que células precursoras de eritrócitos e macrófagos podiam ser cultivadas em meio com soro reduzido suplementado com albumina, transferrina, lecitina e selênio. O Meio Iscove é uma variação do Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo selênio, aminoácidos adicionais, vitaminas, piruvato de sódio, tampão HEPES e nitrato de potássio em vez de nitrato férrico.

Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI): O meio RPMI foi originalmente desenvolvido para cultivar células leucêmicas humanas em suspensão e como uma monocamada. Tem sido considerado adequado para uma variedade de células de mamíferos, incluindo HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC, astrócitos e carcinomas.

Meio completo *P. vivax*: adição de soro inativado AB para cultivo de formas assexuadas e sexuadas

Meio completo *P. falciparum*: adição de plasma A+ para cultivo de formas assexuadas e sexuadas

4. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Materiais

- a) Copo Becker em vidro 1000 mL;
- b) Espátula;
- c) Bastão de vidro;
- d) Barras magnéticas (“peixinhos”);
- e) Garrafa de vidro estéril para armazenamento (estéril);

- f) Meio de cultura comerciais em pó;
- g) Filtro a vácuo estéril;
- h) Filtro de seringa a 0,22 μ M;
- i) Seringa de 10 mL.

6.2 Equipamentos

- a) Balança analítica;
- b) Agitador magnético;
- c) Bomba para filtração a vácuo.

6.3 Meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)*

- a) 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:
 - b) 3,024 g/ L de Bicarbonato de Sódio;
 - c) 3,024 g/L de Glicose;
 - d) 1 envelope de IMDM comercial.
- e) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro a vácuo e a bomba;
- f) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- g) Armazenar na geladeira (4°C).

6.4 Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (meio de lavagem 1x)

- a) Observar o rótulo do meio a ser preparado. Caso o meio de cultura em pó não contenha glicose e bicarbonato de sódio, pesar 2,4 g de glicose e 2,4 g de bicarbonato de sódio.

- b) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro a vácuo e a bomba;
- c) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- d) Armazenar na geladeira (4°C).

6.5 Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (meio para percoll 10x)

O RPMI 10x é utilizado para o protocolo de enriquecimento de parasitos pelo percoll a 45%. Não é necessário adicionar glicose ou bicarbonato de sódio, apenas prosseguir da seguinte forma:

- a) Em um Becker de 200 mL adicionar 100 mL de água destilada;
- b) Adicionar o meio de cultura em pó;
- e) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro para seringa de 0,22 µM;
- f) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- g) Armazenar na geladeira (4°C).

6.6 Preparação do meio do *P. vivax* completo

- a) Adicionar soro inativo humano AM no meio IMDM apenas quando for aliquoteado no falcon de 50ml (40ml de meio IMDM + 10 ml de soro inativado humano AB).
- b) Identificar e armazenar em geladeira 4°C

6.7 Preparação do meio do *P.falciparum* completo

- a) A cada 1L de RPMI, adicionar 50mg de hipoxantina;

- b) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar;
- c) Adicionar o plasma A+ apenas quando for aliqotado no falcon de 50ml (40ml de meio P.f + 10 ml de Plasma) para o cultivo.
- d) Identificar e armazenar em geladeira 4°C

7. REFERÊNCIAS

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

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

Código POP		Versão 02	
Título	Procedimento operacional padrão para confecção da coluna de celulose e filtração da amostra de <i>P. vivax</i>		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Macejane Ferreira de Souza	Revisado por: Camila Fabbri	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas
Camila Fabbri	2	Alterações no procedimento, adição de referências, mudança para o novo modelo de POP

8. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de confecção de coluna de celulose filtração da amostra de *P. vivax*, conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

9. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a confecção da coluna de celulose no IPCCB.

10. DEFINIÇÕES

Coluna de celulose: aparato confeccionado com o objetivo de filtrar as amostras de pacientes de *P. vivax* para remover os leucócitos. É confeccionado com a utilização de seringas de 10 mL, lã de vidro ou papel de filtro, acoplados em um tubo Falcon de 15 mL.

11. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

12. POP'S RELACIONADOS

POP – Meios de cultura

13. PROCEDIMENTOS

13.1 Materiais necessários:

- a) Seringa de 10 ml;
- b) Tubo Falcon de 15 ml;
- c) Fita adesiva;
- d) Lã de vidro ou papel de filtro cortado em quadro de 0,5 cm x 0,5 cm;
- e) Celulose Sigma;
- f) Pipeta de Pasteur;
- g) Suporte para tubos falcon;
- h) Meio de cultura RPMI 1x

13.2 Confecção da coluna:

- a) Colocar o tubo falcon em um suporte e retirar a tampa;
- b) Retirar a seringa da embalagem e remover o êmbolo;

- c) Conecta a seringa, com o orifício maior virado para cima ao tubo falcon utilizando uma fita adesiva;
- d) Colocar uma pequena quantidade de lã de vidro e cobrir superficialmente o orifício menor da seringa, com ajuda de uma pinça ou pipeta ou colocar o fragmento de papel filtro cortado com o auxílio da pinça ou pipeta;
- e) Caso seja utilizado o papel de filtro, rinsar com RPMI 1x para fixá-lo, antes de prosseguir;
- f) Colocar a celulose na seringa até atingir a marca de 2 ou 3 mL;
- g) Ligar o UV da câmara de fluxo e aguardar a descontaminação da coluna por 15 minutos.

13.3 Filtragem da amostra:

- a) Realizar a coleta de sangue de acordo com o POP – coleta de sangue. Armazenar o tubo a 36°C até o processamento da amostra;
- b) Centrifugar o sangue em 2000 RPM por 5 min a 36°C;
- c) Retirar o plasma e estocar (caso necessário);
- d) Lavar o pellet de sangue com RPMI 1x três vezes;
- e) Durante a última lavagem do pellet, também adicionar RPMI na coluna de celulose (duas pipetas);
- f) Aguardar sair todo o meio da celulose;
- g) Após a última lavagem, homogeneizar o pellet com em torno de 1,5 mL de meio RPMI 1x e colocar com cuidado sobre a celulose no início. Posteriormente, pode-se colocar com mais agilidade o restante da solução de contendo pellet + RPMI;
- h) Retirar o meio que gotejou antes de gotejar sangue;
- i) Quando passar todo o sangue, colocar meio RPMI até a boca da seringa;
- j) Após a passagem, centrifugar. (1500 RPM, 5 minutos);
- k) Lavar uma vez com RPMI e centrifugar;

14. REFERÊNCIAS

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

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

Código POP		Versão 01	
Título	Procedimento operacional padrão para a preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 70%		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Camila Fabbri	Revisado por: Rosa Amélia Santana	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

15. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 70% no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

16. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a realização do enriquecimento com Percoll a 70% no IPCCB.

17. DEFINIÇÕES

EPIs: Equipamentos de proteção individual

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

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

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

18. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

19. POP'S RELACIONADOS

5.1 Coleta de sangue;

5.2 Meios de cultura;

5.3 Coluna de celulose;

20. PROCEDIMENTOS

20.1 Materiais e Reagentes:

a) tubo falcon estéril de 15 mL

b) tubo falcon estéril de 50 mL

c) percoll,

d) PBS 10x

e) PBS 1x

f) água destilada filtrada com filtro de seringa de especificação 0,22 μM ;

g) filtros de seringa de 0,22 μM ;

h) pipeta estéril descartável pasteur.

20.2 Produção do PBS 10x

a) Diluir 1 tablet de PBS (sigma) em 20 mL de água filtrada dentro do fluxo laminar em um falcon de 50 mL;

b) Identificar, colocar a data de produção e armazenar em geladeira (4°C);

20.3 Produção do PBS 1x

c) Diluir 1 tablet de PBS (sigma) em 200 mL de água destilada;

d) Filtrar em de seringa de 0,22 μM ;

e) Aliquotar em tubos falcons de 50 mL;

f) Identificar, colocar a data de produção e armazenar em geladeira (4°C).

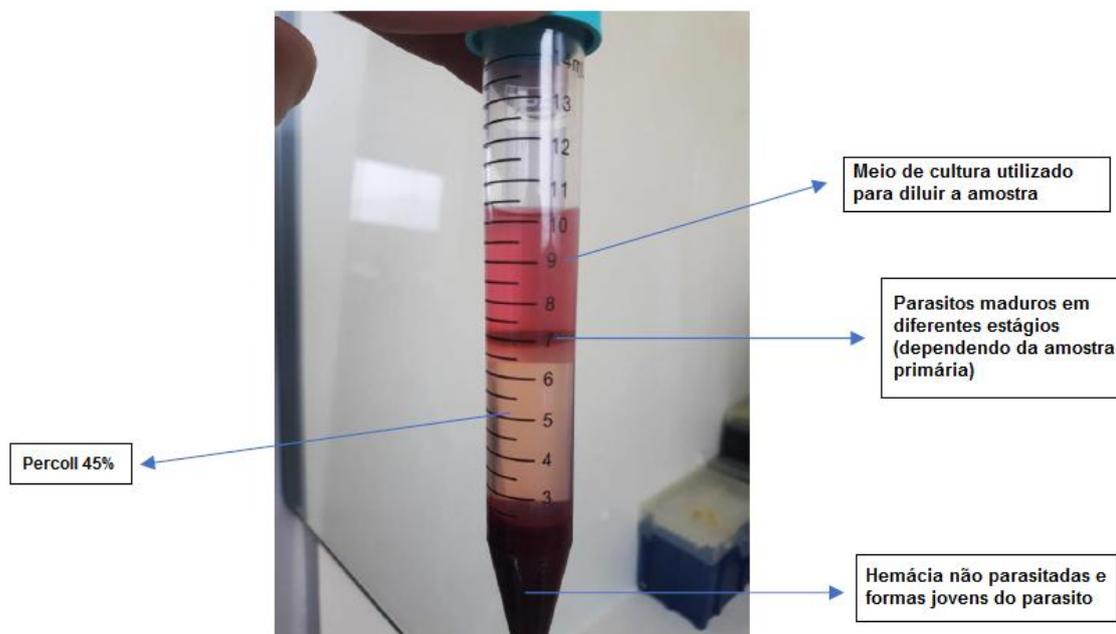
20.4 Diluição do percoll a 70%

a) Preparar percoll isotônico: 9 mL de percoll e 1 mL de PBS 10x;

b) Preparar percoll 70%: 7 partes de percoll isotônico e 3 partes de PBS 1x

20.5 Enriquecimento de amostra com percoll 70%

- a) Em posse da amostra a ser utilizada (cultura de gametócitos, cultura de oocinetos, amostra fresca proveniente da coluna de celulose, dentre outras) com objetivo de enriquecer utilizando o percoll 70%, diluir a amostra na proporção de 1:1 usando o meio RPMI 1X;
- b) Adicionar a amostra diluída vagorosamente no percoll 70% na proporção de 1:1. Ou seja, se há 5 mL de percoll 45% no falcon de 15 mL, apenas 5mL da amostra diluída deve ser adicionada. Esse processo deve ser realizado com o tubo falcon já contendo o percoll 45% inclinado em 45 graus e a amostra diluída sendo adicionada vagorosamente com auxílio de uma pipeta pasteur. Quando a primeira camada de amostra estiver formada sobre o percoll 45%, o tubo pode voltar a posição de 90 graus e o ritmo de adição da amostra pode ser acelerado;
- c) Centrifugar o tubo falcon por 15 min, 1500g (ou RCF), sem freio e sem aceleração;
- d) Após a centrifugação, deverá formar as seguintes camadas:



- e) Com atenção e uma pipeta pasteur estéril, retirar o anel de parasitas maduros e transferir para um falcon 15 mL limpo. Pode retirar também o meio

simultaneamente. Cautela para não gerar refluxo no momento que estiver sugando o anel, dessa forma, retirar aos poucos;

- f) Com o falcon de 15 mL contendo meio e o anel de parasitos maduros, centrifugar em 1500 RPM por 5 min. Irá formar um pellet bem pequeno no fundo do falcon;
- g) Lavar o pellet com RPMI 1x. Repetir o procedimento mais duas vezes;
- h) Após as lavagens, retirar o máximo do sobrenadante do pellet (de forma segura, com uma ponteira de 50 uL) e homogeneizar. Esse é o pellet de parasito maduros pronto para ser utilizado no próximo passo do objetivo final da amostra que está sendo processada.

21. REFERÊNCIAS

Boukema V, Li F, Chuquiyauri R, Abeles SR, Mcclean CM, Neyra V, et al. Lack of Molecular Correlates of Plasmodium vivax Ookinete Development. 2011;85(2):207–13.

Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in P. vivax malaria. Am J Trop Med Hyg. 2008;79(3):378–84.

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

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

Código POP	POP_IPCCB	Versão 01
Título	Fixação de drogas em placa para teste de suscetibilidade	

		<i>in vitro</i> em <i>Plasmodium</i> spp.	
Língua do Documento		Português	
Elaborado por: Camila Fabbri	Revisado por: Stefanie Lopes	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação: 14/04/2021

Nome	Versão	Alterações realizadas

22. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para a preparação da placa com as drogas selecionadas a fim de realizar o teste de suscetibilidade *in vitro* para *Plasmodium vivax* no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

23. CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratório de Cultura

24. DEFINIÇÕES

DMSO: Dimetilsulfóxido

25. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

5. POP'S RELACIONADOS

5.1 Coleta de sangue;

5.2 Meios de cultura;

5.3 Coluna de celulose;

6. PROCEDIMENTOS

Tabela 1. Características das drogas

DROGA	FORMULAÇÃO	PESO MOLECULAR	DILUENTE	TEMP DE ARMAZ (SOL ESTOQUE)	CONCENTRAÇÃO (INTERVALO – LITERATURA EM P. FALCIPARUM)
Mefloquina	Hydroclorido	414,8	Etanol a 70%	4°C	0,4 – 25,6 µM (WHO, 2001)
Cloroquina	Difosfato	515,9	Água deionizada	4°C	0,2 – 12,8 µM (WHO, 2001) 12,5 - 1.600 nM (Basco et al, 1994) 1,95 - 1000 nM (usado pelo grupo)
Pirimetamina	C ₁₂ H ₁₃ ClN ₄ (sal – cristal)	248,71	Etanol a 70%	4°C	0,1 nM – 242,9 nM (Randrianarivelosia et al, 2002) 0,0031 – 51,2 nM (Basco et al, 1994)
Atovaquona	C ₂₂ H ₁₉ ClO ₃ (sal – cristal)	366,8	DMSO	4°C	0,83 - 6,81 nM (Khositnithikul et al, 2008)
Artesunato	C ₁₉ H ₂₈ O ₈ (sal – cristal)	384,4	Etanol a 70%	4°C	0,9 - 60 nM (Rebelo et al, 2015) 0,38-1,08 nM (Kwansa-Bentum et al, 2011)

6.1 Reagentes:

a) Água deionizada;

- b) Drogas a serem testadas (ver tabela 1);
- c) Diluentes para as Drogas:
 - 6.3.1. DMSO;
 - 6.3.2. Etanol (EtOH);
 - 6.3.3 Metanol (MetOH) – (concentração de 50%).

6.2 Materiais e Equipamentos

- a) Centrífuga;
- b) Falcon 15 mL;
- c) Falcon de 50 mL;
- d) microtubos de 1,5 mL;
- e) Placas de 96 poços estéreis – fundo chato;
- f) Pipeta automática multicanal;
- g) Vortex;
- h) Balança analítica;
- i) Papel alumínio.

6.3 Preparação da placa

- a) Preparar a **solução estoque** da droga na concentração de 1mg/mL ou 0,5 mg/mL (a depender da droga – observar o anexo 1) no diluente apropriado. Para isso, atentar para a **Tabela 1**, que descreve os tipos de diluente para cada droga. Pesar 10 mg ou 5 mg da droga e diluir em 10 mL do diluente apropriado. **A solução pode ser armazenada por um mês se selada com parafilm em geladeira a 4°C;**
- b) Para fazer o cálculo da diluição para a concentração máxima da droga com a finalidade de obter a concentração final desejada na placa é necessário saber o volume de amostra que será pipetado. Dessa forma, é necessário calcular a concentração a ser utilizada com base na quantidade de amostra;

Exemplo:

Utilizando a cloroquina – maior concentração final: 3000 nM.

C1: ?

V1: 45 μL – volume da droga a ser colocado no poço

C2: 3000 nM – concentração final desejada

V2: 200 μL – volume de amostra a ser colocado no poço

$C1 = 3000 \times 200 / 45$, assim $C1 = 13333$ nM

Dessa forma, para obter a concentração final de 3000 nM no poço, adicionando 200 μL de amostra, é necessário diluir a cloroquina na concentração de 13333 nM.

c) Em seguida, fazer o cálculo para verificar quanto microlitros da solução estoque é necessária para obter a concentração maior da droga. Será pipetado 60 μL em um poço. Então, para ter uma margem de segurança, fazer o cálculo para 120 μL . Pensando em produzir 15 placas seriam $15 \times 120 \mu\text{L} = 1,8$ mL. Dessa forma, preparar 3 mL ao todo.

Exemplo:

Utilizando a cloroquina – maior concentração: 13333 nM.

V1: ?

C1: 1,94 mM = $1,94 \times 10^6$ nM

C2: 13333 nM – concentração final desejada

V2: 3000 μL – volume de diluente

$$V1 = 13333 \times 3000 / 1,94 \times 10^6$$

$$V1 = 20,64 \mu\text{L}$$

Dessa forma, para obter uma solução de 13333 nM de cloroquina, adicionar 20,64 μL em 2979,36 μL de metanol a 50%. Essa será a maior concentração de uso a ser adicionada no poço para a droga exemplificada.

d) Com todas as diluições das drogas prontas, prosseguir com a diluição seriada na base 3. Adicionar 60 µL das drogas diluídas em cada poço na coluna 1. Com auxílio de uma pipeta multicanal, adicionar 45 µL da coluna 2 em diante de metanol 50%, de acordo com a quantidade de concentrações a serem testadas. **De forma rápida e assertiva utilizando a pipeta multicanal**, pipetar 15 µL da coluna 1 e colocar na coluna 2, homogeneizar 3x e pipetar 15 µL da coluna 2 na coluna 3, homogeneizar 3x e assim por diante até a última concentração da droga. Na última concentração, descartar 15 µL. **Importante:** deixar uma coluna para controle (amostra sem droga). A imagem a seguir exemplifica um mapa de distribuição das drogas em uma placa de 96 poços;

	SEM ENRIQUECIMENTO						COM ENRIQUECIMENTO (percoll 70%)					
	CQ	MQ	ART	PIR	ATV	C	CQ	MQ	ART	PIR	ATV	C
						T						T
A	3000 *	3000 *	60*	2500 *	60*	HI	3000 *	3000 *	60*	2500 *	60*	HI
B	1000	1000	20	833, 3	20	HI	1000	1000	20	833, 3	20	HI
C	333	333	6,67	277, 8	6,67	HI	333	333	6,67	277, 8	6,67	HI
D	111	111	2,22	92,5 9	2,22	HI	111	111	2,22	92,5 9	2,22	HI
E	37	37	0,74	30,9	0,74	H S	37	37	0,74	30,9	0,74	H S
F	12,3	12,3	0,25	10,3	0,25	H S	12,3	12,3	0,25	10,3	0,25	H S
G	4,11	4,11	0,08	3,4	0,08	H S	4,11	4,11	0,08	3,4	0,08	H S
H	1,37	1,37	0,02 7	1,1	0,02 7	H S	1,37	1,37	0,02 7	1,1	0,02 7	H S

	Cloroquina
	Mefloquina
	Artesunato
	Pirimetamina
	Atovaquona
	Hemácia infectada – espaço reservado, não adicionar droga
	Hemácia sadia – espaço reservado, não adicionar droga

*concentração final

e) Deixar a placa em fluxo laminar (ligado) overnight para secar. Na manhã seguinte, se a placa ainda não estiver seca, permanecer no fluxo. Caso esteja, fechar e selar com papel alumínio e armazenar em geladeira a 4°C (vida útil de no máximo 1 a 6 meses, a depender da droga), ver tabela abaixo:

Droga	Tempo de vida útil	Temperatura apropriada de armazenamento
Artesunato	6 meses	4°C
Mefloquina	2 meses	4°C
Cloroquina	3 meses	4°C
Pirimetamina	3 meses	4°C
Atovaquona	2 meses	4°C

7. REFERÊNCIAS

-<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atovaquone#section=LogP>,
acesso em 12.04.2021 as 17:00;

- <https://www.caymanchem.com/pdfs/23802.pdf>, acesso em 12.04.2021 as 17:07.

- Randrianarivelosia et al. Current absence of pyrimethamine resistance of Plasmodium falciparum in Madagascar. Trans R Soc Trop Med Hyg, Sep-Oct 2002;96(5):557-9.

- Baco et al. In Vitro Activity of Pyrimethamine, Cycloguanil, and Other Antimalarial Drugs Against African Isolates and Clones of Plasmodium falciparum. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1994; 50(2):193-9.

- Khositnithikul et al, 2008. In vitro atovaquone/proguanil susceptibility and characterization of the cytochrome b gene of Plasmodium falciparum from different endemic regions of Thailand. Malar J. 2008; 7: 23.

- Rebelo, M., Tempera, C., Fernandes, J.F. et al. Assessing anti-malarial drug effects ex vivo using the haemozoin detection assay. Malar J 14, 140 (2015).

- Kwansa-Bentum et al. Plasmodium falciparum isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. Malaria Journal 2011, 10:187

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

Código POP	POP_IPCCB_LB_001_PT_D	Versão 2	
Título	Preparo da gota espessa para pesquisa de plasmódio		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aprovação:
Monica Costa	Gisely C. de Melo	Monica Costa	

Nome	Versão	Alterações realizadas
Gisely C.de Melo	2	Formatação e adequação

1. OBJETIVO

Padronizar os procedimentos para preparo, coloração, leitura e registro de resultado de lâminas para pesquisa de plasmódio utilizando gota espessa do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (FMT- HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Todas as lâminas coletadas para detecção de *Plasmodium spp.* provenientes da demanda espontânea do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

4. RESPONSABILIDADES

4.1 Responsável pela coleta e coloração da gota espessa: agente de endemias

4.2 Responsável pela leitura: microscopistas

4.3 Responsável pela revisão da gota espessa: microscopistas do setor de controle de qualidade

4.4 Gerência do IPCCB: responsável pelos resultados gerados

4.5 Equipe de pesquisa: alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e colaboradores. Pode ser responsável pela coleta, coloração,

armazenamento e inclusão dos resultados das leituras de gota espessa de cada projeto.

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

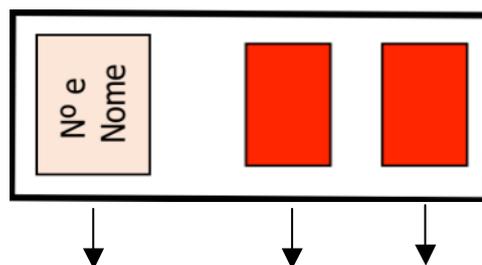
6. PROCEDIMENTOS

6.1 COLETA DE SANGUE E PREPARO DE LÂMINAS PARA EXAME DE GOTA ESPESSA

- Seja usuário/paciente de ambulatório ou enfermaria, unidade básica de saúde ou hospital serão coletadas:
 - gota espessa por indivíduo, numa lâmina de vidro, sendo que a quantidade pode variar de cada projeto.
- A lâmina de vidro deve estar limpa, desengordurada e com uma etiqueta auto-adesiva para identificação do paciente (nome e/ou número do cadastro).
- Os dados cadastrais do paciente (pessoais e investigação epidemiológica para malária) serão digitados no formulário eletrônico do SIVEP (Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária/MS) e *iDoctor* (prontuário eletrônico da FMT-HVD), por agentes notificantes treinados para essa atividade.
- Limpar a pele que será puncionada (lateral do dedo anelar ou médio, lóbulo da orelha ou em lactentes, o dedo grande do pé ou calcanhar) com algodão embebido em álcool a 70%, enxugar com algodão seco.
- Retirar a lanceta do envoltório estéril e segurando-a firmemente, puncionar o local de maneira firme e leve. Remover a primeira gota de sangue com algodão seco.
- Comprimir o dedo suavemente para obter outra gota de sangue.
- Segurar firmemente a lâmina pelas extremidades onde se encontra a etiqueta de identificação. Aproximar a lâmina do local puncionado até

tocar a gota de sangue (evitar contato com a pele).

- Com o canto de outra lâmina de vidro, espalhar o sangue e confeccionar gota espessa homogêneas no formato de um retângulo de 1,5 x 1,0 cm, como segue:



Identificação Gota espessa 1 Gota espessa 2

- Limpar o local puncionado com algodão embebido em álcool a 70% e, se necessário pressioná-lo para estancar o sangue.
- Secar a lâmina em temperatura ambiente ou estufa, com o cuidado de não usar calor excessivo.
- Para iniciar a coloração o sangue deve estar totalmente seco, para que não haja perda total do material.

6.2 COLORAÇÃO

6.2.1 Corantes e diluentes utilizados

5.2.1.1 Azul de metileno fosfatado

5.2.1.2 Solução alcoólica de Giemsa

5.2.1.3 Água tamponada

6.2.2 Preparo de corantes e diluentes

6.2.2.1 Preparo do Azul de metileno fosfatado

Azul de metileno medicinal em pó	1,0 g
-------------------------------------	----------

Fosfato de potássio monobásico	1,0 g
Fosfato de sódio bibásico	3,0 g

Pesar os reagentes e misturar em gral seco.

6.2.2.1.1 Preparo da solução fosfatada de azul de metileno

Pesar 1,0g da mistura acima e dissolver em 250 mL de água destilada.

Conservar a solução em pissete plástico.

6.2.2.2 Preparo da solução alcoólica de Giemsa

Giemsa em pó	0,75 g
Glicerol P. A.	35m L
Álcool metílico P. A.	65m L

Colocar a solução em frasco contendo pérolas de vidro e agitar bem (várias vezes ao dia) até obter homogeneização. Esta solução deve ser preparada em maior volume e mantida em estoque. Para uso diário a solução alcoólica deve ser colocada em tubo cônico de 50 ml, evitando-se a abertura por tempo prolongado. Filtrar quando necessário, para retirar as impurezas.

6.2.2.3 Preparo da mistura de sais fosfatados

Fosfato de potássio monobásico	4,0 g
Fosfato de sódio bibásico	6,0 g

Pesar os reagentes e misturar em gral seco.

6.2.2.3.1 Preparo da água tamponada

Pesar 1,0g da mistura de sais fosfatados e dissolver em 1L de água destilada. Conservar a solução em pissetes. Verificar o pH frequentemente. A água deve estar com pH em torno de 7 a 7,2.

6.2.3 Armazenamento dos reagentes

As soluções-estoques dos corantes utilizados na coloração de gota espessa devem ser armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz (utilizar frascos de cor âmbar).

6.2.4 Técnica de coloração das lâminas

6.2.4.1 Método de Walker para coloração da gota espessa

1ª fase: Desemoglobinização pela solução hipotônica de azul de metileno.

- Aplicar a solução de azul de metileno fosfatado sobre a gota espessa de sangue, por doissegundos.
- Rinsar a lâmina por trás com água tamponada (sem jato forte).

2ª fase: Coloração pela solução de Giemsa

- Numa pia, colocar a lâmina sobre uma grade para proceder a coloração.
- Em uma proveta graduada preparar uma solução de Giemsa na proporção 1:20. Colocar 1 ml de corante e completar com água tamponada até 20 ml. Homogeneizar.
- Com cuidado, aplicar esta solução sobre a lâmina.
- Deixar corar por 10 minutos.
- Rinsar a lâmina por trás com água tamponada (sem jato forte).
- Secar em estufa

LEITURA DA GOTA ESPESSA

- A lâmina com a gota espessa corada é examinada ao microscópio óptico com objetiva de 100x (imersão) e ocular de 10x. A leitura é realizada colocando uma gota de óleo de imersão sobre a gota espessa corada e

examinando 100 campos microscópicos.

- Ligar o microscópio. Checar a presença de ocular de 10X. Com o condensador elevado, a lâmina corada é colocada no suporte e a fonte de luz é ajustada pela ocular e pela objetiva de 100X.
- Ao mover lentamente a objetiva de imersão, uma camada de óleo será formada entre a lâmina e a lente. O ajuste fino é usado para focar o campo; a lente não deve tocar a lâmina.
- O exame microscópico deve ser sistemático e padronizado. Ele deve iniciar pela extremidade esquerda da lâmina. A leitura é iniciada da periferia do campo e termina no centro.
- Quando o campo está lido, move-se a lâmina longitudinalmente para examinar os campos adjacentes. Move-se a lâmina verticalmente para que outra fileira/largura seja lida. Há cerca de 100 campos em um eixo de 2 cm da lâmina;

O diagnóstico pode ser expresso em cruces ou por milímetro cúbico de sangue

6.3.1 Método de avaliação semiquantitativa (resultado expresso em cruces)

- Número de campos a examinar: 100
- Número inferior a 40 parasitos nos 100 campos examinados: anotar o número encontrado. Ex: 35V
- Quando o número total de parasitos contados estiver entre 40 e 60 parasitos por 100 campos, registrar: +/2 (meia cruz).
- A partir de um parasito por campo, o resultado será registrado como uma, duas, três ou quatro cruces, conforme o quadro a seguir.

Parasitos contados	Número de campos microscópicos	Cruces
40 a 60	100	+/2

1	1	+
2-20	1	++
21-200	1	+++
+200	1	++++

6.3.2 Método de avaliação relativa a contagem de leucócitos por campo (densidade parasitária: parasitos/ μ L)

- Em geral contam-se 200 leucócitos.
- Contar simultaneamente o número de parasitos assexuados, até alcançar 200 leucócitos.
- Considerando o número de leucócitos do hemograma ou assumindo uma leucometria padrão de 6.000 leucócitos/ μ L de sangue para todo paciente com malária, realizar o seguinte cálculo para obter a parasitemia/MI de sangue.

$$\text{n}^\circ \text{ de parasitos} \times 6.000 \text{ leucócitos} / \text{n}^\circ \text{ de leucócitos} = \text{parasitos por } \mu\text{l}$$

6.3 REGISTRO DOS RESULTADOS DO EXAME MICROSCÓPICO

Os resultados do exame da gota espessa para as diferentes espécies de plasmódios serão registrados nos formulário eletrônico do Sistema de Vigilância Epidemiológica – SIVEP/Malária e prontuário eletrônico *iDoctor*.

Quando da falta de energia ou alguma pane no SIVEP, os dados cadastrais, epidemiológicos e resultados dos exames dos pacientes, são colocados de forma manuscrita no formulário impresso do SIVEP. Esses resultados serão inseridos no sistema pelo técnico/microscopista responsável pelo diagnóstico.

6.4 LEITURA INDEPENDENTE POR DOIS MICROSCOPISTAS

6.5.1 Após a seleção do indivíduo para participar do estudo, de acordo com os critérios de inclusão, e dependendo do projeto, a gota espessa será lida independentemente por dois microscopistas do estudo.

6.5.2 A parasitemia é contada simultaneamente com a de leucócitos, até serem totalizados 200 leucócitos. Se após a contagem de 200 leucócitos, o número de parasitas assexuados for inferior a 10, prosseguir a contagem até 500 leucócitos.

6.5.2 Se os resultados das duas leituras se enquadrarem em até 20% para a contagem de parasitas e os dois leitores concordarem sobre a identificação da espécie, então, o resultado do primeiro leitor é válido.

6.5.3 Se os resultados dos dois microscopistas forem diferentes em mais de 20% ou se os microscopistas discordarem sobre a identificação da espécie, então, será necessário um terceiro leitor independente que efetuará a leitura da lâmina e então esse resultado será válido

6.5.4 Os resultados da leitura do primeiro ou do terceiro microscopista, quando houver necessidade, serão registrados em formulário de avaliação parasitológica, versão 03.

6.5.5 A densidade parasitária é calculada utilizando a contagem de células brancas do indivíduo, do último hemograma ou assumindo uma leucometria padrão de 6.000 leucócitos/ μ l.

7. REFERÊNCIAS

Não se aplica

8. LISTA DE ANEXOS

TÍTULO ANEXO	CÓDIGO
Resultado da leitura da gota espessa	IPCCB_LB_001_A01_PT_D

7.2 Parecer ético

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SENSIBILIDADE A ANTIMALÁRICOS DE ISOLADOS DE PLASMODIUM VIVAX COLETADOS A FRESCO E CRIOPRESERVADOS

Pesquisador: MACEJANE FERREIRA DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18921019.0.0000.0005

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

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.528.265

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo apresentado ao programa de mestrado intitulado SENSIBILIDADE A ANTIMALÁRICOS DE ISOLADOS DE PLASMODIUM VIVAX COLETADOS A FRESCO E CRIOPRESERVADOS, com um custo de \$ 9.500,00 da pesquisadora MACEJANE FERREIRA DE SOUZA tendo como orientadora a Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes. Trata-se de uma vertente de um estudo maior intitulado "Desenvolvimento de novas ferramentas para a busca e validação de novos alvos moleculares na terapia contra Plasmodium vivax" sob Processo 17/18611-7 financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) sob a coordenação direta do Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa. A pesquisadora informa que este é um estudo experimental, onde serão coletas (N de amostras) de pacientes positivos para malária vivax com parasitemia igual ou superior a duas cruzes. Essas amostras serão postas em cultivo em placa de 96 poços, por até 48 horas, estando o parasito submetido a diferentes concentrações de antimaláricos (Cloroquina, Mefloquina, Artesunato e Artemeter). Após este tempo, serão feitas gotas espessas de cada poço para verificar o amadurecimento do parasito por microscopia óptica e também será feita a leitura da placa na placa por citometria de fluxo. Este processo será feito estando a amostra fresca (recém coletada) e também após um período de até três meses de congelamento (criopreservada) a fim de verificar se o parasito continuará viável para o cultivo após submetido a esta condição.

Recrutamentos de pacientes: Serão recrutados pacientes com malária por P. vivax na FMT-HVD,

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: 3.528.265

sendo o critério de inclusão: Pacientes positivos, exclusivamente infectados por *Plasmodium vivax*, com idade a partir de 14 anos, parasitemia igual ou superior a duas cruzes e que não tenham tomado antimaláricos nos últimos 60 dias. O trabalho será submetido ao comitê de ética para a aprovação. Processamento da amostra: O material coletado será processado no laboratório da Gerencia da Malária do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar a sensibilidade a antimaláricos de isolados de *Plasmodium vivax* coletados a fresco e criopreservados.

Objetivo Secundário:

- Determinar a sensibilidade (IC50) aos antimaláricos: Cloroquina, Mefloquina, Artesunato e Artemeter de isolados de *Plasmodium vivax* da Amazônia brasileira;
- Comparar a sensibilidade a antimaláricos de isolados de *Plasmodium vivax* coletados a fresco e criopreservados;
- Comparar a determinação da sensibilidade a antimaláricos através das técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisadora informa que após a coleta de sangue, poderá ocorrer dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente poderá ocorrer desmaio ou infecção no local da punção.

Benefícios:

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão futuramente ajudar na validação de condições de amostras e técnicas para avaliar a sensibilidade do parasito a antimaláricos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois a malária continua sendo um grande problema de saúde pública em diversas regiões tropicais e subtropicais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A PESQUISADORA ANEXOOU OS SEGUINTE DOCUMENTOS

1-INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO DA PB;

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: 3.528.265

2-FOLHA DE ROSTO

3-CARTA DE APRESENTAÇÃO DO Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa COORD DO PROJETO MAIOR

4-CARTA DE ANUÊNCIA DA GERENCIA DE MALÁRIA (FMT-HVD)

5-TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TALE (COM LINGUAGEM SIMPLES, BEM ILUSTRADO E DE FÁCIL ENTENDIMENTO)

6-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE (COM LINGUAGEM SIMPLES E DE FÁCIL ENTENDIMENTO)

Recomendações:

Sem pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDÊNCIAS

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_PROJETO_1362167.pdf	05/08/2019 09:45:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	05/08/2019 09:36:42	MACEJANE FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	02/08/2019 11:28:37	MACEJANE FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Carta_Fapesp.pdf	02/08/2019 11:19:41	MACEJANE FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	05/06/2019 20:30:53	MACEJANE FERREIRA DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TALE.docx	22/05/2019 00:48:20	MACEJANE FERREIRA DE	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: 3.528.265

Justificativa de Ausência	TALE.docx	22/05/2019 00:48:20	SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/05/2019 00:47:56	MACEJANE FERREIRA DE SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 23 de Agosto de 2019

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



SENSIBILIDADE A ANTIMALÁRICOS DE ISOLADOS DE *Plasmodium vivax* COLETADOS A FRESCO E CRIOPRESERVADOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

A FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estudar a sensibilidade a medicamentos antimaláricos do *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 o medicamento, afim de verificar essa condição. Para nos ajudar a entender isso, precisamos realizar estes testes com sangue de 50 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



COLETA DE SANGUE

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 9 mL (cerca de 2 colheres de sopa) de sangue da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



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 a sensibilidade de medicamentos para tratamento de *Plasmodium vivax* e também a aprimoramento de técnicas para essa detecção. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente identificar se o agente causador da doença continua sensível aos medicamentos utilizados no tratamento.

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 pesquisadora Macejane Ferreira de Souza ou Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes, responsáveis 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) 99518-1113 e (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 "SENSIBILIDADE A ANTIMALÁRICOS DE ISOLADOS DE *PLASMODIUM VIVAX* COLETADOS A FRESCO E CRIOPRESERVADOS"

Data: / /

Endereço:.....

Telefone: (....)

Polegar direito



Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário.....

Data: / /

7.4 Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)

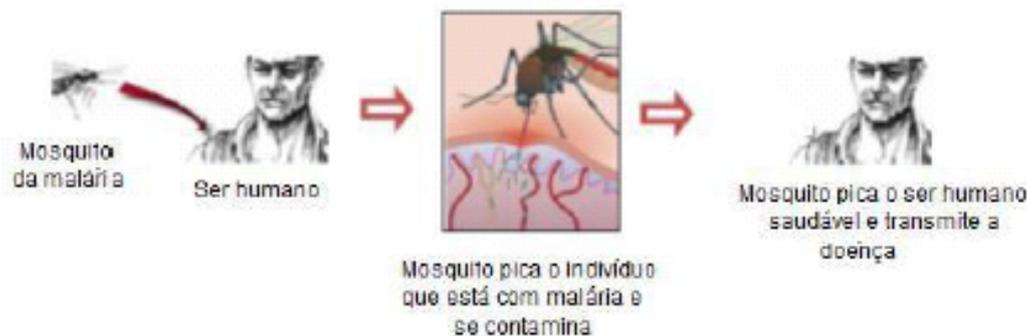


SENSIBILIDADE A ANTIMALÁRICOS DE ISOLADOS DE *Plasmodium vivax* COLETADOS A FRESCO E CRIOPRESERVADOS

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

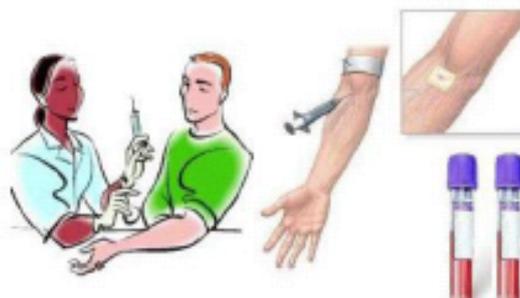
A FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estudar a sensibilidade a medicamentos antimaláricos do *Plasmodium vivax*, ou seja, o causador da doença que você tem no momento. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue do paciente para realizar alguns testes com este sangue e o medicamento, afim de verificar essa condição. Para nos ajudar a entender isso, precisamos realizar estes testes com sangue de 50 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



COLETA DE SANGUE

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 9 mL (cerca de 2 colheres de sopa) de sangue da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



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 a sensibilidade de medicamentos para tratamento de *Plasmodium vivax* e também aprimoramento de técnicas para essa detecção. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente identificar se o agente causador da doença continua sensível aos medicamentos utilizados no tratamento.

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 pesquisadora Macejane Ferreira de Souza ou Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes, responsáveis 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) 99518-1113 ou (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 TALE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Nome do menor:.....

Consentimento do responsável:

Data: / /

Endereço:.....

.....

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

Polegar direito



Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário.....

Data: / /

7.5 Cronograma de atividades

ATIVIDADES	1º SEMESTRE (2019)						2º SEMESTRE (2019)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento laboratorial						X	X	X	X	X	X	X
Cumprimento de disciplinas			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão de projeto ao comitê de ética							X					
ATIVIDADES	1º SEMESTRE (2020)						2º SEMESTRE (2020)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Recrutamento de pacientes									X	X	X	X
Testes de Padronização de corantes									X	X	X	X
Análise de dados									X	X	X	X
ATIVIDADES	1º SEMESTRE (2021)						2º SEMESTRE (2021)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X					
Qualificação do projeto			X									
Recrutamento de pacientes			X	X	X	X	X					
Teste de sensibilidade a antimaláricos						X	X	X				
Análise de dados			X	X	X	X	X	X				
Redação da dissertação	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Defesa de dissertação										X		

7.6 Produção Científica como colaborador no período de mestrado



Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

EXPERIMENTAL THERAPEUTICS



Computational Chemogenomics Drug Repositioning Strategy Enables the Discovery of Epirubicin as a New Repurposed Hit for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*

Leticia Tiburcio Ferreira,^a Juliana Rodrigues,^b Gustavo Capatti Cassiano,^{a,c} Tatyana Almeida Tavella,^a Kalra Cristina Peralls Tomaz,^a Djane Clarys Bala-da-Silva,^d Macejane Ferreira Souza,^{d,e} Marilla Nunes do Nascimento Lima,^b Mellina Mottin,^b Ludimila Dias Almeida,^f Juliana Calit,^g Maria Carolina Silva de Barros Puça,^d Gisely Cardoso Melo,^h Daniel Youssef Bargleri,^g Stefanie Costa Pinto Lopes,^{d,e} Marcus Vinicius Guimarães Lacerda,^h Elizabeth Bilisland,ⁱ Per Sunnerhagen,^h Bruno Junior Neves,^{b,j} Carolina Horta Andrade,^{a,b} Pedro Vitor Lemos Cravo,^{c,k} Fabio Trindade Maranhão Costa^a

^aLaboratory of Tropical Diseases-Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Molecular Modeling and Drug Design, LabMo, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^cGlobal Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

^dInstituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil

^eFundação de Medicina Tropical-Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil

^fSynthetic Biology Laboratory, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^gDepartment of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo-USP, São Paulo, Brazil

^hDepartment of Chemistry and Molecular Biology, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

ⁱLabChem-Laboratory of Cheminformatics, Centro Universitário de Anápolis-UniEVANGÉLICA, Anápolis, Goiás, Brazil

Leticia Tiburcio Ferreira and Juliana Rodrigues contributed equally to this work. Author order was determined alphabetically by last name. Carolina Horta Andrade, Pedro Vitor Lemos Cravo, and Fabio Trindade Maranhão Costa equally coordinated this work.

ABSTRACT Widespread resistance against antimalarial drugs thwarts current efforts for controlling the disease and urges the discovery of new effective treatments. Drug repositioning is increasingly becoming an attractive strategy since it can reduce costs, risks, and time-to-market. Herein, we have used this strategy to identify novel antimalarial hits. We used a comparative *in silico* chemogenomics approach to select *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* proteins as potential drug targets and analyzed them using a computer-assisted drug repositioning pipeline to identify approved drugs with potential antimalarial activity. Among the seven drugs identified as promising antimalarial candidates, the anthracycline epirubicin was selected for further experimental validation. Epirubicin was shown to be potent *in vitro* against sensitive and multidrug-resistant *P. falciparum* strains and *P. vivax* field isolates in the nanomolar range, as well as being effective against an *in vivo* murine model of *Plasmodium yoelii*. Transmission-blocking activity was observed for epirubicin *in vitro* and *in vivo*. Finally, using yeast-based haploinsufficiency chemical genomic profiling, we aimed to get insights into the mechanism of action of epirubicin. Beyond the target predicted *in silico* (a DNA gyrase in the apicoplast), functional assays suggested a GlcNac-1-P-transferase (GPT) enzyme as a potential target. Docking calculations predicted the binding mode of epirubicin with DNA gyrase and GPT proteins. Epirubicin is originally an antitumoral agent and presents associated toxicity. However, its antiparasitic activity against not only *P. falciparum* but also *P. vivax* in different stages of the parasite life cycle supports the use of this drug as a scaffold for hit-to-lead optimization in malaria drug discovery.

Citation Ferreira LT, Rodrigues J, Cassiano GC, Tavella TA, Tomaz KCP, Bala-da-Silva DC, Souza MF, Lima MNDO, Mottin M, Almeida LD, Calit J, Puça MCSDB, Melo GC, Bargleri DY, Lopes SCP, Lacerda MVG, Bilisland E, Sunnerhagen P, Neves BJ, Andrade CH, Cravo PV, Costa FTM. 2020. Computational chemogenomics drug repositioning strategy enables the discovery of epirubicin as a new repurposed hit for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e02041-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02041-19>.

Copyright © 2020 Ferreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Carolina Horta Andrade, carolhadrade@gmail.com, Pedro Vitor Lemos Cravo, pedrocravo@gmail.com, or Fabio Trindade Maranhão Costa, fabiofmc72@gmail.com.

[This article was published on 20 August 2020 with a standard copyright line ("© 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved"). The authors elected to pay for open access for the article after publication, necessitating replacement of the original copyright line with the one above, and this change was made on 28 August 2020.]

Received 11 October 2019

Returned for modification 20 December 2019

Accepted 19 June 2020

Accepted manuscript posted online 29 June 2020

Published 20 August 2020

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

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

¹Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Manaus, AM, Brasil

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

³Centro Universitário Fametro, Manaus, AM, Brasil

⁴Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM, Brasil

⁵Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

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

BACKGROUND Different strategies for improvement of malaria control and elimination are based on the blockage of malaria parasite transmission to the mosquito vector. These strategies include the drugs that target the plasmodial sexual stages in humans and the early developmental stages inside mosquitoes.

OBJECTIVES Here we tested Malaria Box compounds in order to evaluate their activity against male and female gametocytes in *Plasmodium berghei*, mosquito infection in *P. vivax* and ookinete formation in both species.

METHODS/FINDINGS The membrane feeding assay and the development of ookinetes by a 24 h *ex vivo* culture and the ookinete yield per 1000 erythrocytes were used to test transmission-blocking potential of the Malaria Box compounds in *P. vivax*. For *P. berghei* we used flow cytometry to evaluate male and female gametocyte time course and fluorescence microscopy to check the ookinete development. The two species used in this study showed similar results concerning the compounds' activity against gametocytes and ookinetes, which were different from those in *P. falciparum*. In addition, from the eight Malaria Box compounds tested in both species, compounds MMV665830, MMV665878 and MMV665941 were selected as a hit compounds due the high inhibition observed.

CONCLUSION Our results showed that *P. berghei* is suitable as an initial screening system to test compounds against *P. vivax*.

Key words: Malaria Box - membrane feeding assay and gametocytes
