

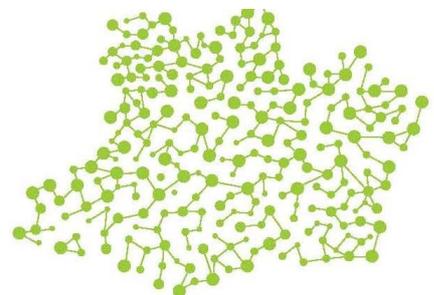


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTIMALÁRICO ATOVAQUONA E SEUS
DERIVADOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Anopheles* spp. E NO BLOQUEIO DE
TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax***

ALINE DE SOUSA SANTIAGO



**Manaus
2023**

ALINE DE SOUSA SANTIAGO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTIMALÁRICO ATOVAQUONA E
DERIVADOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Anopheles* spp. E NO BLOQUEIO DE
TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax***

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 Doura, para obtenção do grau de mestre em *Doenças Tropicais e Infecciosas*

Orientadora Prof^a. Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Coorientadora Prof^a. Dra. Camila Fabbri

**Manaus
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

A411aa Santiago, Aline de Sousa

Avaliação da atividade do antimalárico atovaquona e derivados na sobrevivência de *Anopheles* spp. e no bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax* / Aline de Sousa Santiago. Manaus : [s.n], 2023.
86 f.: il.; 28 cm.

Dissertação - PGSS - Doenças Tropicais e Infecciosas
(Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Stefanie Costa Pinto Lopes

Coorientador: Camila Fabbri

1. Malária. 2. Eliminação. 3. Gametócito. 4. Oocistos. 5. Anopheles.

I. Stefanie Costa Pinto Lopes (Orient.).

II. Camila Fabbri (Coorient.).

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. Avaliação da atividade do antimalárico atovaquona e derivados na sobrevivência de *Anopheles* spp. e no bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax*

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANTIMALÁRICO ATOVAQUONA E
DERIVADOS NA SOBREVIDA DE *Anopheles* spp. E NO BLOQUEIO DE
TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax*****ALINE DE SOUSA SANTIAGO**

“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:

**Prof^a. Stefanie Costa Pinto Lopes Dra.
Presidente**

**Prof^a Keillen Monick Martins Campos Dra
Membro**

**Prof^o Hector Henrique Ferreira Koolen Dr.
Membro**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por toda a oportunidade que colocou em meu caminho.

Agradeço a minha mãe Margareth Maia, por todo o apoio, força e compreensão durante a minha trajetória no mestrado, sendo a minha maior torcida.

Agradeço a minha orientadora, a Dra. Stefanie Lopes, por toda a oportunidade que me proporcionou e por toda a paciência durante o meu trajeto no curso de mestrado. A senhora é um exemplo de mulher tendo a sua dedicação na pesquisa, profissional e sobretudo na sua família.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Camila Fabbri, muito obrigada por toda dedicação e aprendizado durante o projeto.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD), especialmente, à Dra Rosa Santana pela sua paciência e dedicação em ensinar a rotina no insetário e de estar sempre presente.

Agradeço à Fundação de Medicina Tropical, a Universidade do Estado do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação de Medicina Tropical, em especial a Iza, pelo sempre bom atendimento e atenção. À coordenadora do programa, Dra. Gisely Melo e aos professores do PPGMT.

Aos meus amigos do laboratório e do PPGMT, especialmente para Izabele, Maianne dias, Emily, Ingrid Luna e Karol que sempre estiveram ao meu lado durante a minha trajetória acadêmica.

Agradeço aos meus pais por toda a força que me deram durante toda a minha vida, pois sem eles não estaria aqui.

In memoriam de Nelson Ferreira Fé, por sempre estar presente pela entomologia estando disposto a ajudar e sempre tirar dúvidas dos estudantes, sempre descontraindo o momento contando suas histórias.

In memoriam de Denison Vital Jesus, por ser um grande amigo e nos alegrar em todos os momentos, compartilhando toda a sua criatividade e amor pela ciência.

A todas as pessoas e instituições que de maneira relevante contribuíram para a realização do trabalho como a UEA, FMT-HVD, SUFRAMA, FAPEAM, CAPES e CNPq.

A todos os que contribuíram, muito obrigada.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Este estudo foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), por meio da concessão de bolsa de estudos durante os 24 meses de realização do projeto.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu filho, Alan Gabriel, que me dá forças todos os dias para enfrentar qualquer desafio, pois ele é minha maior recompensa

RESUMO

A atovaquona (ATQ) é um fármaco prescrito em esquemas de profilaxia da malária para viajantes e pode contribuir para novas estratégias no controle da malária devido a seus efeitos na taxa de infecção dos anofelinos. Dessa forma, o objetivo geral desse estudo é avaliar a atividade inseticida do antimalárico ATQ e derivados (TERPY E DPPB) sobre fêmeas de mosquitos *Anopheles* spp. e seu papel no bloqueio de transmissão do parasita. Para isto, o efeito destes compostos foi avaliado em relação ao bloqueio de transmissão de *P. vivax* e no impacto do *fitness* (fecundidade e sobrevivência) dos anofelinos. Neste sentido, quatro grupos de *An. aquasalis* foram alimentados via ensaio de alimentação direta por membrana (DMFA) com isolados de *P. vivax* na presença de ATQ (1mM) e os derivados da ATQ - TERPY e DPPB, ambos nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. Em outro momento, fêmeas de *An. darlingi* foram analisadas frente à exposição prévia em uma superfície impregnada com ATQ (200 μ mol/m²) e o derivado TERPY nas concentrações de 2 μ mol/m², 20 μ mol/m² e 200 μ mol/m² e um grupo controle (sem composto) por 60 minutos. A partir desta exposição realizou-se três experimentos de forma independente: bloqueio de transmissão, fecundidade e sobrevivência. A fim de verificar o impacto na infectividade das fêmeas frente a exposição prévia aos compostos, realizou-se DMFA com sangue total de isolados de *P. vivax*. Após 7 dias foi realizada a dissecação dos mosquitos e contagem de oocistos de cada intestino. Para a realização das análises da taxa de fecundidade, pós-exposição foi realizado o DMFA com sangue não infectado. Após 72 horas realizou-se a postura individual de cada fêmea e a contagem dos ovos foi feita diariamente até o 3^a dia. Por fim, ainda pós exposição foi observado a sobrevivência das fêmeas. Dessa forma, a quantidade de mortes diárias foi contabilizada até a mortalidade total em cada grupo. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism vs 9.0. No ensaio de alimentação direta sem pré-exposição observou-se que a taxa de infecção foi de 2,8% no grupo ATQ – 10 μ M e no grupo TERPY 1 e 10 μ M, a infecção foi totalmente abolida. Os experimentos de pré-exposição, mostraram que ATQ - 200 μ M e TERPY- 200 μ M tiveram menor taxa de infecção (4,3% e 22%) e menor taxa de intensidade (1.72 e 5.35) (p=0001). No 2^a experimento da sobrevivência, houve diferença significativa entre os grupos Controle x ATQ (p = 0,0080) e os grupos Controle x TERPY 2 μ mol/m² (p = 0,0341). O 3^a experimento da sobrevivência também apresentou diferença entre os grupos Controle x ATQ (p = 0,0080), Controle x TERPY 200 μ mol/m² (p = 0,0341) e Controle x TERPY 20 μ mol/m² (p = 0,0488). Em relação a fecundidade, apenas o primeiro experimento apresentou diferença entre o grupo controle x Terpy 2 μ mol/m² (p=0,0001). O derivado TERPY demonstrou potencial bloqueio de transmissão do *Plasmodium vivax*, sendo mais potente que o derivado DPPB, entretanto quando avaliado na pré-exposição dos mosquitos, seguida da infecção experimental, verificou-se que o efeito no bloqueio da infecção no *An.darlingi* foi menos proeminente em relação a ATQ. Para aprofundar o entendimento da ação desses compostos na sobrevivência e na fecundidade, é necessário mais ensaio para melhor compreensão.

Palavras Chaves: malária, eliminação, gametócitos, oocistos, *Anopheles darlingi*.

ABSTRACT

Atovaquone (ATQ) is a drug currently prescribed in malaria prophylaxis regimens for travelers and may contribute to new strategies for malaria control due to its effects on the infection rate of anophelines. Therefore, the general objective of this study is to evaluate the insecticidal activity of the antimalarial drug ATQ and derivatives (TERPY AND DPPB) on female *Anopheles* spp. mosquitoes. and its role in blocking parasite transmission. For this, the effect of these compounds was evaluated in relation to blocking the transmission of *P. vivax* and the impact on the fitness (fecundity and survival) of anophelines. In this sense, four groups of *An. aquasalis* were fed via direct membrane feeding assay (DMFA) with *P. vivax* isolates in the presence of ATQ (1mM) and ATQ derivatives - TERPY and DPPB, both at concentrations of 1 μ M and 10 μ M. At another time, females of *An. darlingi* were analyzed after previous exposure on a surface impregnated with ATQ (200 μ mol/m²) and the derivative TERPY at concentrations of 2 μ mol/m², 20 μ mol/m² and 200 mmol/m² and a control group (without compound) for 60 minutes. From this exposure, three experiments were carried out independently: transmission blocking, fertility and survival. In order to verify the impact on the infectivity of females due to previous exposure to the compounds, DMFA was performed with whole blood of *P. vivax* isolates. After 7 days, mosquitoes were dissected and oocysts were counted from each intestine. To carry out fertility rate analyses, post-exposure DMFA was performed with uninfected blood. After 72 hours, each female was laid individually. Eggs were counted every day until the 3rd day post-laying. Finally, even after exposure, the survival of the females was observed. In this way, the number of daily deaths was counted until the total mortality in each group. Statistical analysis of all experiments was performed using GraphPad Prism vs 9.0 software. In the direct feeding trial without pre-exposure, it was observed that the infection rate was 2.8% in the ATQ – 10 μ M group and in the TERPY 1 and 10 μ M groups, the infection was completely abolished. The pre-exposure experiments showed that ATQ - 200 μ M and TERPY- 200 μ M had a lower infection rate (4.3% and 22%) and a lower intensity rate (1.72 and 5.35) ($p=0.001$). In the 2nd survival experiment, there was a significant difference between the Control x THA groups ($p = 0.0080$) and the Control x TERPY 2 μ mol/m² groups ($p = 0.0341$). The 3rd survival experiment also showed a difference between the groups Control x THA ($p = 0.0080$), Control x TERPY 200 μ mol/m² ($p = 0.0341$) and Control x TERPY 20 μ mol/m² ($p = 0.0488$). Regarding fertility, only the first experiment showed a difference between the following groups: control A x Terpy 2 μ mol/m² ($p=0.0001$). The TERPY derivative demonstrated potential transmission blocking of *Plasmodium vivax*, being more potent than the DPPB derivative. However, when evaluated in the pre-exposure of mosquitoes, followed by experimental infection, it was found that the effect in blocking the infection in *An.darlingi* was less prominent in relation to THA. There was also a reduction in survival compared to the control group, indicating a potential for action on the survival of *An. darlingi*, but more trials are needed to deepen the understanding of the effects of atovaquone and the Terpy derivative on *An. darlingi*, from Likewise, in terms of fertility, new experiments must be carried out to better understand the effects of atovaquone and its derivative on the posture of *An. darlingi*.

Keywords: malaria, elimination, gametocytes, oocysts, *Anopheles darlingi*.

RESUMO LEIGO

Malária é uma doença infecciosa transmitida pela picada do mosquito/carapanã popularmente conhecido como mosquito prego que está infectado, ou seja, que tem o parasita causador da doença em seu organismo. A atovaquona é um medicamento antimalárico recomendado para viajantes que vão à África como prevenção e que já possui eficácia comprovada para o *Plasmodium falciparum*, outra espécie causadora da malária, mas que não é tão comum na região Amazônica, que possui predominância de casos pela espécie *P. vivax* (malária vivax). Em laboratório, derivados desta droga foram produzidos - TERPY E DPPB - com a finalidade de encontrar novos fármacos contra a malária. Dessa forma, este estudo avaliou se todos estes medicamentos conseguem impedir a transmissão do parasita do homem para o mosquito e também se consegue matar o mosquito, contribuindo para redução da transmissão da doença. Para isto, foi coletado sangue de pessoas com malária vivax e a este sangue foi adicionado a atovaquona e os outros medicamentos produzidos (derivados), depois este sangue foi utilizado para alimentar mosquitos que são criados em uma colônia no laboratório. Em outro momento, estes mosquitos ficaram expostos a esses medicamentos por um sistema de exposição (como se estivessem pousado em um mosquiteiro impregnado) em diversas concentrações dos medicamentos a fim de verificar se (1) os mosquitos pós alimentação com sangue infectado com malária vivax continuam a transmitir a doença; (2) se os mosquitos tem a produção de ovos impactada e (3) se morrem mais quando comparado com o grupo que não foi exposto a estes medicamentos. Verificou-se que esses medicamentos tem efeitos sobre a malária no mosquito, tanto quando ele ingere sangue com malária que teve o medicamento adicionado durante esta alimentação quanto quando ele é exposto aos medicamentos simulando um mosquiteiro impregnado. Mas o efeito dos medicamentos foi melhor nos experimentos realizados com eles inseridos no sangue em que os mosquitos se alimentaram. Também foi observado em alguns experimentos que além de bloquear a transmissão os medicamentos também impactam a vida dos mosquitos – ou seja – eles morrem mais rápido quando comparado com o grupo que não foi exposto. Mas, de forma geral, o medicamento atovaquona mostrou resultados melhores em todas as técnicas testadas em relação aos medicamentos derivados.

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Áreas de transmissão de malária no mundo. Fonte: CDC, 2021.....	2
Figura 2: Estimativa do número de óbitos de malária no mundo. Fonte: Adaptado de WHO - World malaria report 2021.....	3
Figura 3. Casos de malária no Brasil entre 2009 e 2020. Fonte: Dados do Ministério da Saúde, Brasil (2021).	4
Figura 4. Mapa mostrando as áreas com risco de transmissão de malária no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde, 2022.....	6
Figura 5: Distribuição mundial das espécies de Anopheles spp.. Fonte: Sinka et al. 2012	7
Figura 6. Mapa dos sistemas de transmissão de malária no Brasil. Fonte: Hiwat et al, 2022	9
Figura 7. Ciclo biológico do Anopheles. Fonte: Adaptado de Lima, 2016.....	10
Figura 8. Ciclo de vida do Plasmodium vivax spp. no hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de e Flannery et al. 2019.	13
Figura 9. Ciclo de vida de Plasmodium spp. em Anopheles spp. Fonte: adaptado de Shaw & Catteruccia, 2018.....	14
Figura 10. MILD - Mosquiteiros Impregnados de Longa duração. Fonte: SESAU, 2018.....	17
Figura 11. Estruturas químicas da ubiquinona e Atovaquona. Fonte: Adaptado de Sousa, 2021.	20
Figura 12. Cadeia respiratória mitocondrial no plasmódio. Fonte: Adaptado de Sousa, 2022.	22

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figura 1. Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de <i>P. vivax</i>	27
Figura 2. Pré exposição de <i>An. darlingi</i> à ATQ e TERPY tem efeito no bloqueio de transmissão de <i>P.vivax</i>	28
Figura 3 . Experimento 1 - Curvas de sobrevivência de <i>An. darlingi</i> expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY. E.	29
Figura 4. Experimento 2 - Curvas de sobrevivência de <i>An. darlingi</i> expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY.....	30
Figura 5. Experimento 3 - Curvas de sobrevivência de <i>An. darlingi</i> expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY.....	31
Figura 6. Experimento de oviposição de <i>An. darlingi</i> expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY.....	32

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Tabela 1. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de <i>P. vivax</i>	25
Tabela 2. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e DPPD no bloqueio de transmissão de <i>P. vivax</i>	26
Tabela 3. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de <i>P. vivax</i> na pré exposição de <i>An. darlingi</i>	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

ATQ	Atovaquona
°C	Graus Celsius
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS <i>saline</i>)	Fosfato tampão salino (do inglês: <i>Phosphate buffered</i>
DMFA	Ensaio de alimentação direta por membrana
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
MILD	Mosquiteiros impregnados de longa duração
BRI	Borrifação Intradomicilar
FDA	Food and Drug Administration
TCAs	Terapia combinada baseada na artemisinina

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária: Aspectos Gerais e breve histórico	1
1.2 Dados Epidemiológicos	2
1.2.1 Malária no mundo	2
1.2.2 Malária no Brasil	3
1.3 Vetores da Malária humana	6
1.3.3 Ciclo de vida do vetor.....	9
1.4 Agentes etiológicos da malária humana	11
1.4.1 Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i>	13
1.5 Estratégias de controle da malária	15
1.6 Antimaláricos: Breve histórico e tratamento	16
1.7 Antimalárico atovaquona: Mitocôndria como local de ação	20
1.8 Surgimento da resistência de atovaquona	22
1.9 Complexos metálicos de rutênio: TERPY e DPPD	23
2.RELEVÂNCIA	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos específicos	28
4. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	29
5. CONCLUSÃO	59
5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	59
6. REFERÊNCIAS	60
7. ANEXOS	66
7.1 EQUIPE.....	66
7.2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	67
7.3 Parecer consubstanciado do cep	69
7.4.1 Procedimentos operacionais padra (POPs)	70
7.4.1.2 Procedimentos para diluição de compostos	75

7.4.1.3 Procedimento para infecção experimental (DMFA)	78
7.4.4 Procedimento para dissecação de intestino médio e detecção microscópica.....	80
7.4.5 Procedimento para análise de fecundidade.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais e breve história

A malária é uma doença infecto-parasitária que provoca um enorme impacto na saúde, no desenvolvimento social e na economia do país. Ela é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anophele* spp., infectada por um protozoário do gênero *Plasmodium* (1). A clínica desta doença é caracterizada principalmente por febre elevada, sudorese, calafrios entre outros sintomas. Caso não seja tratada adequadamente pode evoluir para forma grave, com febre superior a 41°C, anemia intensa, icterícia, hemorragias e hipotensão arterial, podendo levar a óbito (2).

A malária surgiu provavelmente no continente Africano, de onde dispersou para as áreas tropicais e subtropicais do mundo, ocasionando elevadas taxas de incidência como também elevado índice de óbitos (3). Os primeiros relatos de malária foram encontrados em textos religiosos e médicos da antiguidade com mais de 4000 anos; como exemplos temos documentos chineses de 2.700 anos a.C., escrituras hindus do sexto século a.C. e papiros egípcios de 1570 a.C (3,4).

O filósofo grego Hipócrates (460 a 377 a.C.), foi o primeiro a fazer relação entre os pântanos e a ocorrência de febres na população como relatado em seu livro Ar, Água e Lugares e no início do século XIV a doença começou a ser conhecida como mal'aria (ar ruim) pelos italianos, além do mais os franceses criaram o termo "paludismo", o qual significa pântano para se referir a malária que poderia ser encontrada nesses lugares (3,4)

A descoberta do agente etiológico da malária ocorreu em 1880 por Charles Louis Alphonse Laveran, médico francês (Nobel de Fisiologia (atual Medicina 1907), o mosquito vetor foi identificado primeiramente por Ronald Ross pela malária aviária (mosquitos da família Culicidae) em 1897 e a transmissão humana (gênero *Anopheles*) por um grupo de cientistas italianos (Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava) entre 1898 e 1900 (3,5).

1.2 Dados Epidemiológicos

1.2.1 Malária no mundo

A ocorrência dos casos de malária se concentra principalmente em áreas tropicais e subtropicais, acometendo desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas do mundo (6,7) (**Figura 1**). Mais de 90% dos casos humanos ocorrem nas três principais florestas tropicais e adjacências do mundo: Floresta Amazônica (Brasil, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Suriname, Guiana Francesa e Guiana), Bacia do Congo e região do Grande Mekong no Camboja, localizado no Sudeste da Ásia (8). Em áreas de elevada transmissão, os grupos mais vulneráveis são crianças as quais apresentam sistema imunológico ainda em formação e mulheres grávidas, que possuem sua imunidade reduzida devido à gravidez (7).

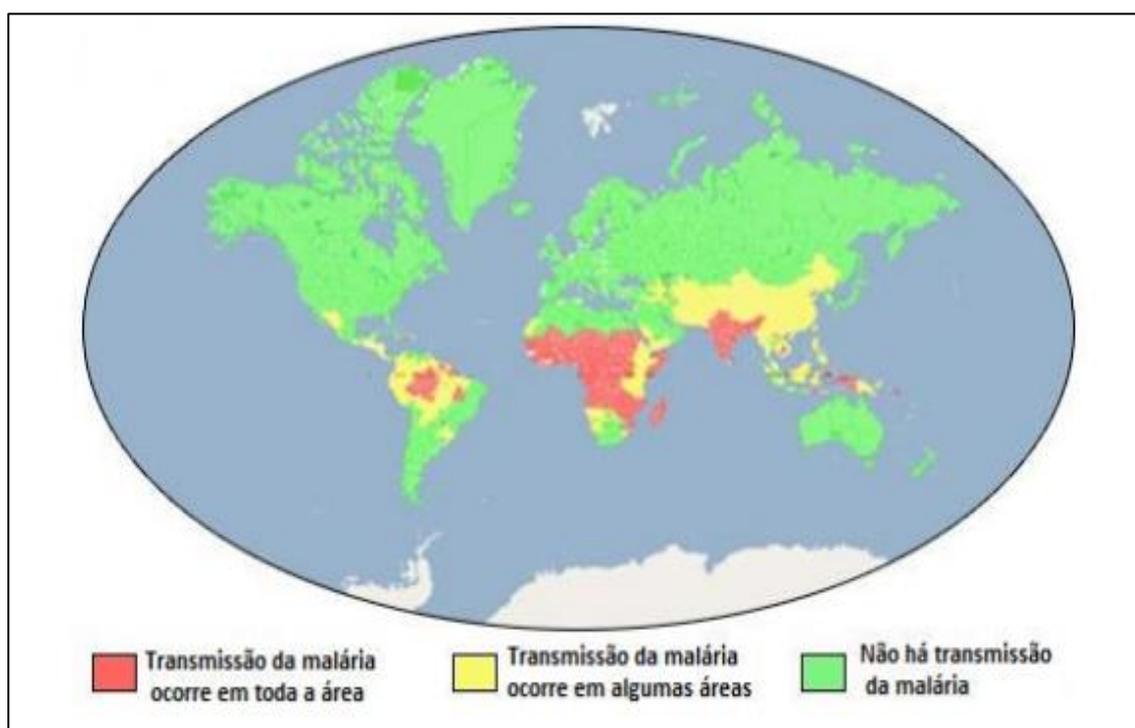


Figura 1. Áreas de transmissão de malária no mundo. **Fonte:** CDC, 2021.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) foram estimados 241 milhões de casos de malária em 2020 em 85 países endêmicos comparado a 227 milhões de casos em 2019. Vinte e nove países foram responsáveis por 96% dos casos de malária, sendo seis países – Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3,4%) e Burkina

Faso (3,4%) responsáveis por 55% do total de casos de 2020. Além do mais estima-se que tenha ocorrido 627 mil óbitos por malária no mundo, isso é, um aumento de 12% comparando a 2019 que foi notificado 558 mil óbitos (**Figura 2**), sendo Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3%) e Burkina Faso (3%) países que contabilizaram metade dos óbitos por malária (9).

Esse aumento de casos de malária e de óbitos se deve principalmente às interrupções de ações para o combate à doença durante a pandemia de Covid-19 (9). Em todo o mundo, em 2021 os casos de malária continuaram subindo, mas em ritmo mais lento que entre 2019 e 2020 onde o total de casos alcançou 247 milhões. Os óbitos por malária reduziram de 625.000 em 2020 para 619.000 em 2021 (10).

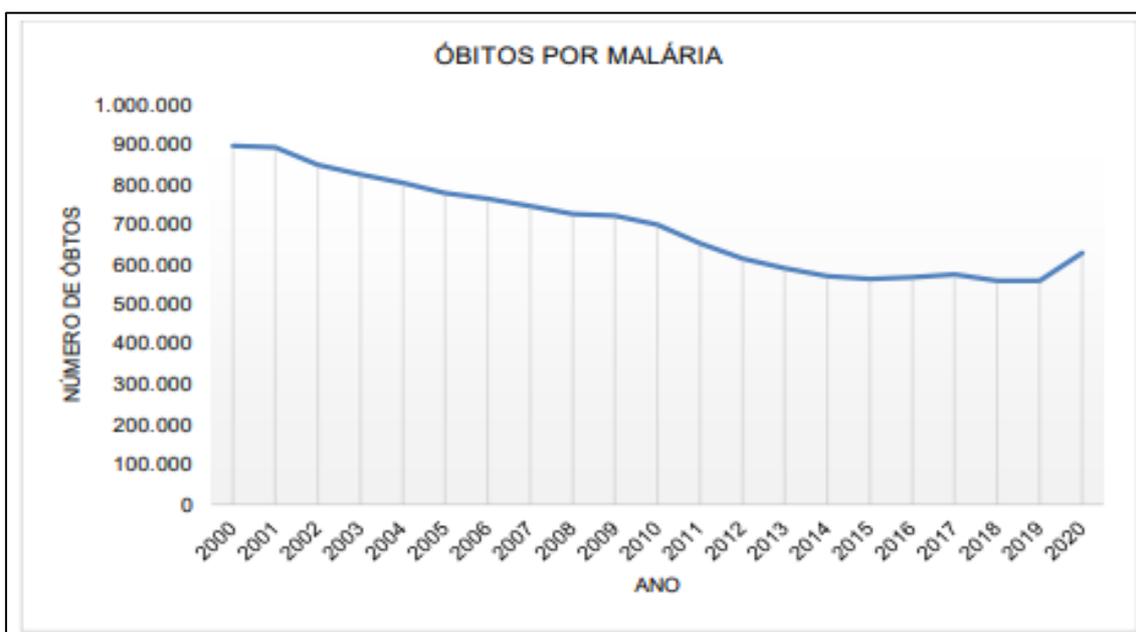


Figura 2: Estimativa do número de óbitos de malária no mundo. **Fonte:** Adaptado de WHO - World malaria report 2021.

1.2.2 Malária no Brasil

No Brasil, a malária é endêmica e cerca de 99% da transmissão ocorre na região da Amazônia Legal, que é composta por nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), apresentando elevada heterogeneidade na transmissão (11) (**Figura 4**). Em relação ao número de casos de malária no Brasil, verificou-se uma queda no

número entre os anos de 2010 (334.741 casos) e 2016 (129.242), porém, nos dois anos seguintes (2017 e 2018) o número de casos aumentou pouco mais de 50% (para 194.571 em 2018); já nos anos de 2019 e 2020 houve uma nova redução (145.194 casos em 2020) (**Figura 3**) (12).

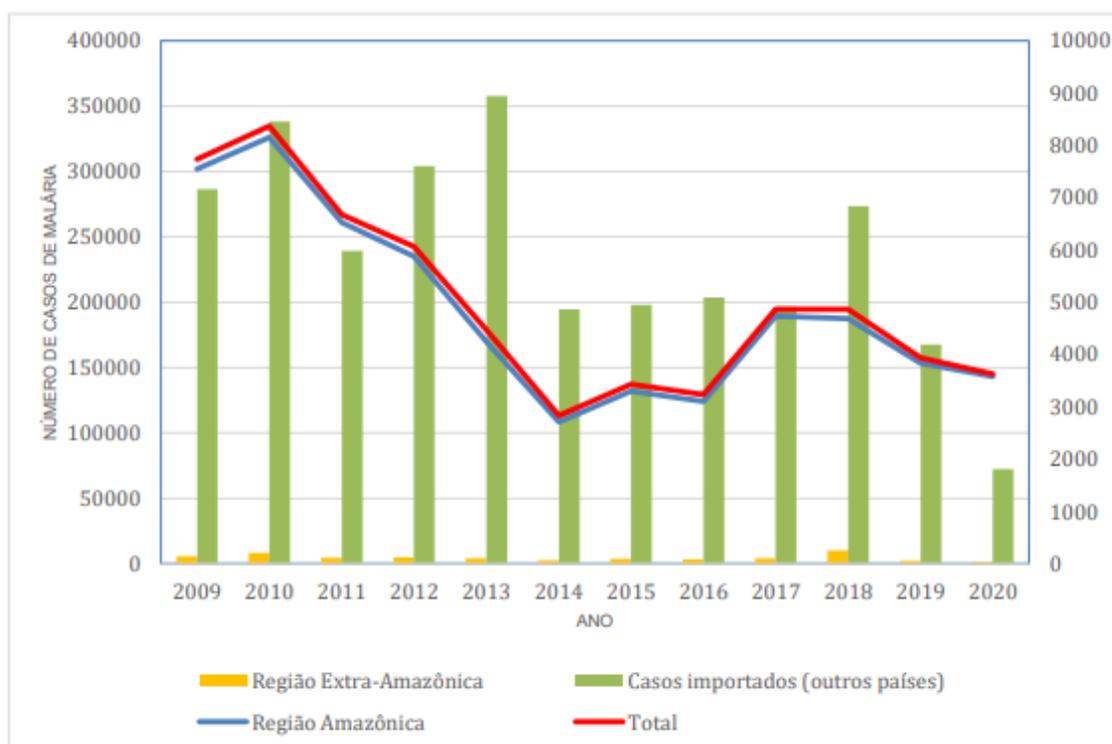


Figura 3. Casos de malária no Brasil entre 2009 e 2020. **Fonte:** Dados do Ministério da Saúde, Brasil (2021).

Em 2021 houve uma redução de 4,1% em relação ao ano de 2020, tendo sido registrados um total de 139.211 casos, e em 2022 foram registrados 128 mil casos de malária, sendo uma redução de 7,8% (12). Do total de casos, 99% ocorreram na região amazônica brasileira, onde o Estado do Amazonas apresentou o maior número de casos (39%), seguido pelo Pará (19,5%), Roraima (17,1%), Amapá (9,8%), Acre (7,3%), Rondônia (4,9%) e Mato Grosso (2,4%) (13).

No Brasil, foram registrados 44 óbitos em 2020, isso representa um aumento de 18,9% em relação a 2019, quando foram registrados 37 óbitos. Esse aumento de óbitos se deve possivelmente aos crescentes casos de malária causada por *P. falciparum* e malária mista, que estão associados aos quadros mais graves da doença. Além disso, o cenário pandêmico de Covid-19 influenciou na demora em buscar diagnóstico e tratamento. Em 2021, foi

observado novamente um aumento no número de óbitos, com 58 mortes no total, e 50 em 2022, representando uma redução de 11 % em relação a 2021 (14).

No Brasil, a área de maior endemicidade da malária é a região da Amazônia Legal (**Figura 4**), composta por nove estados brasileiros (Amazonas, Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Tocantins, Pará, Mato Grosso e Maranhão), que concentra mais de 99 % dos casos. Vale destacar que, apesar da Amazônia Legal ser uma área de alto risco para ocorrência de malária, a distribuição dos casos é heterogênea, pois os estados e municípios que compõem a referida região apresentam perfis epidemiológicos diferentes (12,15)

O Amazonas encerrou o ano de 2022 com a notificação de 50.514 casos de malária. Esse dado representa redução de 17,4% em relação a 2021 (61.166 casos) e é o menor número de casos da doença nos últimos quatro anos (16). Além do mais o Amazonas registrou uma redução de mortes por malária em 2022, onde segundo a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-AM), foram sete óbitos, enquanto em 2021 foram 12.

Na região amazônica em 2020, a maior parte dos casos autóctones de malária concentrou-se em regiões rurais e áreas indígenas com 41,2% (58.403) e 34,0% (48.242) do total de casos do ano, respectivamente. Em áreas rurais ocorreu uma redução de 13,3% em relação ao ano de 2020 tendo sido registrados 50.609 casos. Quanto aos casos de malária em áreas indígenas, houve redução de aproximadamente 5,4%, tendo sido registrados 45.642 casos autóctones. Nas áreas indígenas, 24,9% (11.367) dos casos autóctones foram de malária por *P. falciparum* e malária mista (14)

As áreas de garimpo registraram um aumento expressivo no número de casos, sendo consideradas áreas também de grande importância epidemiológica para a doença. Em 2020 tinham sido registrados 14.086 casos autóctones nessas áreas, enquanto, em 2021, foram registrados 20.468 casos, representando um aumento de 45,3% (14).

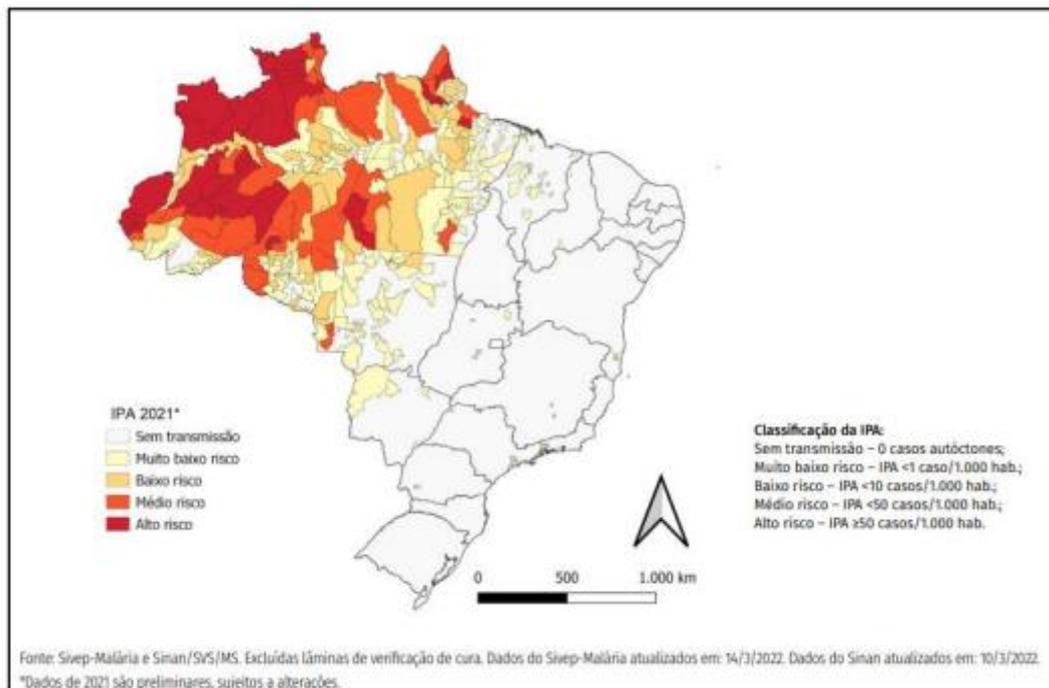


Figura 4. Mapa mostrando as áreas com risco de transmissão de malária no Brasil. **Fonte:** Ministério da Saúde, 2022

O número de casos de malária vem oscilando ao longo do tempo no país e no mundo, entretanto houve uma redução significativa de 600 mil para 150 mil casos de malária entre 2007 e 2016 no Brasil. Essa redução se deve principalmente as ações do Programa Nacional de Controle de Malária, que implementou estratégias de controle, baseadas principalmente na busca ativa de pacientes, na ampliação do número de microscopistas e no diagnóstico e tratamento na fase inicial da infecção (12,17).

Atualmente, o objetivo do plano nacional de eliminação é reduzir o número de casos de malária para 68 mil até 2025, seguido por menos de 14 mil casos até 2030 e por fim, a eliminação da doença até 2035 (18). Apesar de ser observada pequenas reduções de casos de malária ao longo dos anos, atingir as metas propostas pelo plano nacional de eliminação continua sendo um desafio, e tendo em vista o cenário mundial atual, esse objetivo parece estar cada vez mais distante, sendo necessário novas estratégias para o combate à malária.

1.3 Vetores da Malária humana

Os mosquitos transmissores da malária pertencem à seguinte classificação taxonômica: Classe Insecta, Ordem Diptera, Sub-Ordem Nematocera, Família Culicidae, Sub-Família Anophelinae e Gênero *Anopheles*. Taxonomicamente o gênero *Anopheles* é constituído por seis subgêneros: *Cellia*, *Stehomya*, *Lophopomyia*, *Anopheles*, *Kertezia* e *Nyssorhynchus*. Dentre estes, somente os subgêneros *Anopheles*, *Kertezia* e *Nyssorhynchus* possuem importância médica (19,20)

Atualmente, são conhecidas cerca de 500 espécies do gênero *Anopheles* e destas, 70 espécies são vetores da malária no mundo (**Figura 5**) (21). No Brasil ocorrem cerca de 55 espécies e as principais espécies transmissoras estão inseridas no subgênero *Nyssorhynchus*: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry 1932 e *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis (Nyssorhynchus) Lynch-Arribalzaga*, 1878 (22).

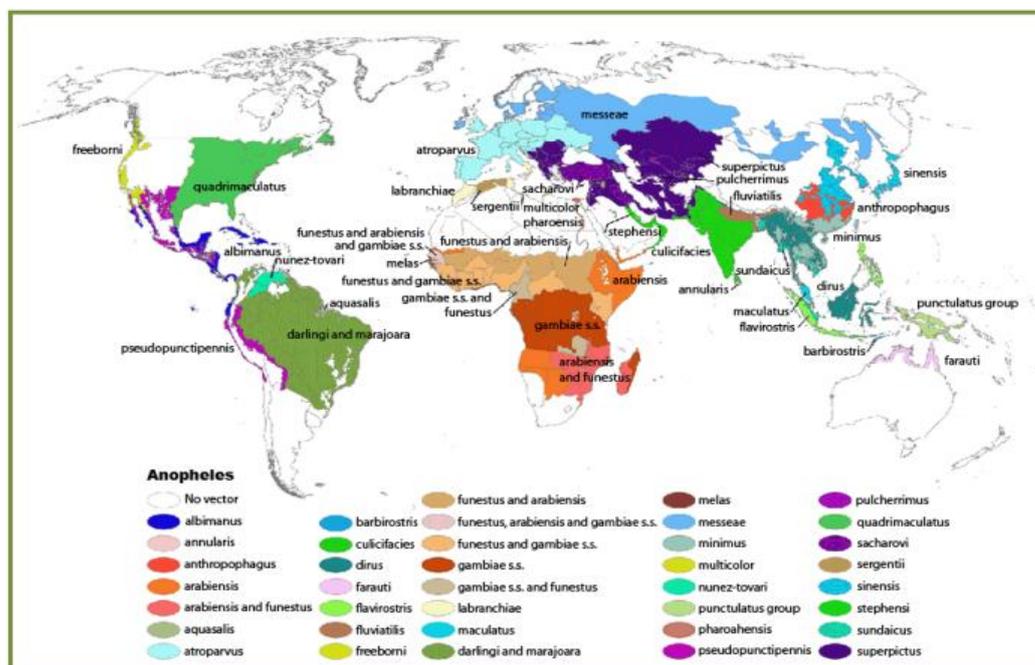


Figura 5: Distribuição mundial das espécies de *Anopheles* spp.. **Fonte:** Sinka et al. 2012

Existem três sistemas de transmissão de malária distintos no Brasil, os quais são sustentados por diferentes espécies de *Anopheles* spp. e que apresentam características eco-epidemiológicas distintas (22). Um dos sistemas mais importante de transmissão está localizado na região da Floresta Amazônica e tem como principal vetor o *An. darlingi* Root, 1926. Outro sistema estável e menos relevantes ocorre na Mata Atlântica e envolve as espécies do gênero de *An. cruzii* Dyar & Knab, 1908 e *An. bellator* Dyar & Knab, 1906. Por fim, o terceiro sistema, menos perceptível, responsável pela ocorrência dos surtos de malária, principalmente por *P. vivax*, é encontrado ao longo do litoral brasileiro e tem como vetor principal o *An. aquasalis* Curry, 1932 (23) **(Figura 6)**.

O *Anopheles darlingi* é considerado um importante vetor de malária na América do Sul, principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela sendo também o mais perigoso vetor de sua região, por ser eficaz na transmissão do *Plasmodium* para os seres humanos e se encontrar em abundância na Amazônia (24). Seu sucesso como vetor está associado a seus hábitos endofílicos, antropofílicos, crepusculares e noturnos, e a sua capacidade de adaptação a diversos ambientes (24). Em condições de laboratório, infecções experimentais realizadas através de membrana artificial, *An. darlingi* tem apresentado altas taxas de infecção por *P. vivax*, desenvolvendo alta intensidade de infecção por oocistos e esporozoítos (25–27)

Para a oposição e desenvolvimento larval, ele costuma utilizar corpos d'água naturais e artificiais, como lagoas, margens de rios, poças e campos encharcados, tendo preferência por águas limpas contendo matéria orgânica, vegetação aquática e sombreamento. Esta espécie ainda apresenta incertezas em relação ao seu bioma e comportamento, principalmente no que diz respeito aos hábitos alimentares, de descanso e periodicidade, que podem ser diferentes conforme a localidade (28).

Anopheles aquasalis é considerado um vetor de menor importância por suas características zoofílicas e exofílicas, ele é o único membro do subgênero *Nyssorhynchus* que normalmente se reproduz em água salgada. Seu envolvimento na transmissão da malária é significativo nas áreas costeiras da Venezuela para o sudeste do Brasil. Essa espécie se encontra ao longo do litoral, em algumas localidades a aproximadamente 100 e 200 km da costa e em solos ricos em cloreto de sódio, como é o caso de algumas áreas do sertão nordestino

ou em regiões onde ocorre invasão das marés, como Belém, no Pará (**Figura 6**) (29) .

Embora existam exemplos dessa espécie sendo encontrada em corpos d'água turvos e de fluxo lento, geralmente, eles possuem preferência por águas límpidas, paradas e não poluídas, como piscinas de riachos, manguezais, pântanos de grama, lagoas e valas, sendo iluminados pelo sol contendo vegetação emergente, tanto em água salobra como em água doce (30). Esta espécie, além de suscetível ao *P. vivax*, é facilmente colonizada em condições de laboratório, sendo estenogâmica capaz de copular em espaços pequenos, e por estes motivos, tem sido utilizado com sucesso para estudos de interação parasito-hospedeiro (30,31)



Figura 6. Mapa dos sistemas de transmissão de malária no Brasil. **Fonte:** Hiwat et al, 2022

1.3.3 Ciclo de vida do Vetor

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são insetos holometábolos, isto é, apresentam metamorfose completa em seu ciclo evolutivo. Possuem o ciclo de vida constituído por quatro estágios de desenvolvimento, sendo eles, ovo, larva

(estádios L1, L2, L3, L4), pupa e adulto (**Figura 7**). Os três primeiros estágios ocorrem em meio aquático, enquanto que o último é terrestre (21).

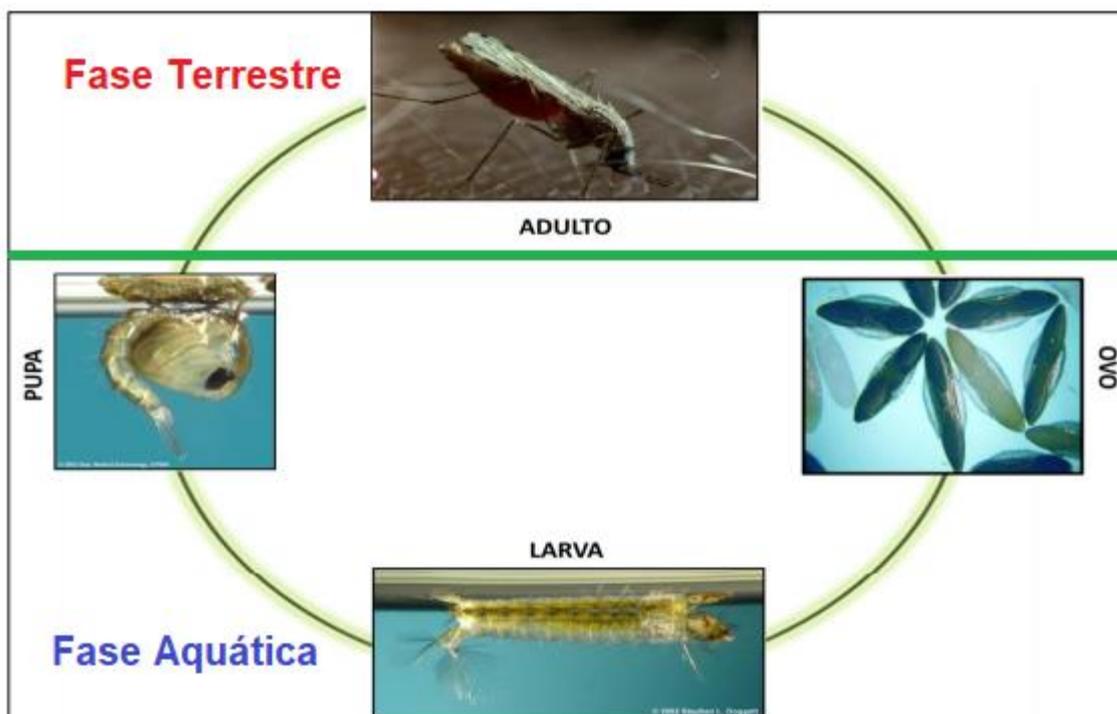


Figura 7. Ciclo biológico do Anopheles. **Fonte:** Adaptado de Lima, 2016

Os ovos dos anofelinos são depositados de forma isolada diretamente na água limpa, parada ou com pouca correnteza e flutuam devido à presença de expansões laterais (flutuadores) que contêm ar. Esses ovos possuem, morfologicamente, aspecto alongado e simetria lateral. O tempo de eclosão varia entre 2 a 3 dias, entretanto esse tempo depende da temperatura e da umidade, não sobrevivendo a baixas temperaturas nem a desidratação (21) .

As larvas de anofelinos são morfologicamente semelhantes a de outros culicídeos, mas são desprovidos de sifão respiratório posterior, possuindo um aparelho espiracular dorsal que auxilia as larvas a ficarem em postura horizontal ou paralela à superfície da água, no qual se alimentam e respiram (46). Essas larvas necessitam de cerca de 7 a 10 dias para se desenvolverem, entretanto, esse tempo pode ser variável de acordo com a espécie, fatores bióticos e abióticos. Após esse período, as larvas sofrem metamorfose em pupas (18).

A pupa é a forma imatura que sucede os quatro estádios larvais e que se localizam na superfície da água, onde respiram. Este estágio pode durar de 1 a

3 dias. A depender da espécie, os anofelinos não se alimentam nesta fase e sofrem modificações necessárias para formar os adultos (26,30).

Quando o inseto adulto completamente formado emerge, este abandona a água e vai para um abrigo. Ao pousar, mantém o corpo e a probóscide em linha reta, o que permite diferenciá-lo dos demais culicídeos. O corpo dos adultos é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome. As fêmeas desse gênero são hematofágicas, sendo necessário para nutrição e produção de seus ovos, podendo se alimentar de sangue humano, mas algumas espécies preferem sangue de animais como no caso do *An. aquasalis*. No geral, os anofelinos vivem entre 2 a 30 dias (26,30).

1.4 Agentes etiológicos da malária humana

A malária é uma doença causada por protozoários cuja classificação taxonômica é: Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae, Gênero *Plasmodium* (1).

Atualmente, são descritas seis espécies responsáveis pela malária no mundo: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium vivax* (Grassi, 1890), *Plasmodium knowlesi* (Krotoski et al, 1980) e mais recentemente *Plasmodium simium* (Deane, 1966) estas duas últimas espécies são parasitas de primatas não humanos e foram descritas causando infecção em humanos (7, 11- 14).

Plasmodium vivax é a espécie com maior distribuição no mundo, colocando cerca de 2,5 bilhões de pessoas em risco de infecção. No Brasil, o *P. vivax* é responsável por 93% dos casos reportados (31). Os desafios no controle e eliminação da malária vivax provavelmente estão relacionados com os seguintes aspectos da biologia do *P. vivax*:

1 - A existência de recaídas semanas a meses após uma infecção primária pela ativação de parasitas latentes durante seu estágio no fígado, conhecidos como hipnozoítos. Essas infecções constituem o que é chamado de reservatório de infecção do hipnozoíto. Esse reservatório traz novas infecções sanguíneas para essas comunidades, juntamente com oportunidades de transmissão progressiva (32);

2 - O alto potencial de transmissão causado por produção contínua de gametócitos (surgem na corrente sanguínea em poucas horas, enquanto em *P. falciparum* surge entre 7 a 12 dias), e alta infecciosidade aos mosquitos também se torna um desafio pro controle da eliminação (33).

3 - Ademais, é mais tolerante a baixas temperaturas do que *P. falciparum*, isso porque as formas dormentes conhecidas como hipnozoítos que permanecem latentes no fígado por longos períodos, precisam ser capazes de sobreviverem a baixas temperaturas nesse órgão humano, representando um desafio especial para o controle da malária (34,35).

Essas características facilitam a transmissão do *P. vivax* por mosquitos vetores sazonais e em temperaturas ambientais mais baixas, estendendo assim a distribuição global de *P. vivax* em regiões temperadas, representando, portanto, um desafio especial para o controle da malária (36)

1.4.1. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

É importante compreender também o ciclo de desenvolvimento do parasita no homem e no vetor para alcançar o controle da malária, como também para a identificação de moléculas-alvo a fim de prevenir ou reduzir a expansão das populações de parasitas.

Em comparação com o mosquito, o homem é o hospedeiro secundário ou intermediário. Como tal, são hospedeiros de estágios dos parasitas que não se reproduzem sexualmente. Ao se alimentar de sangue, a fêmea do mosquito *Anopheles* spp. infectada pelo *Plasmodium* spp. inocula os esporozoítos no hospedeiro humano (37). Esses esporozoítos tem tropismo para o fígado, onde irão invadir e replicar-se nas células do fígado, os hepatócitos. Após a replicação assexuada conhecida por esquizogonia, serão liberados os merozoítas nos capilares hepáticos (38) **(Figura 8)**.

Alguns dos merozoítos liberados nos capilares hepáticos se diferenciam em hipnozoítos ao invés de migrarem para corrente sanguínea, estando essa forma responsável pelas recaídas de semanas a meses após uma infecção primária, onde a ativação desses parasitas latentes traz novas infecções sanguíneas (36).

Após a replicação inicial no fígado os merozoítos irão infectar os eritrócitos no chamado ciclo eritrocítico, onde o parasita multiplica-se assexuadamente. Uma vez que o parasita se adere a um eritrócito, a membrana celular deste é deformada para formar uma junção que permite que o parasita penetre na célula usando várias estruturas de proteínas especializadas, como a PvDBP. Na célula, o parasita, que começa a ter a forma de um anel, cria o vacúolo (vacúolo parasitóforo) que o separa do ambiente intracelular do eritrócito. Alguns eritrócitos também aumentam de tamanho à medida que o parasita continua a se multiplicar por dentro (35).

O parasita continua se dividindo dentro da célula e passa por vários estágios sendo de trofozoíto jovem, maduro e finalmente, esquizonte. Estes, quando geram suas múltiplas células filhas, ocasionam a ruptura da célula hospedeira, liberando os merozoítos que irão infectar outras células vermelhas. Seguindo outro caminho, parte dos merozoítos provenientes do fígado diferenciam-se em gametócitos masculinos e femininos, onde caso outra fêmea do mosquito se alimente do hospedeiro vertebrado infectado, iniciará o ciclo sexuado no vetor (34).

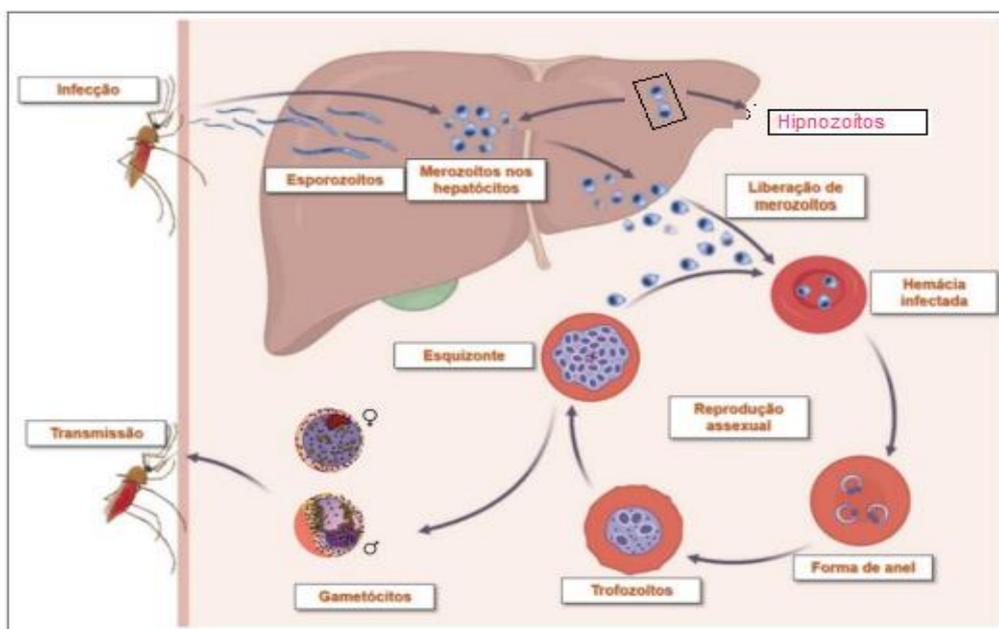


Figura 8. Ciclo de vida do *Plasmodium vivax* spp. no hospedeiro vertebrado.
Fonte: Adaptado de e Flannery et al. 2019.

O desenvolvimento do parasita em seu vetor começa quando o mosquito ingere uma porção de sangue infectado com gametócitos masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos), formas sexuais de *Plasmodium* spp. Após a ingestão, os gametócitos saem da hemácia e se diferenciam em gametas, dando início ao ciclo esporogônico (39).

No intestino do mosquito o microgameta sofre exflagelação, seguido pela formação de oito microgametas haploides. Os microgametas se desprendem do centro de exflagelação e procuram se fundir com o macrogameta, a fim de fertilizá-lo, gerando um zigoto diploide. Através do processo de meiose, o zigoto dá origem ao oocineto, forma móvel que atravessa o epitélio do intestino médio do mosquito, e uma vez alojados abaixo da lâmina basal, os oocinetos se diferenciam em oocistos redondos que se fixarão no epitélio do intestino do anofelino (34,35) (**Figura 9**).

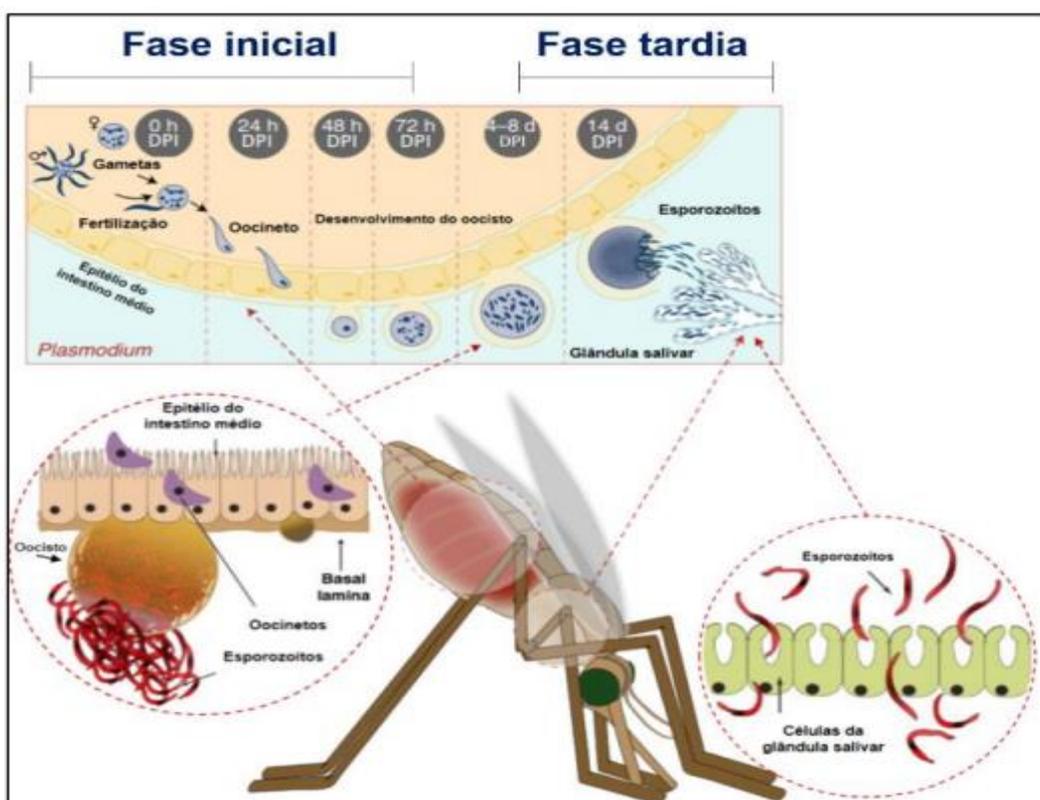


Figura 9. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. em *Anopheles* spp. **Fonte:** adaptado de Shaw & Catteruccia, 2018

Nos próximos 10 a 14 dias, cada oocisto aumenta de tamanho e sofre esporogonia para produzir milhares de esporozoítos, que são liberados na hemolinfa após maturação e rompimento dos oocistos e transportados com a

hemolinfa para as glândulas salivares do mosquito, se alojando no lúmen. Quando um mosquito infectado se alimenta de um hospedeiro humano, os esporozoítos são liberados com a saliva e depositados na pele, dessa forma fechando o ciclo de transmissão e preparando-se para o início de um novo (21,40)

1.5 Estratégias de controle da malária

O elemento fundamental no controle efetivo da malária é dispor de meios para a realização do diagnóstico precoce e tratamento imediato e adequado dos casos a fim de impedir surtos da malária (17). A detecção ativa (DAC) e passiva (DPC) de casos é uma técnica satisfatória quando utilizada de forma apropriada. Em locais de difícil acesso e com alto risco para malária se utiliza a DAC, fazendo a busca ativa de pacientes positivos para a doença, realizado a testagem tanto com assintomáticos quanto em sintomáticos (39)

Em contrapartida, a DPC deve ser introduzida em áreas de fácil acesso e baixo risco de malária, onde apenas será testado indivíduos sintomáticos (41). Essa técnica necessita um diagnóstico preciso onde a microscopia seja possível, caso não seja, testes rápidos de qualidade devem ser utilizados. A efetivação desse procedimento garante a prevenção de óbito por malária, a redução do aparecimento de casos graves, a redução de fonte de infecção e a diminuição da transmissão (17).

Uma outra medida de controle da malária é o antivetorial, combatendo a malária por meio da redução da exposição ao mosquito vetor, visto que é necessário um conhecimento prévio da área onde serão aplicadas os inseticidas (por exemplo) como também do comportamento vetorial antes da seleção das medidas antivetoriais a serem utilizadas (17).

O manejo adequado ao meio ambiente pode reduzir a densidade de anofelinos, eliminando criadouros por meio de aterro, drenagem ou limpeza da vegetação sendo recomendado para áreas urbanas e periurbanas (42). A seleção dos criadouros deve levar em consideração a proximidade deles às residências, a positividade para as espécies vetoras de importância epidemiológica, bem como o número de criadouros potenciais presentes na

área. Deve-se priorizar obras de saneamento permanentes em locais com número reduzido de criadouros (17).

O tratamento químico domiciliar foi a principal medida de intervenção na estratégia de erradicação e, ainda hoje, é um importante instrumento de controle de vetores em uso. Contudo, a borrifação intradomiciliar deve ter sua indicação avaliada, mediante os aspectos entomo-epidemiológicos da localidade, pois a aplicação desta medida sem uma indicação precisa pode comprometer sua eficácia. Quando indicada, a borrifação intradomiciliar deve ser feita com inseticidas de contato e longo efeito residual (18,42).

Os Mosquiteiros impregnados de longa duração (MILD) são mosquiteiros impregnados com substância inseticida entre os polímeros que formam suas fibras e que, além de evitar o contato do mosquito com o indivíduo permite que o vetor morra em algumas horas após entrar em contato com o mosquiteiro. Os inseticidas utilizados são da classe dos piretróides, que possuem um efeito residual que permanece por pelo menos 20 lavagens, além de apresentar uma duração de dois a cinco anos em condições de campo, dependendo da forma e frequência da lavagem (43,44).

O uso de MILD em outros países trouxe resultados favoráveis em relação à diminuição da morbimortalidade pelo agravo. Desde o ano 2003 o MILD é considerado pela OMS como uma intervenção promissora na diminuição do risco de infecção por malária (44,45)

No Brasil, os mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração (MILD) (**Figura 10**) juntamente com a borrifação residual intradomiciliar (BRI) são ferramentas utilizadas e possuem uma boa aceitação pelo público de regiões endêmicas, sendo a principal estratégia de controle vetorial recomendada pela OMS para o controle da malária. Os tipos mais utilizados são o de rede (com alfa cipermetrina a 0,67%) e os de cama (permetrina a 2%). Entretanto, nas Américas, dados da literatura apontam resistência do vetor a inseticidas principalmente na classe piretróide (36,37).



Figura 10. MILD - Mosquiteiros Impregnados de Longa duração.
Fonte: SESAU, 2018

Assim como a utilização de mosquiteiros impregnados com compostos químicos o uso de inseticidas nas populações de anofelinos da região norte do Brasil se mostram uma alternativa viável para reduzir a população de insetos e também do protozoário e conseqüentemente o número de casos por ano (46). Entretanto, os vetores acabam, por vezes, adquirindo resistência a determinados compostos químicos gerando uma dificuldade maior para esse tipo de controle enfatizando a importância de se encontrar drogas capazes de bloquear a transmissão da malária (47).

Recentemente, tem sido sugerido que o uso de compostos antimaláricos pode auxiliar na eliminação de infecções por *Plasmodium* spp. diretamente no mosquito *Anopheles* spp., usando métodos que são equivalentes ao contato do mosquito (pelo tarço) com inseticidas em um mosquiteiro ou parede, ou alimentando-os com sangue onde o composto estará diluído. Essa lógica explora o fato de que geralmente mais de 100 oocinetos de *P. falciparum* cruzam com sucesso o epitélio do intestino médio para formar oocistos, o que representa um gargalo notável para se controlar a transmissão (48).

1.6 Antimaláricos: Breve histórico e tratamento

No século XVII, muito antes da identificação do ciclo de vida do parasito da malária, padres jesuítas que acompanharam colonizadores europeus, observaram a prática popular de indígenas que utilizavam chás e bebidas preparados a partir da casca da *Cinchona* sp. para tratar febres (49). O componente ativo primordial dessa árvore é a quinina, cuja descoberta em 1820 por Pierre Pelletier e Joseph Caventau, levou ao início da comercialização da quinina como "pó-dos-jesuítas" apenas um ano depois (50).

Na Primeira Guerra Mundial, a quinina era o medicamento predominante para tratar a malária. No entanto, devido às dificuldades em obter casca de *Cinchona*, a Alemanha se dedicou à síntese de compostos antimaláricos, como a 9-aminoacrinidina, também conhecida como atabrina. Já na Segunda Guerra Mundial, os Estados Unidos começaram a produzir atabrina americana devido às complicações na obtenção da matéria-prima para extrair a quinina. Esta versão da atabrina foi administrada a soldados americanos e seus aliados como medida preventiva, mas devido a efeitos adversos e psicológicos, seu uso acabou sendo interrompido (4,51).

A escassez de quinina desencadeou a exploração de novas moléculas eficazes contra o parasito da malária. Com isso, surgiram medicamentos como a amodiaquina, primaquina, pirimetamina e cloroquina. A cloroquina emergiu como a principal escolha devido à sua acessibilidade financeira, tolerância pelo organismo, segurança e baixo potencial tóxico. No entanto, durante a Guerra do Vietnã, surgiram casos de malária resistentes à cloroquina entre os soldados, impulsionando a busca por alternativas eficazes contra cepas resistentes. Como resultado, a mefloquina e a halofantrina receberam aprovação da Food and Drug Administration (FDA) (52).

O aumento no número de cepas resistentes motivou a busca por alternativas terapêuticas eficazes que não desencadeassem resistência no parasita. Nesse contexto, a mefloquina foi adotada como tratamento contra a malária em casos de parasitas resistentes à cloroquina. A mefloquina age como um agente eficaz contra os estágios sanguíneos do parasita, reduzindo a carga parasitária e aliviando os sintomas. Embora o mecanismo exato de ação ainda não seja completamente compreendido, sugere-se que possa afetar o processo

de cristalização da hemozoína. No entanto, mesmo com suas propriedades farmacológicas promissoras, observou-se o surgimento de cepas resistentes à mefloquina (53).

Diante do constante surgimento de cepas resistentes à quinina, a artemisinina emergiu como uma alternativa promissora. Originada de forma natural a partir da *Artemisia annua*, essa substância já era utilizada pelos chineses na antiguidade no tratamento de febres. Na década de 70, a artemisinina foi isolada e sua eficácia antimalárica foi descoberta, sendo empregada no tratamento da malária em soldados durante a Guerra do Vietnã. A partir desse marco, a artemisinina serviu como base para o desenvolvimento de novos compostos análogos, como artesunato, diidroartemisinina e arteméter (54,55)

A artemisinina e seus derivados, como o artesunato, o ácido artenílico e a diidroartemisinina, surgiram como soluções para enfrentar o crescente desafio representado pelo aparecimento contínuo de plasmódios resistentes às terapias convencionais (56). A eficácia da artemisinina provém de sua capacidade de ação rápida na supressão da parasitemia, atuando nas formas sanguíneas evolutivas do parasita, bem como nos gametócitos. Quando associada a outros antimaláricos, pode eliminar a infecção (55)

Atualmente, o tratamento da malária é baseado em terapias combinadas, com o objetivo principal de agir contra o parasito por meio de múltiplos alvos bioquímicos, conforme diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020. A OMS recomendou combinações de medicamentos que atuam em diferentes vias metabólicas para combater o protozoário, reduzindo o risco de desenvolver resistência a cada medicamento (57)

Devido à eficácia comprovada da artemisinina e seus derivados, a terapia combinada baseada na artemisinina (TCA) foi adotada. Nesse regime, a artemisinina ou seus derivados são associados a um ou mais outros medicamentos. Importante notar que a artemisinina e seus derivados não devem ser usados como tratamento único por via oral. A combinação de dois princípios ativos diferentes em um único comprimido, são altamente recomendadas, uma vez que melhoram a adesão ao tratamento em comparação com o uso de vários comprimidos ou cápsulas individuais (58).

Embora demonstrem eficácia contra o plasmódio, a preocupação com a resistência do protozoário ainda persiste. De acordo com dados da OMS, houve relatos de falhas terapêuticas em pacientes que estavam utilizando TCAs em vários países, incluindo o Brasil. No período entre 2015 e 2017, o Brasil registrou cepas de *P. falciparum* resistentes aos esquemas de tratamento com arteméter/lumefantrina e artesunato/mefloquina (58,59)

1.7 Antimalárico atovaquona (ATQ): Mitocôndria como local de ação

O planejamento e desenvolvimento da atovaquona estão relacionados à escassez de quinina durante a Segunda Guerra Mundial. A busca por um novo medicamento antimalárico resultou na investigação de várias substâncias do grupo das hidroxinaftoquinonas (60)

A ATQ é um fármaco pertencente à classe das naftoquinonas que possui amplo espectro de ação frente a doenças infecciosas. Dentre algumas delas, podemos citar atividade: antifúngica e antiprotozoária, e quando combinado com Proguanil tem sido utilizado como profilaxia da malária (61). Entretanto, a ATQ possui algumas limitações quando utilizada como monoterapia, que são elas: baixa solubilidade (41,42), absorção oral baixa (62), efeitos colaterais indesejados e contraindicação em alguns casos.

A ATQ é um fármaco sintético o qual foi planejado para se assemelhar estruturalmente com a coenzima Q10 (ubiquinona) (**Figura 11**), que está envolvida no transporte de elétrons na mitocôndria do parasito, biossíntese da pirimidina e no metabolismo energético (60).

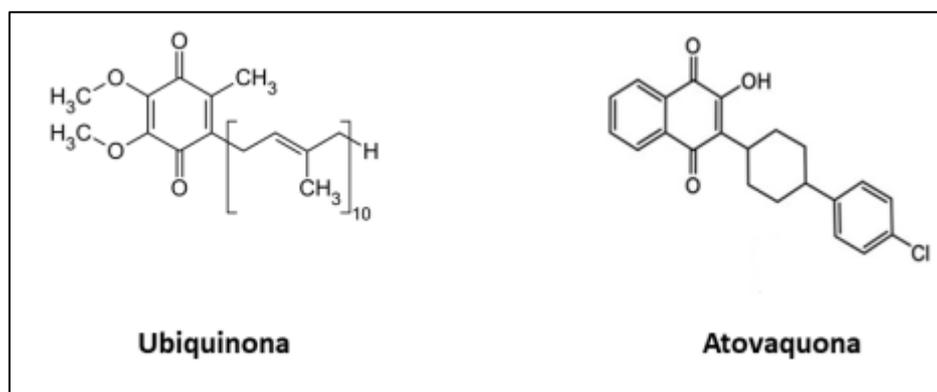


Figura 11. Estruturas químicas da ubiquinona e Atovaquona. **Fonte:** Adaptado de Sousa, 2021.

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial do plasmódio é um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos no combate da malária, isto porque a mitocôndria do parasita e humana possuem diferenças estruturais que permitem que os fármacos sejam seletivos quando possuem a mitocôndria como sítio de ação. Nesse sentido, fármacos que possuam a mitocôndria como local de ação podem agir em múltiplos alvos ao longo da cadeia transportadora de elétrons e resultar na morte do parasito como também na diminuição da parasitemia de indivíduos infectados (60).

A atovaquona inibe seletivamente o transporte de elétrons na mitocôndria no complexo citocromo bc1. Por meio dessa inibição ocorre a perda da função mitocondrial do parasito, já que este processo ocorre nos estágios proliferativos do *Plasmodium* spp., tais como os estágios sanguíneos assexuados, estágios hepáticos e no hospedeiro invertebrado, sendo essa função importante e crucial para sobrevivência do mesmo (63).

Durante o estágio eritrocítico, a mitocôndria tem como principal função o fornecimento de orotato para síntese de pirimidina através da atividade da diidroorotato desidrogenase (DHODH). Estruturalmente, por se assemelhar com a ubiquinona, a ATQ acaba inibindo o complexo bc1 do parasito, tendo como alvo o compartimento de oxidação do ubiquinol (Q0) (**Figura 12**) (60). Conseqüentemente, o complexo bc1 é bloqueado, resultando na inibição de metabólitos necessários para a síntese da pirimidina, uma molécula essencial ao parasito (47,48).

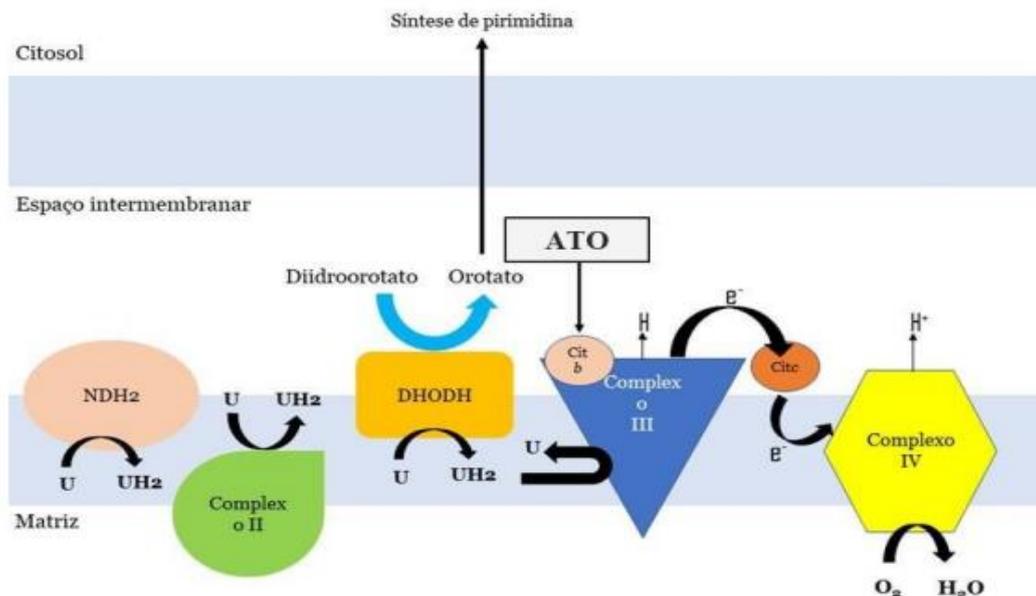


Figura 12. Cadeia respiratória mitocondrial no plasmódio. Atuação da atovaquona inibindo o complexo III da cadeia respiratória, uma parte crucial do processo de fosforilação oxidativa. A atovaquona age nessa cadeia energética, se ligando ao citocromo b e, conseqüentemente, impede a transferência de elétrons entre a ubiquinona e as enzimas mitocondriais. **Fonte:** Adaptado de Sousa, 2022.

1.7 Surgimento da resistência da ATQ

Ao mesmo tempo que a ATQ possui um grande potencial antimalárico – principalmente por possuir ação antimalárica frente aos estágios evolutivos, isto é, estágios pré-hepáticos (esporozoítos) e no hospedeiro invertebrado – observa-se o surgimento rápido de resistência ao fármaco por *P. falciparum* quando a ATQ é utilizada como monoterapia contra a malária. Dentre os mecanismos que podem influenciar na eficácia do tratamento, são as mutações no citocromo b do *P. falciparum* (PfCYTb) (64).

A atovaquona administrada em combinação com proguanil tem efeito sinérgico e, portanto, sua atividade aumentada, reduzindo assim a probabilidade de surgimento de resistência. Porém, a administração da ATQ juntamente com o fármaco o proguanil, vem demonstrando problemas de toxicidade e solubilidade, o que demonstra que o desenvolvimento de novos fármacos, derivados da ATQ, pode sobrepujar tais limitações (60).

O proguanil, quando usado sozinho, não demonstra uma potente ação antiparasitária. No entanto, quando administrado em combinação com a

atovaquona, aumenta a capacidade de colapsar a membrana mitocondrial do plasmódio, provavelmente por meio de um mecanismo sinérgico (60,65)

A administração da combinação atovaquona/proguanil é realizada por via oral, uma vez que o proguanil requer o metabolismo hepático de primeira passagem para se tornar ativo. Nesse processo, o proguanil é convertido em cicloguanil, que, por sua vez, sofre metabolização pelo sistema hepático CYP2C19. Posteriormente, o cicloguanil inibe a diidrofolato redutase do parasita (DHFR), uma enzima essencial na produção de folato e na replicação do parasita (**Figura 13**)(66,67).

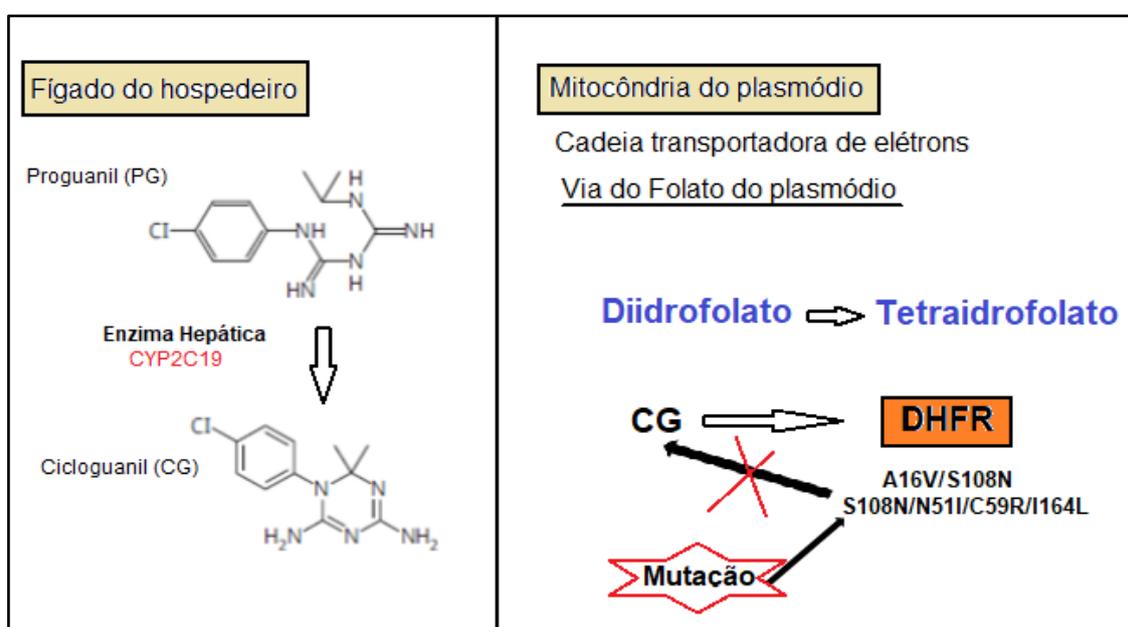


Figura 13. Mecanismo de ação e resistência do plasmódio ao Proguanil. A Atovaquona atua em sinergia com o proguanil. O proguanil precisa ser metabolizado no fígado pela enzima CYP2C19 para sua forma ativa, o cicloguanil. O cicloguanil tem como alvo a enzima DHFR na via do folato do parasita. A atividade do cicloguanil é reduzida quando ocorrem mutações na DHFR, incluindo A16V/S108N e S108N/N51I/C59R/I164L. Fonte: Adaptado de STAINES et al., 2018.

1.9 Complexos Metálicos de Rutênio: TERPY E DPPD

Dentre as classes de moléculas com potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, os compostos que formam complexo de coordenação com metais de transição apresentam atividades terapêuticas. Um complexo de coordenação é formado por um átomo metálico de transição, circundado quimicamente por moléculas orgânicas ou inorgânicas,

conhecidas como ligantes. Metais de transição são comumente usados complexados com moléculas com a finalidade de potencializar seus efeitos farmacológicos (49,50).

O desenvolvimento de compostos à base de metal vem ganhando espaço na investigação de alternativas terapêuticas para diversas doenças. Os complexos de rutênio têm sido amplamente pesquisados como agentes antitumorais, antibacterianos e antiparasitários promissores. Eles apresentam mecanismos de ação distintos associados à baixa toxicidade que possibilita a adoção como alternativa terapêutica (68).

Para formar os derivados TERPY e DPPB do ponto de vista químico, a ATQ se liga ao átomo de rutênio, através de uma bicoordenação de uma carbonila e uma hidroxila da quinona ao rutênio, formando uma espécie bicoordenada. Esta espécie bicoordenada forma um anel de cinco-membros que é estável e, portanto, evita que a naftoquinona se dissocie do complexo metálico antes de interagir com as células-alvo (**Figura 14**) (69).

Além de variar o tipo de naftoquinona utilizada na composição química dos complexos metálicos, variou-se a utilização do outro componente químico, o co-ligante, de natureza fosfínica ou piridínica. O co-ligante é importante para completar a esfera de coordenação do átomo de rutênio e auxilia na estabilidade química (70). O co-ligante fosfínico 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), se liga de maneira bidentada ao átomo de rutênio, o que resultou no derivado $[(RuCl_2(Ato)(dppb)]$ e também se liga ao ligante piridínico terpy denominado 4'-(4-piridil)-2,2':6,2''-terpiridina no qual resultou o derivado $[(RuCl(Ato)(terpy)]$ (69) (**Figura 14**).

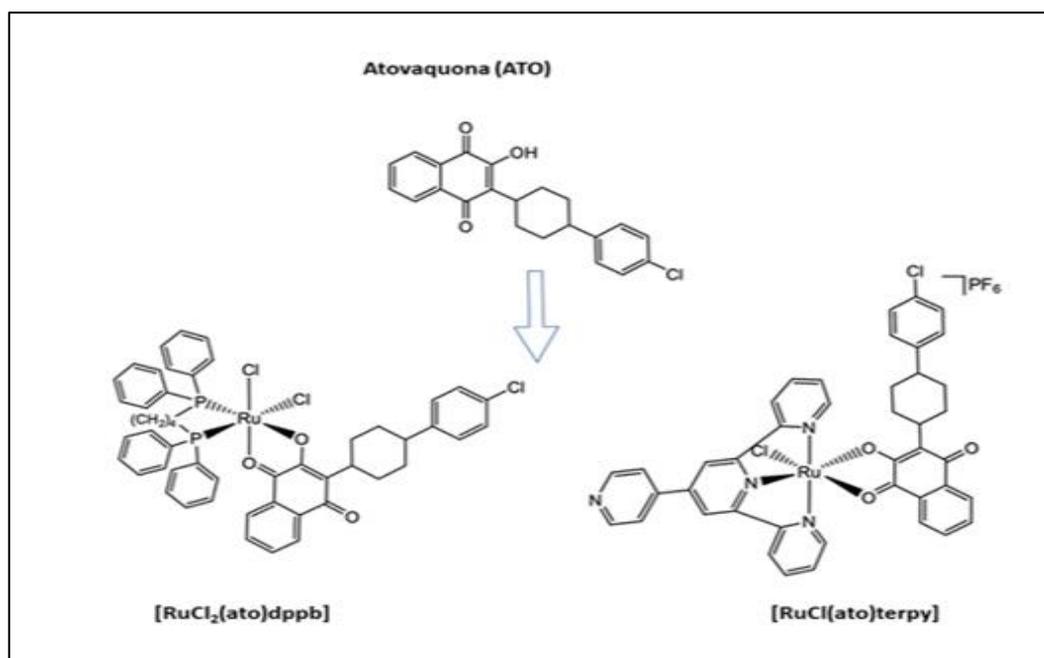


Figura 14. Estruturas químicas da atovaquona (ATO) e dos complexos metálicos estudados. PF₆ = hexafluoreto de fósforo. [RuCl₂(ato)terpy] = Derivado 1 (Terpy), [RuCl₂(ato)dppb] = Derivado 2 (Dppb). **Fonte:** Adaptado de Sousa 2021

Complexos metálicos baseados em rutênio-atovaquona que foram recentemente desenvolvidos pelos pesquisadores da Fiocruz-Bahia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/São Paulo) e da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/Minas Gerais), mostraram que a conjugação do rutênio à ATQ resultou em um composto com potência maior frente ao estágio intra-eritrocítico do *P. falciparum* quando comparado à ATQ, e com baixa toxicidade frente às células de mamíferos (69). Os derivados da ATQ, também podem ser menos susceptíveis ao rápido processo de indução à resistência ao fármaco ATQ quando usado como monoterapia, podendo atuar no alvo farmacológico da ATQ ou até mesmo interagindo com outros sítios ativos do complexo bc1 do parasito, ampliando o bloqueio do complexo bc1 e impedindo o rápido processo de indução a resistência ao fármaco ATQ (69).

2. RELEVÂNCIA

A maioria dos casos da malária no Brasil está concentrada na Região Amazônica (98% de casos), que contém os maiores remanescentes de florestas equatoriais do país, no qual vários fatores, favorecem a transmissão de doenças e dificultam seu controle. Dentre estes, pode-se citar aqueles relacionados aos aspectos socioeconômicos e ambientais, como os grandes projetos agropecuários; construção de rodovias e hidrelétricas; garimpo e mineração, os quais têm sido determinantes na dinâmica da transmissão dessa doença. Outro fator muito importante que também contribui, é a predominância em alto número de *An. darlingi*, uma espécie de vetor que possui acentuada antropofilia e suscetibilidade ao *Plasmodium* spp.

Outro obstáculo importante é a resistência que os vetores têm desenvolvido contra os inseticidas químicos utilizados. Ademais, pode ser que haja resistência cruzada a outros inseticidas diferente dos utilizados, reduzindo a disponibilidade de ferramentas ativas no controle do vetor. Desse modo, este estudo se torna relevante devido a necessidade de ferramentas ou estratégias alternativas que possam controlar com eficácia as populações de mosquitos resistentes a inseticidas ou bloquear a transmissão do *Plasmodium* spp., com ações que interfiram no ciclo do parasito no vetor.

Estudos mostram que a utilização de mosquiteiros tratados com inseticida (MILD) sem a adição de nenhuma outra estratégia são responsáveis por uma diminuição de 68% da incidência de novos casos de malária desde o início do século XXI, porém existe uma escassez de compostos aprovados para MILD e por isso é importante pesquisas voltadas na busca de medicamentos e derivados que possam ser utilizados em mosquiteiros impregnados.

O rápido declínio da eficácia desses inseticidas constitui uma emergência de saúde pública, pois esse fator ameaça reverter grande parte do progresso realizado para eliminar a malária desde a introdução das MILD. Além disso, estratégias de controle para malária com MILD e pulverização interna de inseticida residual, dependem fortemente da ação conjunta de fármacos no tratamento de *Plasmodium* spp. nas infecções em humanos.

Nesse sentido, estratégias que levem ao bloqueio da transmissão do parasito da malária dos homens aos mosquitos por serem capazes de

interromper o ciclo de vida do parasita no vetor, tendo ação citotóxica aos gametócitos ou ainda impactando na sobrevivência dos vetores podem ser importantes para a redução do número de casos e controle da doença. Desta forma, pesquisas que investiguem o potencial de bloqueio de transmissão de substâncias seja alimentando os mosquitos com drogas diluídas no sangue (potencial substância a ser administrada ao homem) ou expondo-os a superfícies impregnadas com drogas (potencial substância a ser utilizada em MILD) são relevantes e podem propiciar o desenvolvimento de uma ferramenta que possa ser usada nos programas de controle e eliminação da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade inseticida do antimalárico atovaquona e derivados sobre fêmeas de mosquitos *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium vivax* e seu papel no bloqueio de transmissão do parasita.

3.2 Objetivos Específicos:

- i. Determinar a taxa e intensidade de infecção de mosquitos fêmeas de *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium vivax* expostos a diferentes concentrações de Atovaquona e derivados;
- ii. Determinar a sobrevivência de mosquitos fêmeas de *Anopheles* spp. expostos a diferentes concentrações de Atovaquona e derivados;
- iii. Determinar a taxa de fecundidade de mosquitos fêmeas de *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium vivax* expostos a diferentes concentrações de Atovaquona e derivados;

4. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Os resultados do estudo serão apresentados no formato de artigo a ser traduzido para a língua inglesa e submetido na revista de Saúde Pública

Título:

Avaliação da atividade do antimalárico atovaquona e derivados na sobrevivência de *Anopheles* spp. e no bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax*

Aline de Sousa Santiago¹, Larissa de Sena Lamar Nunes^{2,3}, Rosa Amélia Gonçalves Santana^{2,4}, Alzir Azevedo Batista⁵, Caroline Conceição Sousa⁶, Diogo Rodrigues de Magalhães Moreira⁶, Camila Fabbri^{2,4}, Stefanie Costa Pinto Lopes^{1,2,4}

1. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil;
2. Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil;
3. Centro Universitário Fametro, Manaus Amazonas, Brasil;
4. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMTHVD), Manaus Amazonas, Brasil;
5. Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, São Paulo, Brasil
6. Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

A atovaquona (ATQ) é um fármaco atualmente prescrito em esquemas de profilaxia da malária para viajantes e pode contribuir para novas estratégias no controle da malária devido a seus efeitos na taxa de infecção dos anofelinos. Dessa forma, o objetivo geral desse estudo é avaliar a atividade inseticida do antimalárico ATQ e derivados (TERPY E DPPB) sobre fêmeas de mosquitos *Anopheles* spp. e seu papel no bloqueio de transmissão do parasita. Para isto, o efeito destes compostos foi avaliado em relação ao bloqueio de transmissão de *P. vivax* e no impacto do *fitness* (fecundidade e sobrevivência) dos anofelinos. Neste sentido, quatro grupos de *An. aquasalis* foram alimentados via ensaio de alimentação direta por membrana (DMFA) com isolados de *P. vivax* na presença de ATQ (1mM) e os derivados da ATQ - TERPY e DPPB, ambos nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. Em outro momento, fêmeas de *An. darlingi* foram analisadas frente à exposição prévia em uma superfície impregnada com ATQ (200 μ mol/m²) e o derivado TERPY nas concentrações de 2 μ mol/m², 20 μ mol/m² e 200 μ mol/m² e um grupo controle (sem composto) por 60 minutos. A partir desta exposição realizou-se três experimentos de forma independente: bloqueio de transmissão, fecundidade e sobrevivência. A fim de verificar o impacto na infectividade das fêmeas frente a exposição prévia aos compostos, realizou-se DMFA com sangue total de isolados de *P. vivax*. Após 7 dias foi realizada a dissecação dos mosquitos e contagem de oocistos de cada intestino. Para a

realização das análises da taxa de fecundidade, pós-exposição foi realizado o DMFA com sangue não infectado. Após 72 horas realizou-se a postura individual de cada fêmea. A contabilização dos ovos ocorreu todos os dias até o 3º dia pós-postura. Por fim, ainda pós exposição foi observado a sobrevida das fêmeas. Dessa forma, a quantidade mortes diárias foi contabilizada até a mortalidade total em cada grupo. A análise estatística de todos os experimentos foi realizada por meio do software GraphPad Prism vs 9.0. No ensaio de alimentação direta sem pré-exposição observou-se que a taxa de infecção foi de 2,8% no grupo ATQ – 10 μM e no grupo TERPY 1 e 10 μM , a infecção foi totalmente abolida. Os experimentos de pré- exposição, mostraram que ATQ - 200 μM e TERPY 200 μM tiveram menor taxa de infecção (4,3% e 22%) e menor taxa de intensidade (1.72 e 5.35) ($p=0001$). No 2ª experimento da sobrevida, houve diferença significativa entre os grupos Controle x ATQ ($p = 0,0080$) e os grupos Controle x TERPY 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p = 0,0341$). O 3ª experimento da sobrevida também apresentou diferença entre os grupos Controle x ATQ ($p = 0,0080$), Controle x TERPY 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p = 0,0341$) e Controle x TERPY 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p = 0,0488$). Em relação a fecundidade, apenas o primeiro experimento apresentou diferença entre os seguintes grupos: o controle A x Terpy 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p=0,0001$). O derivado TERPY demonstrou potencial bloqueio de transmissão do *Plasmodium vivax*, sendo mais potente que o derivado DPPB, entretanto quando avaliado na pré-exposição dos mosquitos, seguida da infecção experimental, verificou-se que o efeito no bloqueio da infecção no *An.darlingi* foi menos proeminente em relação a ATQ. Também verificou-se uma redução na sobrevida em comparação com o grupo controle, indicando um potencial de ação na sobrevida do *An. darlingi*, mas é necessário mais ensaios para aprofundar o entendimento dos efeitos da atovaquona e o derivado Terpy em *An. darlingi*, da mesma forma, na fecundidade deve-se realizar novos experimentos para melhor compreensão dos efeitos da atovaquona e seu derivado na postura de *An. darlingi*.

Palavras Chaves: malária, eliminação, gametócitos, oocistos, *Anopheles darligi*

1.INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecto-parasitária que provoca um enorme impacto na saúde, no desenvolvimento social e na economia do país. Ela é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* spp., infectada por um protozoário do gênero *Plasmodium* (21). A clínica desta doença é caracterizada principalmente por febre elevada, sudorese, calafrios entre outros sintomas. Caso não seja tratada adequadamente pode evoluir para forma grave, com febre superior a 41°C, anemia intensa, icterícia, hemorragias e hipotensão arterial, podendo levar a óbito (2).

No Brasil, a área de maior endemicidade da malária é a região da Amazônia e o *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária nessa região, transmitindo o *Plasmodium vivax*, um dos parasitas causadores da doença (21,71). A região amazônica enfrenta desafios significativos no controle da malária devido à vasta biodiversidade e condições favoráveis à reprodução do mosquito vetor (46,72). O *P. vivax* é especialmente prevalente na região, contribuindo para a alta

incidência de casos de malária. O controle eficaz envolve estratégias integradas, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, tratamento rápido e eficaz dos casos, e ações voltadas para o controle do vetor (12,15).

Desde a virada deste século, os esforços para prevenir a transmissão desses parasitas através da distribuição em massa dos mosquiteiros tratados com inseticida têm sido extremamente bem-sucedidos e levaram a uma redução sem precedentes nas mortes por malária. No Brasil, os mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração (MILD) juntamente com a borrifação residual intradomiciliar (BRI) são ferramentas utilizadas e possuem uma boa aceitação pelo público de regiões endêmicas, sendo a principal estratégia de controle vetorial recomendada pela OMS para o controle da malária. Entretanto, nas Américas, dados da literatura apontam resistência do vetor a inseticidas principalmente na classe piretróide (36,37), enfatizando a importância de se encontrar drogas capazes de bloquear a transmissão da malária (47).

Recentemente, tem sido sugerido que o uso de compostos antimaláricos pode auxiliar na eliminação de infecções por *Plasmodium* spp. diretamente no mosquito *Anopheles* spp., usando métodos que são equivalentes ao contato do mosquito (pela tela) com inseticidas em um mosquiteiro ou parede, ou alimentando-os com sangue onde o composto estará diluído. Essa lógica explora o fato de que geralmente mais de 100 oocinetos de *P. falciparum* cruzam com sucesso o epitélio do intestino médio para formar oocistos, o que representa um gargalo notável para se controlar a transmissão (48).

A Atovaquona (ATQ) é um fármaco pertencente à classe das naftoquinonas que possui amplo espectro de ação frente a doenças infecciosas. Dentre algumas delas, podemos citar atividade: antifúngica e antiprotozoária, e quando combinado com Proguanil tem sido utilizado como profilaxia da malária (61). Entretanto, a ATQ possui algumas limitações quando utilizada como monoterapia, que são elas: baixa solubilidade (41,42), absorção oral baixa efeitos colaterais indesejados e contraindicação em alguns casos (62). Além do mais, a ATQ administrada juntamente com o fármaco o proguanil, vem demonstrando problemas de toxicidade e solubilidade, o que demonstra que o desenvolvimento de novos fármacos, derivados da ATQ, pode sobrepujar tais limitações (60).

Nesse sentido, estratégias que levem ao bloqueio da transmissão do parasito da malária dos homens aos mosquitos por serem capazes de interromper o ciclo de vida do parasita no vetor, tendo ação citotóxica aos gametócitos ou ainda impactando na sobrevivência dos vetores podem ser importantes para a redução do número de casos e controle da doença. Desta forma, pesquisas que investiguem o potencial de bloqueio de transmissão de substâncias seja alimentando os mosquitos com drogas diluídas no sangue (potencial substância a ser administrada ao homem) ou expondo-os a superfícies impregnadas com drogas (potencial substância a ser utilizada em MILD) são relevantes e podem propiciar o desenvolvimento de uma ferramenta que possa ser usada nos programas de controle e eliminação da doença. E por isso o objetivo desse estudo é avaliar a atividade inseticida do antimalárico aAtovaquona e derivados sobre fêmeas de

mosquitos *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium vivax* e seu papel no bloqueio de transmissão do parasita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Atovaquona e derivados (TERPY E DPPB) – Ambas as drogas foram sintetizadas na Fiocruz/Bahia. A atovaquona possui peso molécula (PM) de 366 g/mol, TERPY (PM) 957 g/mol, DPPB – PM 964 g/mol. A ATQ foi diluída em solução estoque (SE) de 4mg/mL, TERPY 4,4 mg/mL, e DPPB 3,5mg/mL e ambas as drogas foram armazenadas em Freezer e a partir da SE foi feita diluição seriada para prosseguir com os experimentos.

2.2 Considerações éticas – Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de seres humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) sob o registro nº 5.357.919 e o número do CAAE 57291122.5.0000.0005. Todos os sujeitos que participaram do projeto fizeram leitura e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.3 Colônia de *An. aquasalis* e *An. darlingi* – Os mosquitos da espécie *Anopheles aquasalis* e *darlingi* foram obtidos de colônias distintas e estabelecidas na Unidade de Entomologia Nelson Ferreira da FMT-HVD em Manaus, Brasil. Estas colônias foram mantidas em temperatura constante (26-28°C) e umidade relativa de 70-80%, sob um fotoperíodo 12:12 dia/noite. Os ovos foram colocados para eclodir em bacias com água, as larvas eclodidas foram alimentadas todos os dias com comida para peixe TetraMin®. Após o surgimento das pupas, elas foram retiradas e colocadas em uma gaiola coberta com malha fechada com água e uma solução de 10% de açúcar para *An. aquasalis* e 15% de mel para *An. darlingi ad libitum* (10) a fim de alimentar a forma adulta após imersão das pupas. Os mosquitos adultos foram usados para os experimentos entre 3-6 dias de idade.

2.4 Obtenção de amostras de *P. vivax* – Para a obtenção de amostras de *P. vivax*, foi coletado 10 mL de sangue de pacientes infectados por *P. vivax* a partir de duas cruzes, maiores de 18 anos que não fossem gestantes e também não tivessem feito uso de antimalárico nos últimos 60 dias. Após a coleta de sangue, todos os pacientes foram tratados seguindo as orientações do protocolo padrão para tratamento de malária vivax pelo Ministério da Saúde (11).

2.5 Ensaio de bloqueio de transmissão por DMFA – Afim de verificar se as os derivados TERPY e DPPB possuem atividade de bloqueio de transmissão, foi realizado o ensaio de DMFA, que consiste em alimentadores conectados a um sistema de mangueiras acopladas a um banho-maria, pelo qual a água circula a 36°C para manter aquecido o sangue que será fornecido às fêmeas. Entre 100 a 120 fêmeas de *Anopheles aquasalis* previamente privadas de solução açucarada a 10% por 24 horas foram divididas em quatro grupos (controle, ATQ – 10 µM, TERPY – 10 e 20 µM, DPPB- 10 e 20 µM) utilizando a aAtovaquona como droga padrão e os demais derivados em experimentos de forma independente – DPPB ou TERPY. Antes da adição das drogas ao sangue, este

foi lavado 3x com meio RMPI 1x e reconstituído com soro humano AB inativado gerando um hematócrito final de 40%. Após 60 a 120 minutos da alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram separadas em gaiolas maiores e mantidas em sala com temperatura e umidade controlada (27° e 80%) e com água açucarada *ad libitum*. Sete dias após a infecção experimental pela metodologia espécimes de cada grupo tiveram seus intestinos dissecados em PBS 1x, corados com solução de mercurocromo comercial 2% (Merbromin) e observados ao microscópio ótico a fim de contabilizar a presença de oocistos no intestino. A taxa de infecção foi determinada pela razão do número de intestinos contendo um ou mais oocistos e o número total de intestinos dissecados. A intensidade da infecção foi determinada pela mediana do número de oocistos nos intestinos dissecados.

2.6 Pré-exposição de *An. darlingi* na impregnação dos compostos ATQ e TERPY em placas de petri – Nesse experimento, as drogas foram diluídas em acetona nas concentrações de estoque de 3 a 10 mg/ml e as concentrações a serem avaliadas foram obtidas através de diluições em série. Com auxílio de uma micropipeta, colocou-se 1 mL de cada diluição nas respectivas placas de Petri de vidro de 11cm³ a fim de obter as seguintes concentrações de cada compostos: ATQ (200 µmol/m²) e TERPY (200 µmol/m², 20 µmol/m², 2 µmol/m²). As placas permaneceram em um agitador (MARCONI) até que o veículo volátil (acetona) evaporasse e o composto estivesse impregnado ao vidro e armazenadas em temperatura de 4°C envoltas por papel alumínio. As placas de controle foram produzidas de forma idêntica, usando apenas o veículo (acetona). A fim de montar um sistema de exposição, colocou-se um recipiente de plástico translúcido sobre a superfície impregnada e vedada com fita e algodão para conter a fuga de mosquitos durante a exposição. Um orifício foi aberto na parte central do recipiente para permitir a introdução de mosquitos com posterior fechamento. Grupos contendo 100 fêmeas adultas de *Anopheles darlingi* (3-6 dias de idade) foram colocadas em contato no sistema por 60 minutos, agitando a cada 15 minutos para evitar que estas repousassem na base plástica do sistema. Posteriormente, cada grupo foi transferido para gaiolas maiores a fim de realizar a infecção experimental por meio de DMFA.

2.7 Avaliação da taxa de fecundidade dos mosquitos - Para a avaliação da fecundidade, foram utilizadas 30 fêmeas de cada grupo exposto a diferentes concentrações de ATQ e o derivado TERPY, onde foram alimentadas com sangue saudável e em seguida foram separadas em gaiolas com solução de mel. Após 72h, a postura foi realizada de forma individual, onde cada fêmea foi colocada dentro de placas de Petri de 5cm³ junto a um papel filtro umedecido. Após 24h as fêmeas que depositaram seus ovos foram removidas juntamente com os papéis de filtro úmidos com os ovos depositados para contagem dos ovos com auxílio de uma lupa. os quais foram contabilizados com o auxílio de uma lupa. O mesmo processo foi repetido em 48h e 72h pós montagem da postura conforme o protocolo.

2.8 Avaliação da sobrevivência - Para isto, 30 fêmeas de cada grupo exposto a diferentes concentrações de ATQ e o derivado TERPY foram transferidas para gaiolas distintas e acondicionadas em sala com temperatura e umidade

controlada (26-28°C/ 70-80%). O número diário de mosquitos mortos foi quantificado até a mortalidade total de cada grupo.

2.9 Análise dos dados - Os dados foram analisados no software GraphPad Prisma versão 9.0 (GraphPad, USA). A normalidade dos dados foi analisada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A taxa de infecção, intensidade de infecção e a fecundidade dos mosquitos dos diferentes grupos de tratamento foram comparados com os respectivos grupos controles utilizando o teste ANOVA com pós-teste ou teste de Kruskal-Wallis ANOVA. A sobrevivência foi analisada por meio de curva com teste de Log rank. Valores de p foram considerados estatisticamente significativo quando menor que 0.05 (IC 95%).

3. RESULTADOS

3.1 A atovaquona e os derivados DPPB e TERPY possuem atividade no bloqueio da transmissão do vetor

Ambos os derivados foram testados em dois isolados de *P. vivax* na metodologia DMFA, utilizando fêmeas de *An. aquasalis*. Em relação ao derivado DPPB o controle apresentou taxa de infecção de 92,42%, enquanto os grupos tratados nas concentrações de 1 e 10 µM apresentaram 11,55% e 2,78%, respectivamente (**Figura 1.A**). A droga controle – ATQ, bloqueou totalmente a infecção. Em relação ao derivado TERPY - 1 e 10 µM, a infecção foi totalmente abolida, enquanto a taxa de infecção foi maior no grupo controle (55,5%), e a da ATQ – 10 µM foi de 2,8% (**Figura 1. B**).

No que se refere a intensidade de infecção com DPPB, verificou-se que no grupo controle houve um maior número de oocisto por intestino médio, apresentando em média 26 oocistos por mosquito. As fêmeas que receberam sangue na presença de ATQ – 10 µM, não se infectaram ($p=0,0001$). Os que foram alimentados com DPPB - 1 µM, tiveram média de intensidade de infecção de 0,14 ($p=0,0001$), e o grupo que recebeu DPPB - 10 µM teve a média de 0,02 oocistos ($p=0,0001$) (**Figura 1.C**). Em relação a intensidade de infecção da TERPY, o mesmo cenário foi observado, sendo a média do número de oocistos por intestino maior nos mosquitos do grupo controle (9,5) tendo sido observado até 45 oocistos em um único intestino. Já nos grupos, tratados (ATQ 10 µM, TERPY - 1 e 10 µM) a média da intensidade de infecção foi 0 ($p=0,0001$) (**Figura 1.D**).

3.2 Somente a ATQ parece apresentar ação no bloqueio de transmissão quando pré-exposta ao vetor

Após os resultados apresentados pela metodologia DMFA, o derivado TERPY foi selecionado para prosseguir com a metodologia de pré-exposição, seguida do DMFA. Sendo assim, 2 isolados de *P. vivax* foram utilizados de forma independente em fêmeas pré-expostas em placa de petri nos compostos ATQ

(200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) e TERPY em três concentrações (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

Em relação a taxa de infecção, aqueles que foram expostos a ATQ (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$), tiveram uma taxa de infecção menor (4,3%) comparado aos outros grupos, evidenciando a eficiência deste fármaco no teste de pré-exposição. Os mosquitos expostos a TERPY (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) foi o segundo grupo que teve menor taxa de infecção (22%). O grupo controle foi o que apresentou maior taxa de infecção (82%), em seguida o grupo de fêmeas expostas à TERPY (2 e 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) tiveram taxa de infecção de 57% e 60%, respectivamente.

A respeito da intensidade de infecção, a média de oocistos no grupo que não foi exposto ao composto foi maior (17.9) em relação aos outros grupos de tratamento (**Figura 2**). Os mosquitos que foram expostos a ATQ e TERPY de maior concentração (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$), foram os que tiveram menor número de oocistos por intestino com média respectivamente (1.72, 5.35) ($p < 0.0001$). O grupo de mosquitos expostos a TERPY (2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) tiveram a média da intensidade de infecção de 8.26, e o grupo que ficou em contato com a TERPY (20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) a média foi de 14.38 (**Figura 2**)

3.3 As drogas ATQ e o derivado TERPY impactaram na sobrevivência do vetor

Foram realizados três experimentos independentes para verificar se a sobrevivência dos anofelinos seria impactada na presença da ATQ (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) e do derivado TERPY (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

No primeiro experimento, a sobrevivência dos grupos tratados não foi diferente do grupo controle (**Figura 3**). Já no segundo experimento (**Figura 4**) foi possível observar que os grupos ATQ ($p = 0,0080$), Terpy 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p = 0,0341$) e Terpy 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p = 0,0488$) tiveram a sobrevivência diminuída quando comparado com o controle. No terceiro experimento o grupo tratado com ATQ ($p > 0,0001$) também apresentou diminuição na sobrevivência quando comparado com o controle (**Figura 5B**). Entretanto, em relação ao derivado Terpy, diferente do experimento 2, somente o grupo com a menor concentração do derivado (2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) apresentou diminuição na sobrevivência ($p = 0,0038$) (**Figura 5E**).

3.4 A fecundidade de *An. darlingi* parece não ser impactada pelas drogas ATQ e o derivado TERPY

Para a avaliação da taxa de oviposição foram realizados 3 experimentos independentes. Após a exposição das fêmeas de *An. darlingi* às drogas testadas, apenas o primeiro experimento apresentou diferença entre a ATQ ($p = 0.9462$) e a menor concentração do derivado TERPY 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ($p < 0.0001$) quando comparados com o controle, podendo assim observar uma menor oviposição no grupo tratado quando comparado com o controle (**Figura 6**). Nos demais experimentos as drogas não impactaram na oviposição das fêmeas de *An. darlingi* (**Figura 6B e C**).

4. DISCUSSÃO

Um dos grandes problemas de saúde pública se trata ainda da alta prevalência da malária, principalmente na Região Amazônica. Apesar de haver muitos medicamentos antimaláricos, entende-se que o aumento de casos de parasitas resistentes a esses fármacos aumenta a necessidade de criar estratégias eficazes que possam atuar no bloqueio de transmissão da malária, contornando os mecanismos de resistências (46,69)

A ATQ é uma naftoquinona que possuem atividade antiparasitária previamente conhecidas, sendo bem utilizada em associação com o proguanil, os quais possuem grande importância no tratamento e na profilaxia da malária, agindo na cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria, e essencial na respiração celular no parasito, e por isso vêm sendo investigada como protótipo para moléculas com potencial antiparasitário (69,72)

Os complexos metálicos [RuCl(ato)terpy]PF₆ (TERPY) [RuCl(ato)(dppb)] (DPPB) avaliados neste estudo, tiveram uma importante atividade no bloqueio de transmissão de *P. vivax* quando administrados diretamente na alimentação dos anofelinos, chegando a inibir completamente a infecção dos mosquitos, em se tratando do derivado TERPY, o que corrobora com os resultados publicados por Sousa (69), onde também verificou-se um maior potencial antiplasmodial de ação da TERPY em relação ao DPPB.

Os derivados TERPY E DPPD possuem características estruturais em comum, como a atovaquona e o rutênio, porém apresentaram comportamentos diferentes, visto que o derivado Terpy apresentou maior taxa de inibição que o DPPD além do mais, esses íons metálicos possuem a capacidade de dissociação em solução (73). Talvez as diferenças estruturais presentes no derivado TERPY, e ausentes no Derivado DPPD, tenham permitido a dissociação do metal e conseqüente atividade antiplasmodial.

Em contrapartida, quando avaliada a pré-exposição dos mosquitos a este composto (TERPY) seguida da infecção experimental, verificou-se que o efeito no bloqueio da infecção no *An. darlingi* foi menos proeminente em relação a ATQ. Este resultado pode ser devido à baixa absorção de TERPY pela cutícula do vetor, visto que uma forma de resistência que os mosquitos tem apresentado é o engrossamento da exocutícula cerosa do mosquito como uma adaptação à pressão do inseticida (20), levando a uma menor concentração do composto para a ação citotóxica ao gametócito ingerido pela alimentação ou pela sua rápida eliminação não havendo mais substância ativa para a atuação antiparasitária.

A atividade de bloqueio de transmissão da droga padrão – ATQ – quando pré-exposta ao vetor observada neste estudo foi semelhante aos resultados encontrados nos experimentos de Paton et al 2019 (8) no qual ele evidencia a atividade de bloqueio de transmissão da droga na concentração de 1mmol/m². 100 µmol/ m² e 10 µmol/m² onde os parasitas de *P. falciparum* são completamente eliminados em mosquitos fêmeas de *An. gambiae*. No nosso

estudo, verificou-se que os mosquitos de *An. darlingi* expostos a ATQ - 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, tiveram uma taxa de infecção menor (4,3%) comparado aos outros grupos, evidenciando a eficiência deste fármaco no teste de pré-exposição e os mosquitos expostos a TERPY (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) foi o segundo grupo que teve menor taxa de infecção (22%).

O composto TERPY pode ter um efeito sob os gametócitos de *P. vivax*, não sob os estágios subsequentes levando a esta menor inibição, supondo que os poucos gametócitos que provavelmente não foram inibidos e se desenvolveram em oocistos os quais foram avaliados nesse estudo. Importante destacar que somente dois ensaios foram realizados e o perfil de inibição foi bastante distinto entre eles, e, portanto, mais ensaios são necessários para avaliar o efeito deste composto no modelo de pré-exposição por impregnação.

Diferente dos resultados publicados pelo autor Paton e seus colaboradores (2019) (48), neste estudo verificou-se na análise de sobrevivência de *An. darlingi* diferença significativa entre os grupos, onde no segundo experimento verificou-se diferença entre os grupos Controle x ATQ e entre os grupos Controle x TERPY- 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, e no terceiro entre o grupo Controle x ATQ e Controle x TERPY 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Além do mais, no primeiro experimento utilizou papel filtro para impregnar a droga, talvez tenha impedido maior contato da droga com o mosquito, tendo impactado o resultado desse experimento.

O resultado do experimento de fecundidade não foi satisfatório, visto que apenas o primeiro experimento apresentou diferença entre os seguintes grupos: o controle x ATQ e controle x Terpy 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, os demais experimentos não causaram impacto nos ovos postos pelas fêmeas, o que também foi verificado nos resultados de Paton et al 2019 (48) em *An. gambiaea*. Acredita-se que foi um resultado aleatório, pois somente o primeiro obteve diferença significativa, sabendo disso é importante a realização de mais ensaios para aprofundar o entendimento dos efeitos da ATQ e o derivado TERPY na fecundidade de *An. darlingi*.

Os antimaláricos direcionados aos mosquitos têm o potencial de desempenhar um papel eficaz na redução da incidência de malária. Para isso, é essencial identificar mais compostos com forte atividade antiparasitária durante as fases de desenvolvimento do *P. vivax* no mosquito. Sendo assim, neste estudo, este fator destaca-se, já que oferece a oportunidade de explorar e reutilizar compostos que, de outra forma, não seriam adequados para uso terapêutico humano, seja devido à baixa toxicidade, baixa biodisponibilidade, cinética inadequada ou outras limitações. Isso requer a exploração das extensas bibliotecas de antimaláricos já conhecidos.

Ademais os derivados da ATQ aqui apresentados possuem na sua composição metais de transição apresentam características importantes quando se trata de meio biológico, que são elas: baixa toxicidade, estabilidade e potência quando são anexadas a fármacos ou moléculas bioativas. Essa ligação entre metal e fármaco aumenta a variedade de números de coordenação, geometria, estado de oxidação, reatividade entre outras atividades (73).

Diante do exposto, mais estudos isolados são necessários para fechar o DMFA, tanto para pré-exposição quanto sem a pré-exposição, e assim proceder com uma análise estatística mais robusta. Apesar de ter verificado diferença significativa entre os grupos na sobrevivência de *An. darlingi* é importante que mais ensaios sejam feitos para confirmar tal efeito. Em relação ao ensaio de oviposição, também deve se realizar novos ensaios para melhor compreensão dos efeitos da atovaquona e seu derivado na postura de *An. darlingi*, visto que os resultados dos experimentos realizados não foram satisfatórios.

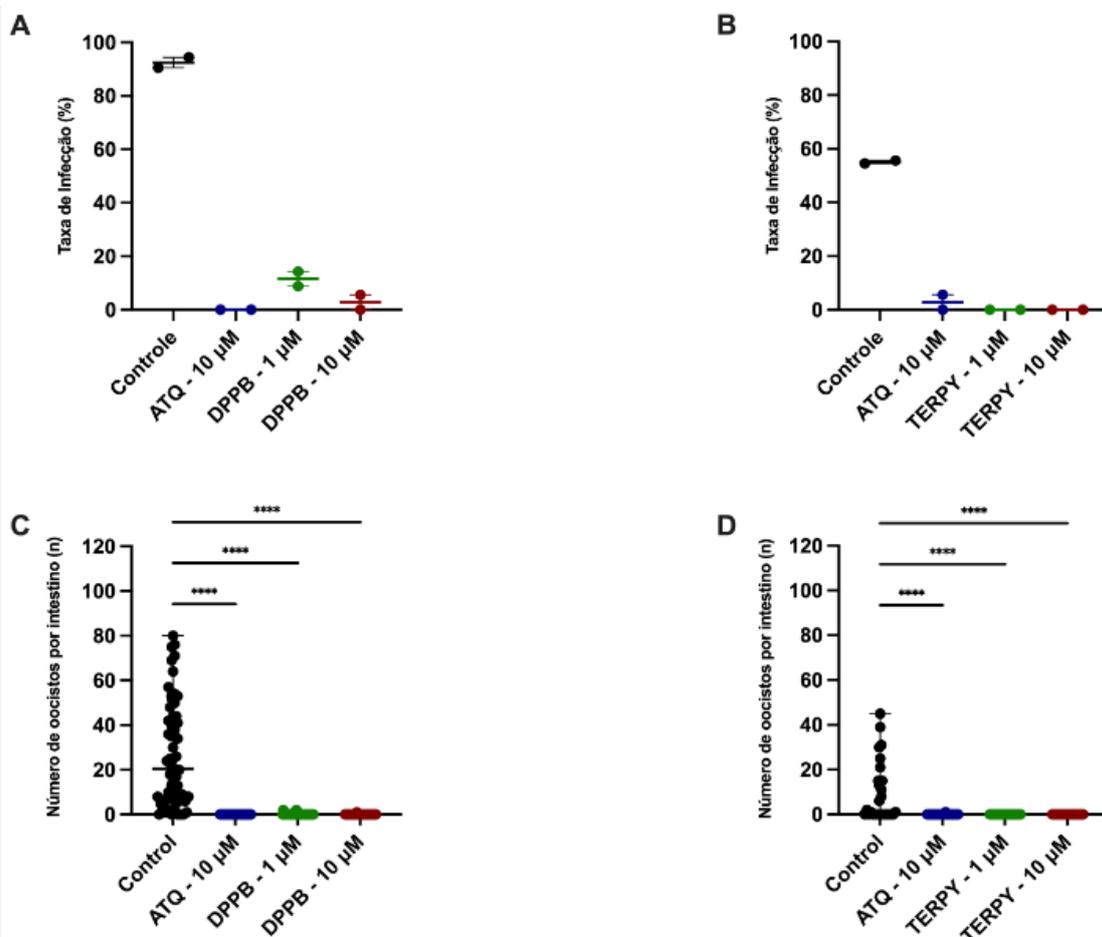


Figura 1. Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de *P. vivax*. Taxa de infecção de DPPD (A); Intensidade de infecção de DPPD (B); Taxa de infecção de TERPY (C); Intensidade de infecção de TERPY (D). Infecção de grupos de 100 mosquitos *An. aquasalis* alimentados com sangue contendo *P. vivax* na presença ou não de ATQ (10 μ M) ou TERPY (1 e 10 μ M). Em (A,C) cada círculo representa uma replicata biológica e o traço a média. Em (B, D) cada círculo representa o número de oocistos no intestino de um mosquito dissecado e o traço a mediana do grupo.

Tabela 1. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de *P. vivax*.

DMFA								
Ensaio	Controle		Atovaquona 10 µM		Terpy 1 µM		Terpy 10 µM	
	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD
1	54,5% (06/11)	8.45 ± 15.41	0 (0/13)	0.0 ± 0.0	0 (0/17)	0.0 ± 0.0	0 (0/16)	0.0 ± 0.0
2	55,6 (10/18)	10.28 ± 12.08	5,6% (1/08)	0.06 ± 0.24	0 (0/26)	0.0 ± 0.0	0 (0/15)	0.0 ± 0.0
MEAN	55,05 (16/29)	6.9 ± 13,74	2,78% (01/31)	0,03 ± 0,12	0 (0/43)	0.0 ± 0.0	0 (0/31)	0.0 ± 0.0

Tabela 2. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e DPPD no bloqueio de transmissão de *P. vivax*.

DMFA								
Ensaio	Controle		Atovaquona 10 µM		DPPD 1 µM		DPPD 10 µM	
	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto ± SD
1	90,5 (38/42)	21.31 ± 21.11	0 (0/26)	0.0 ± 0.0	8,8% (03/34)	0.15 ± 0.5	0 (0/30)	0.0 ± 0.0
2	94,4 (17/18)	38.83 ± 23.57	0 (0/09)	0.0 ± 0.0	14,3% (01/07)	0.14 ± 0.38	5,6% (01/18)	0.06 ± 0.24
Média	92,46 (55/60)	30,07 ± 22,34	0 (0/35)	0.0 ± 0.0	11,55 (04/41)	0,14 ± 0,4	2,78% (01/48)	0,03 ± 0.12

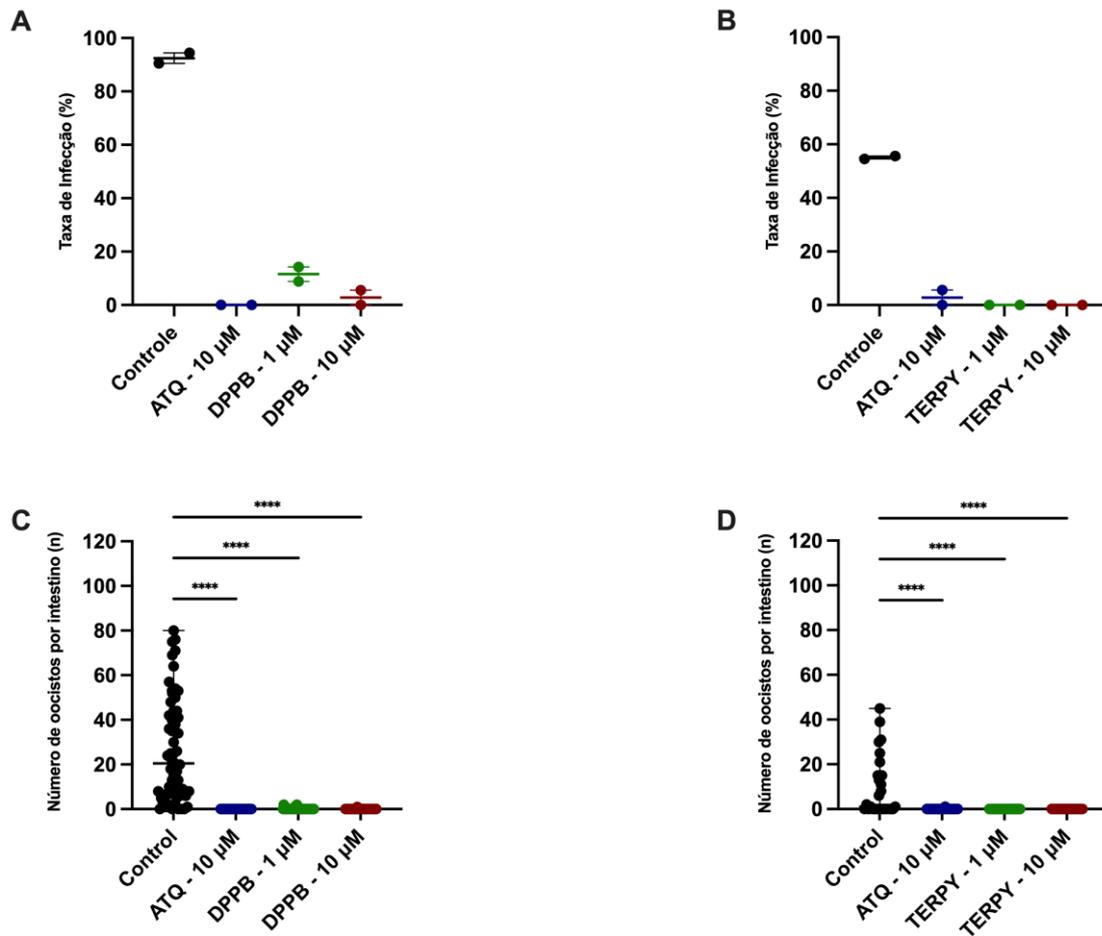


Figure 2. Pré exposição de *An. darlingi* à ATQ e TERPY tem efeito no bloqueio de transmissão de *P. vivax*. Taxa (A) e Intensidade (B) de infecção de grupos de 100 mosquitos *An. darlingi* pré- expostos a ATQ (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$), TERPY (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) ou veículo (Controle) alimentados via DMFA com sangue contendo *P. vivax*. Em (A) cada círculo representa uma replicata biológica e o traço a média. Em (B) cada círculo representa o número de oocistos no intestino de um mosquito dissecado e o traço a mediana do grupo

Tabela 3. Taxa e intensidade de infecção da Atividade de ATQ e TERPY no bloqueio de transmissão de *P. vivax* na pré exposição de *An. darlingi*

Pré-exposição /DMFA										
Ensaio	Controle		Atovaquona 200 μ M		TERPY 200 μ M		TERPY 20 μ M		TERPY 2 μ M	
	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto \pm SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto \pm SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto \pm SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto \pm SD	Taxa de infecção (%)	Média de oocisto \pm SD
1	84,6% (11/13)	31.31 \pm 27.55	5% (1/20)	3.0 \pm 1,2	45% (09/20)	7,85 \pm 2,3	70% (14/20)	22 \pm 6.0	57,7% (15/26)	9 \pm 3.0
2	80,6% (21/26)	11 \pm 23.57	4,3% (1/23)	0.6 \pm 0.2	5,3% (01/19)	0.7 \pm 0.38	52,9% (09/17)	6 \pm 0.24	63,2% (12/19)	7 \pm 3.0
Média	82,69% (32/39)	30,07 \pm 22,34	4,6% (2/43)	1,8 \pm 0,8	25,13% (10/39)	4,27 \pm 1,3	61.4% (23/37)	14,38 \pm 3,75	60.4% (27/45)	8 \pm 3.0

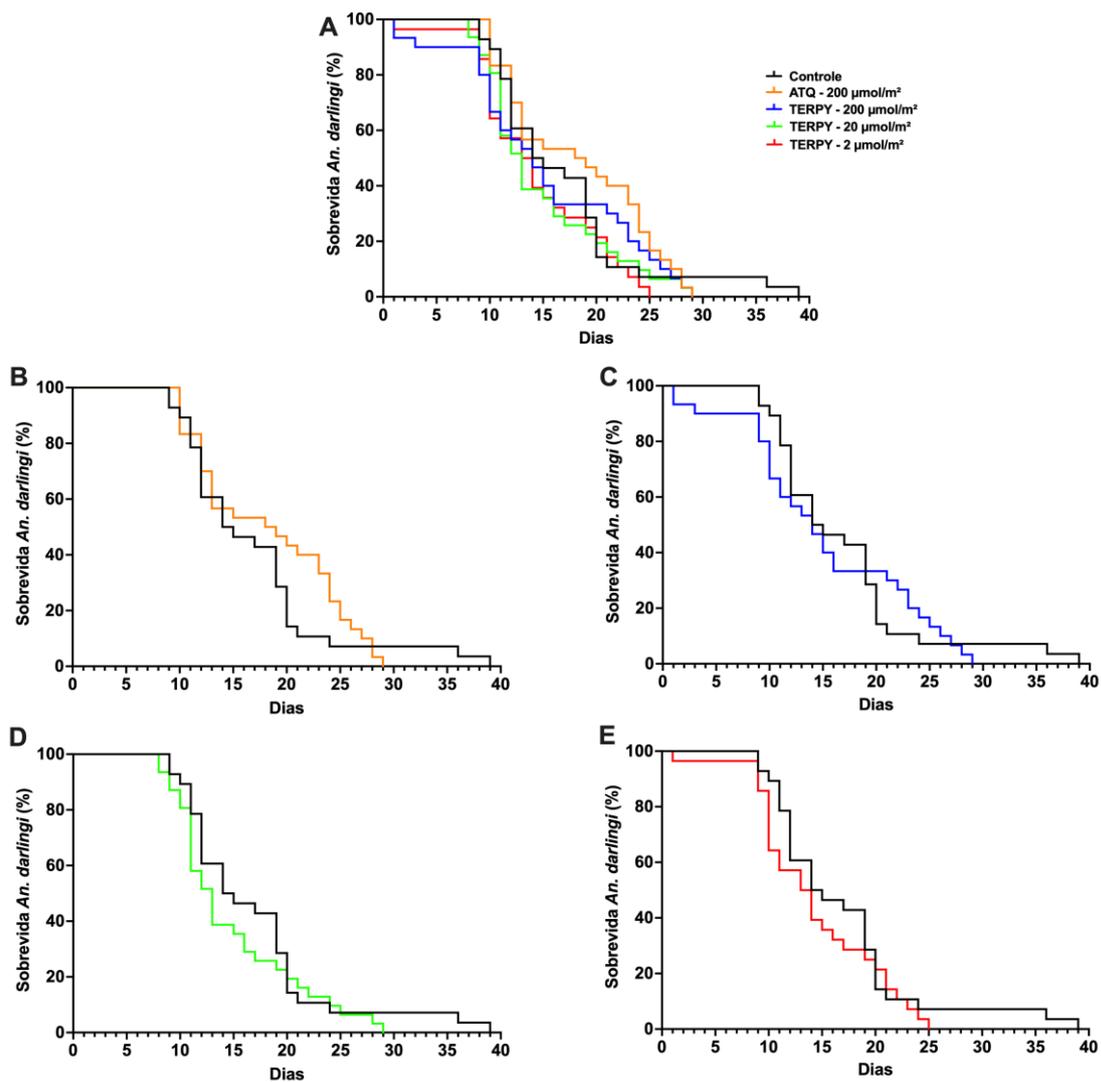


Figura 3. Experimento 1 - Curvas de sobrevivência de *An. darlingi* expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY. Efeito da pré-exposição a diferentes concentrações. (A) Gráfico representando a sobrevivência do grupo controle, ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (B) Curvas de sobrevivência do Controle x ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (C) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (D) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (E) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

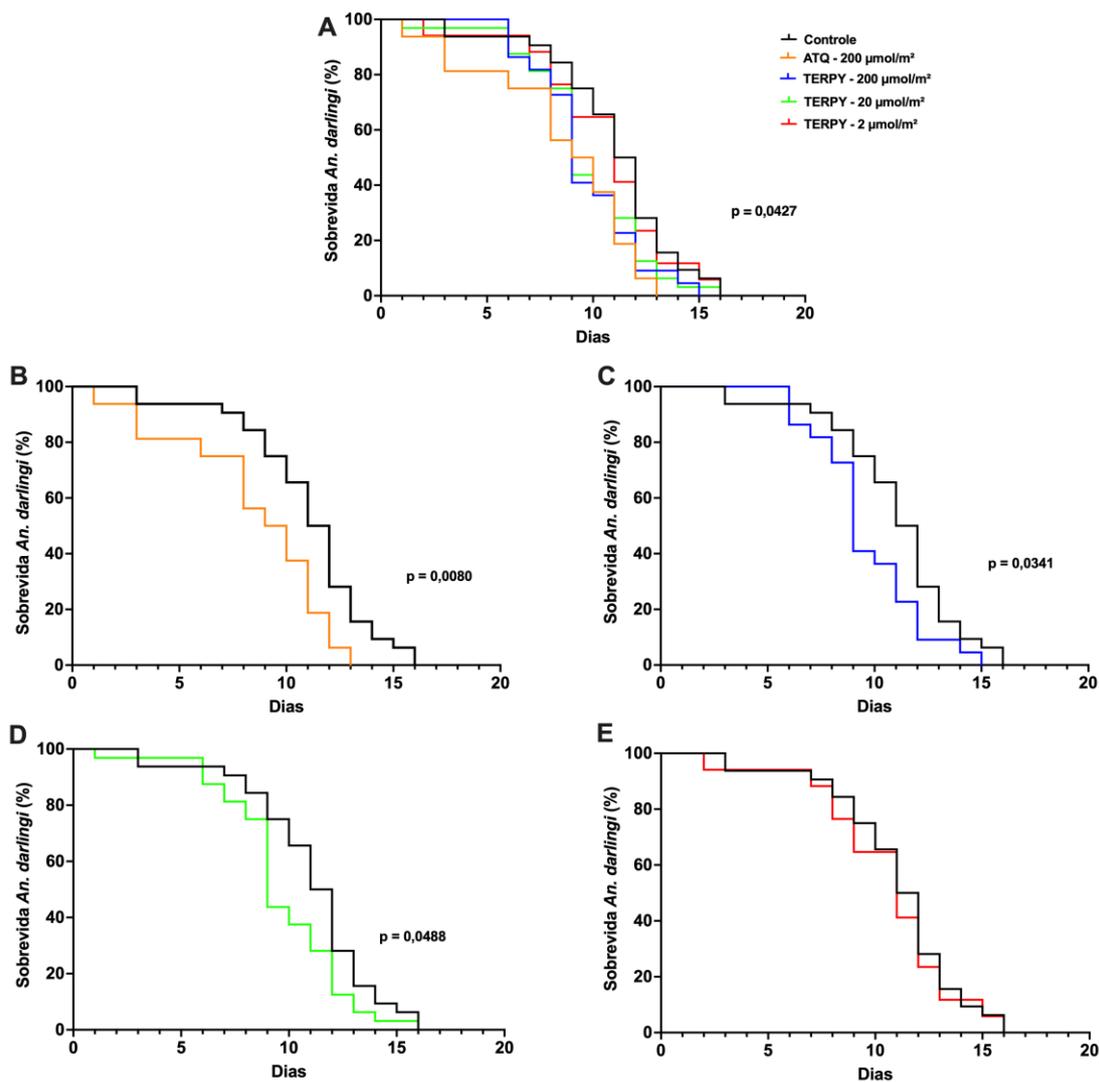


Figure 4. Experimento 2 - Curvas de sobrevivência de *An. darlingi* expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY. Efeito da pré-exposição a diferentes concentrações. (A) Gráfico representando a sobrevivência do grupo controle, ATQ 200 $\mu\text{mol/m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol/m}^2$, 20 $\mu\text{mol/m}^2$ e 200 $\mu\text{mol/m}^2$. (B) Curvas de sobrevivência do Controle x ATQ 200 $\mu\text{mol/m}^2$. (C) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 200 $\mu\text{mol/m}^2$. (D) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 20 $\mu\text{mol/m}^2$. (E) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 2 $\mu\text{mol/m}^2$.

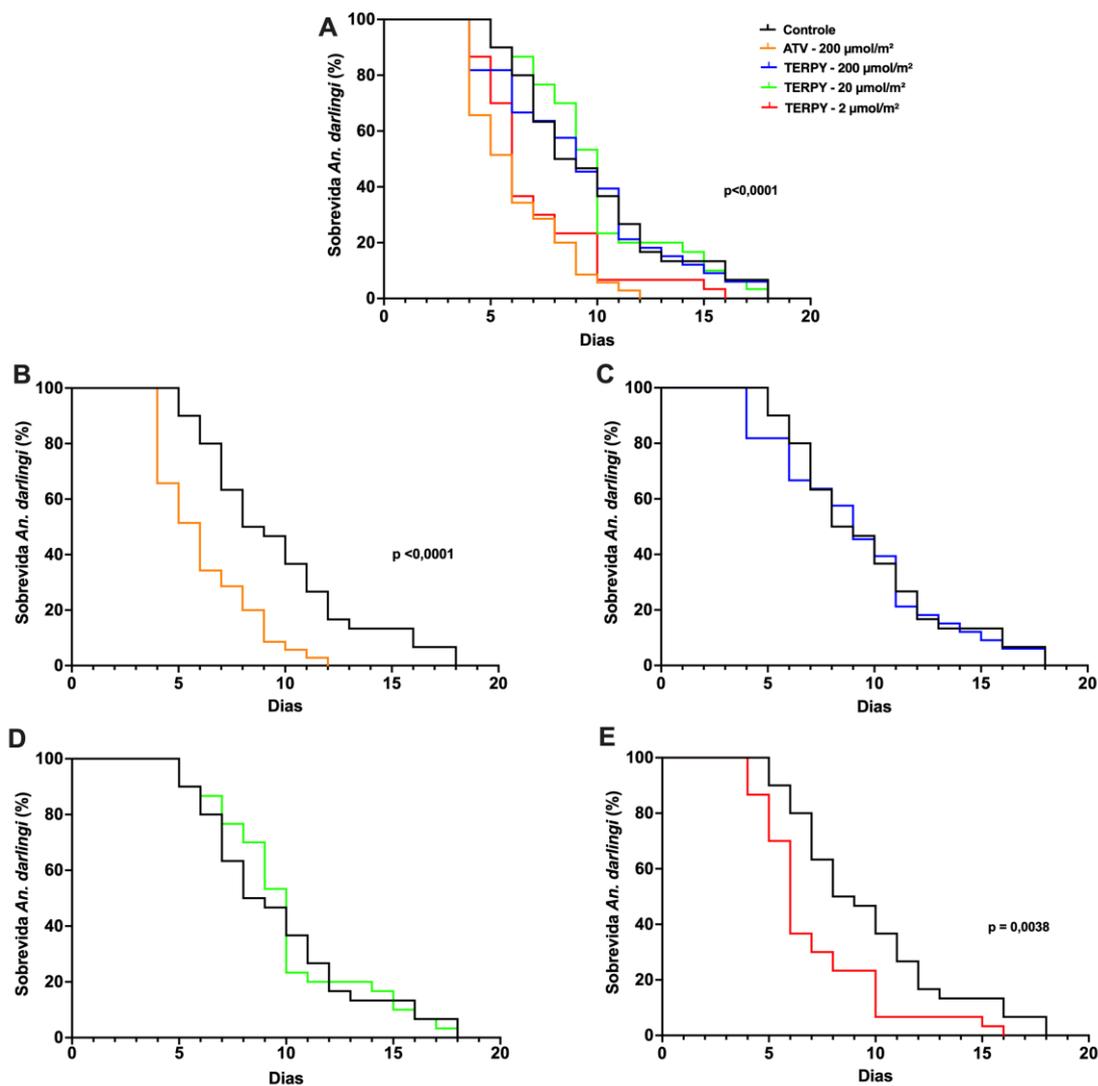


Figure 5. Experimento 3 - Curvas de sobrevivência de *An. darlingi* expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY. Efeito da pré-exposição a diferentes concentrações. (A) Gráfico representando a sobrevivência do grupo controle, ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (B) Curvas de sobrevivência do Controle x ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (C) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (D) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (E) Curvas de sobrevivência do Controle x TERPY - 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

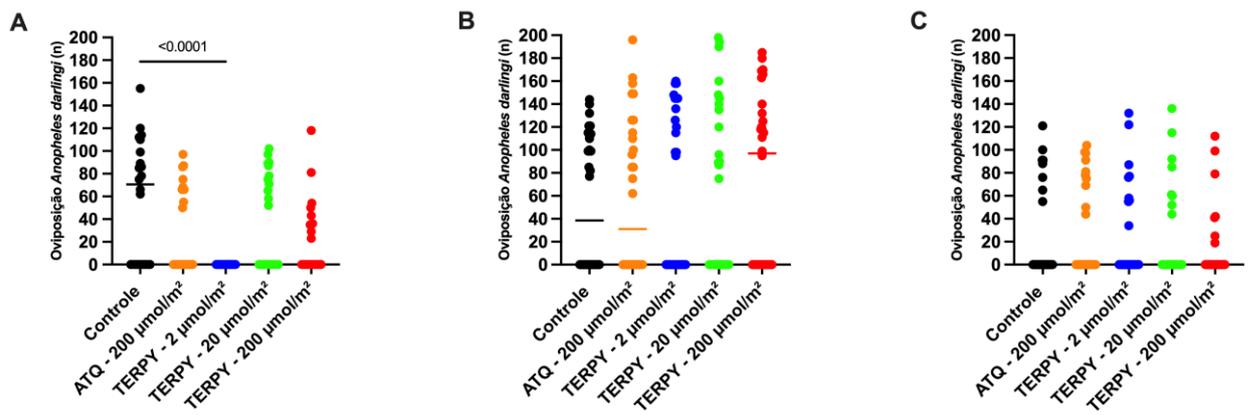


Figure 6. Experimento de oviposição de *An. darlingi* expostos a Atovaquona (ATQ) e o derivado TERPY. E. Efeito da pós-exposição a diferentes concentrações. (A) Oviposição do Controle (sangue saudável), Controle A (sangue de galinha), ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (B) Oviposição do Controle, ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. (C) Oviposição do Controle, ATQ 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi avaliado o potencial antiplasmodial de complexos metálicos baseados em rutênio-atovaquona. Os testes aqui presentes sugerem que a conjugação do rutênio a ATQ, principalmente o derivado TERPY, demonstra potencial bloqueio de transmissão do *Plasmodium vivax*, apresentando resultados preliminares de bloqueio de transmissão mais relevantes que o derivado DPPB. Quando esse derivado (TERPY) foi avaliado na pré-exposição dos mosquitos, seguida da infecção experimental, verificou-se que o efeito no bloqueio da infecção no *An.darlingi* foi menos proeminente em relação a ATQ. Entretanto, mais isolados com *P. vivax* são necessários para confirmar estes resultados utilizando a metodologia DMFA tradicional e com a pré-exposição.

Os mosquitos expostos a ATQ e seu derivado TERPY nas concentrações de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ e 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ apresentaram uma redução na sobrevivência em comparação com o grupo controle, indicando um potencial de ação na sobrevivência do *An. darlingi*, mas é necessário mais ensaio para aprofundar o entendimento dos efeitos da atovaquona e o derivado Terpy em *An. darlingi*.

Em relação ao ensaio de oviposição, deve-se realizar novos ensaios para melhor compreensão dos efeitos da atovaquona e seu derivado na postura de *An. darlingi*, visto que os resultados dos experimentos realizados não foram satisfatórios.

5. Limitações e Recomendações

Um dos desafios apresentando neste estudo, foi demonstrado durante a infecção experimental por DMFA, onde as fêmeas muitas das vezes evitavam se alimentar com o sangue onde as drogas foram diluídas, diminuindo o número de fêmeas a serem dissecadas no sétimo dia pós infecção, isso porque de 120 fêmeas colocadas para se alimentarem de sangue infectado com a droga, alguns experimentos demonstraram que em alguns grupos menos de 20 fêmeas se alimentavam, diminuindo o N amostral do estudo.

Além do mais, três dos cinco experimentos realizados via DMFA (sem pré-exposição), o grupo controle não apresentava nenhuma fêmea infectada, tendo que descartar todo o experimento, e da mesma forma nos experimentos de pré-exposição apenas 2 dos 5 experimentos realizados, o grupo controle estava positivo para *P. vivax*. Sendo assim, é importante a obtenção de sangue de pacientes com mais cruzes e verificar nas lâminas a parasitemia das amostras para assim aumentar a chance de infecção das fêmeas.

Em um dos experimentos realizado na pré-exposição, também perdeu-se 1 grupo (TERPY – 200), onde todas as fêmeas morreram durante os 7 dias que ficaram na gaiola com solução de mel a disposição não sobrando nenhuma para dissecação.

Durante a exposição dos mosquitos nas placas de petri impregnada com drogas, foi observado que muitas fêmeas evitavam ficar em contato no local onde o composto estava impregnado - preferindo a base do recipiente plástico, sendo necessário agitar as placas para que elas pudessem ficar em contato com a superfície da placa onde encontrava-se os compostos diluídos. Pensando nisso é importante para os próximos experimentos agitar a placa levemente de 10 em 10 minutos para que elas possam ficar em contato com a superfície com a droga.

Outro desafio desse estudo está relacionado aos experimentos para análise de fecundidade de *An. darlingi* frente a ATQ e seus derivados, onde foram realizados nove experimentos, e apenas 3 experimentos o grupo de fêmeas do controle depositou seus ovos, e o restante (6 experimentos) foram descartados. Para os próximos experimentos, poderia aumentar o tempo de cópula entre machos e fêmeas, assim aumentando a chance de oviposição

dessas fêmeas, visto que nesse experimento elas ficaram apenas 3 dias copulando.

6. REFERÊNCIAS

1. L R. Parasitologia. 4th ed. Rio de Janeiro; 2003. 222-57; p.
2. Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: anopheles of the subgenus Nyssorhynchus DB - LILACS DP - <http://www.globalhealthlibrary.net>. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2000;42(2):87–94. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652000000200005&lng=en&nrm=iso
3. Hempelmann E. History of Malaria. Researchgate. 2010 [Internet]. [cited 2023 Oct 20]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/318462846>
4. França TCC, Dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. Quim Nova. 2008;31(5):1271–8.
5. Cox FEG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors [Internet]. 2010;3(1):5. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
6. Zumla A, Keiser J. Tropical Diseases. Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):95–110.
7. CDC. Malaria's Impact Worldwide [Internet]. [cited 2023 Oct 20]. Available from: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html
8. Chaves LSM, Fry J, Malik A, Geschke A, Sallum MAM, Lenzen M. Global consumption and international trade in deforestation-associated commodities could influence malaria risk. Nat Commun [Internet]. 2020;11(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14954-1>
9. WHO. World Malaria Report 2021 [Internet]. World Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2021. 2013–2015 p. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
10. World malaria report 2022. 2022.
11. Brasil M da S. Malária. 2022.
12. Ministério da Saúde S de V em S. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Bol epidemiológico. 2022;53(17).
13. Kleydmann K, Garcia S, Abrahão AA, Flávia A, Oliveira DM, Medeiros K, et al. Malaria time series in the extra - Amazon region of Brazil : epidemiological scenario and a two - year prediction model. Malar J [Internet]. 2022;1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04162-1>
14. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Bol Epidemiológico. 2022;53:1–17.
15. Fundação Oswaldo Cruz. Malária: região Amazônica concentra 99% dos casos no Brasil [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 30]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/malaria-regiao-amazonica-concentra-99-dos-casos-no-brasil>
16. SES-AM S de E de S do A-. Malária: Amazonas fecha 2022 com menor número de casos da doença dos últimos quatro anos [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 23]. Available from: <https://www.saude.am.gov.br/malaria-amazonas-fecha-2022-com-menor-numero-de-casos-da-doenca-dos-ultimos-quatro-anos/>

17. Brasil M da S. Ações de Controle da Malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. Ministério da Saúde. 2006. 52 p.
18. Brasil M da S. No Title [Internet]. Ministério da Saúde lança Plano Nacional de Eliminação da Malária no Brasil. 2022. Available from: https://portal.conasems.org.br/orientacoes-tecnicas/noticias/5660_ministerio-da-saude-lanca-plano-nacional-de-eliminacao-da-malaria-no-brasil
19. Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-bayona M, Sinha R, Fowler K, et al. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. 2003;33:933–43.
20. Baton LA, Ranford-cartwright LC. Spreading the seeds of million- murdering death * : metamorphoses of malaria in the mosquito. 2005;21(12).
21. Rotraut AGB, Consoli, RLO. Principais mosquitos de importância médica no Brasil. Vol. Único. 1994. 1–228 p.
22. Galardo AKR. A importância do *Anopheles darlingi* root, 1926 e *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no Município de Macapá, Estado do Amapá, Brasil. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2010;1(4):103–103.
23. Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto JA. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. Pathog Glob Health [Internet]. 2019;113(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463>
24. Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: A review. Parasites and Vectors. 2011;4(1):1–13.
25. Chuquiyaury R, Llanos-cuentas A, Rodriguez H, Moreno M, Tong C, Guzma M, et al. Infection of Laboratory-Colonized *Anopheles darlingi* Mosquitoes by *Plasmodium vivax*. 2014;90(4):612–6.
26. Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, Dos Santos E V., Pessoa FA, et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. Malar J. 2013;12(1):1–10.
27. Ríos-Velásquez CM. SUSCETIBILIDADE E RESPOSTA IMUNE DE MOSQUITOS ANOPHELES (DIPTERA: CULICIDAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA QUANDO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR PLASMODIUM VIVAX. [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz; 2014. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10032>
28. Arcos AN, Ferreira FA da S, Cunha HB da, Tadei WP. Characterization of artificial larval habitats of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Central Amazon. Rev Bras Entomol [Internet]. 2018;62(4):267–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.07.006>
29. Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD, Rodovalho SR, Peterka C, Moresco G, Mesones Lapouble OM, et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52(December 2018):0–2.
30. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. Erratum: The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis (Parasit Vectors (2010) 3 (72)). Parasites and Vectors. 2011;4(1):1–26.
31. Branch OL, Casapia WM, Gamboa D V., Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. Malar J. 2005;4:1–16.
32. White NJ, Imwong M. Relapse [Internet]. Vol. 80, Advances in Parasitology. Elsevier; 2012. 113–150 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5>

33. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
34. Nogueira F, Rosário VE do. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010 Sep;1(3).
35. Vitorino R, De A, Mendonça D, Goreti M. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. 2011;23(3):358–69.
36. Esp P, Import CDE, Sanit N. Classificação e principais espécies de importância sanitária. 1953;(1975).
37. Siqueira-Batista APGRRVA de PCEG de MMG de AOR. Malária grave por *Plasmodium falciparum*/Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(3):358–69.
38. Mota MM, Rodriguez A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *BioEssays*. 2002;24(2):149–56.
39. Siqueira-batista R, Vitorino R, Freitas RDB, Alberto L, Goreti M, Oliveira DA, et al. Malária por *Plasmodium falciparum* : estudos proteômicos. 2012;24(4):394–400.
40. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Mendonça EG de, Vitorino RR, Azevedo SFM de, Freitas R de B, et al. Malária por *Plasmodium falciparum*: estudos proteômicos. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012;24(4):394–400.
41. Perera R, Caldera A, Wickremasinghe AR. Reactive Case Detection (RACD) and foci investigation strategies in malaria control and elimination: a review. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03478-0>
42. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde B. Controle seletivo de vetores da Malária: guia para o nível municipal. 1999;1(1):56.
43. World Health Organization, Roll Back Malaria, Geneva. Insecticide-treated mosquito net interventions: a manual for national control programme managers. 2003;144.
44. World Health, Organization G. Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11. 2005;18.
45. World Health Organization, Roll Back Malaria G. Malaria vector control and personal protection. 2006;61.
46. RESISTÊNCIA A INSETICIDAS USADOS PARA *Anopheles (Nyssorhynchus)* darlingi PELO PROGRAMA DE CONTROLE DE MALÁRIA DO MUNICÍPIO DE CRUZEIRO DO SUL – ACRE THAYNA MARIA HOLANDA DE SOUZA Rio de Janeiro Setembro de 2019 INSTITUTO OSWALDO CRUZ Thayna Maria Holand. 2019;
47. da Cruz DL, Paiva MHS, Guedes DRD, Alves J, Gómez LF, Ayres CFJ. Detection of alleles associated with resistance to chemical insecticide in the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Santiago, Cabo Verde. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2757-3>
48. Paton DG, Childs LM, Itoe MA, Holmdahl IE, Buckee CO, Catteruccia F. Exposing *Anopheles* mosquitoes to antimalarials blocks *Plasmodium* parasite transmission. *Nature* [Internet]. 2019;567(7747):239–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-0973-1>
49. Cunico, Wilson; CARVALHO, Samir; GOMES C et al. Fármacos antimalariais - história e perspectivas. *Rev Bras Farmácia*. 2008;89:48–55.
50. Despommier, Dickson; Griffin, Daniel; Gwadz R et al. *Parasitics Diseases*. 6^a. Nova Iorque: *Parasites Without Borders*,; 2017.
51. WALLACE D. The Use of Quinacrine (Atabrine) in Rheumatic Diseases: A Reexamination. *Semin Arthritis Rheum*. 1989;18(4):282 – 297,.

52. SKRZYPEK, Ruth; CALLAGHAN R. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. *Essays Biochem.* 2017;61(1):167–75.
53. Hospital JR. Mechanisms of Disease Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. 2004;364.
54. La-scalea MA, Santa H, Costa R, Ferreira EI. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). 2007;43.
55. Meshnick SR. Artemisinin : mechanisms of action , resistance and toxicity. 2002;32:1655–60.
56. Tu Y. Artemisinin — A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture)**. 2016;2–19.
57. Report S. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. 2018;2018(December).
58. de Oliveira RG, dos Reis Cruz L, Dias LC. Artemisinina E Derivados: Descoberta, Estratégias Sintéticas E Obtenção Industrial. *Quim Nova.* 2022;45(7):831–46.
59. Amaral EF. Malária : Aspectos históricos e utilização da Artemisinina em seu tratamento. 2015;34.
60. Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T, Matsuzaki M, Sakamoto K. Parasitology International Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome bc 1 complex. *Parasitol Int* [Internet]. 2015;64(3):295–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.09.011>
61. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1163–73.
62. Gnanadesigan M, Nanadagopalan V, Kapildev G, Gundappa M. Chapter 16 - Nano Drugs for Curing Malaria: The Plausibility [Internet]. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems.* Elsevier Inc.; 2019. 451–467 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00016-8>
63. Zhang CX, Ñ SJL. New metal complexes as potential therapeutics. 2003;481–9.
64. Painter HJ, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB. Specific role of mitochondrial electron transport in. 2007;446(March).
65. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. 1990;87(April):3014–7.
66. Hospital K. Pharmacodynamic interactions among atovaquone , proguanil and cycloguanil against *Plasmodium falciparum* in vitro. 2003;331–7.
67. Färnert A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvist Y, Thapar MM, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride : case reports Media criticism of doctors : review of UK junior doctors ’ concerns raised in surveys. 2003;326(March):628–9.
68. Tabrizi L, Talaie F, Chiniforoshan H. Copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes of lapachol: synthesis, DNA interaction, and cytotoxicity [Internet]. Vol. 35, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* Taylor & Francis; 2017. 3330–3341 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2016.1254118>
69. Sousa CC. Avaliação Das Propriedades Farmacológicas De Complexos De Rutênio (Iii) Conjugados Com As Naftoquinonas Lapachol Ou Atovaquona Como Candidatos a Fármacos Antimaláricos. Diss Mestr - Pós-Graduação em Biotecnol em Saúde e Med Investig - Inst Gonçalo Moniz (FIOCRUZ BAHIA). 2021;(Iii).
70. Alessio E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur J Inorg Chem.* 2017;2017(12):1549–60.
71. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis E, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. 2016;

72. Guia prático de tratamento da malária no Brasil Guia prático de tratamento da malária no Brasil. 2010.
73. Agents A, Peacock AFA, Sadler PJ. Medicinal Organometallic Chemistry : Designing Metal Arene Complexes as. 2008;1890–9.

7. ANEXOS

7.1 EQUIPE

Nome	Formação	Instituição	Função
Aline de Sousa Santiago	Ciências Biológicas	UEA/FMT	Mestranda
Camila Fabbri	Farmácia	Fiocruz	Pesquisadora
Stefanie Costa Pinto Lopes	Ciências Biológicas	Fiocruz	Pesquisadora
Rosa Amélia Gonçalves Santana	Ciências Biológicas	FMT	Pesquisadora
Larissa de Sena Lamar Nunes	Farmácia/em andamento	Fiocruz	Iniciação Científica/PIC
Diogo R. Magalhães Moreira	Farmácia	Fiocruz/Bahia	Pesquisador
Caroline Conceição Sousa	FARMÁCIA	Fiocruz/Bahia	Pesquisadora
João Horonato	Química	UFSCAR/SP	Pesquisador
Alzir Azevedo Batista	Química	UFSCAR/SP	Pesquisador

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO -TCLE

ESTUDO: AVALIAR A ATIVIDADE DO ANTIMALÁRICO ATOVAQUONA E DERIVADOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Anopheles* spp. E NO BLOQUEIO DE TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax*

CONVIDAMOS VOCÊ A PARTICIPAR DE um estudo com o objetivo de estudar um medicamento (atovaquona e derivados) contra o *Plasmodium vivax*, ou seja, o causador da doença que você tem no momento que será realizado na FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD).

Para isso, é preciso que seja feita a **retirada de uma amostra de sangue de você** para realizar alguns testes, a fim de verificar se o medicamento é eficaz ou não. **Com essa amostra faremos alguns testes em mosquitos (aqueles que transmitem a malária) criados em laboratórios**, onde eles serão alimentados e expostos a esse medicamento e depois irá verificar se eles se contaminam com malária ou não.

Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes testes **com sangue de 30 pessoas (homem ou mulher, maiores de 18 anos)**.

Por isso pedimos que você participe deste estudo. Abaixo tem o ciclo da malária, pra você entender melhor como ocorre a doença:



CICLO DA MALÁRIA

Este estudo sobre malária será feito com pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Hospital Tropical). Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Como sempre acontece na rotina do hospital, você vai fazer o exame para a malária e se ele for positivo, você irá receber o tratamento gratuito de malária, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde. Se você tiver malária vivax e aceitar participar desse projeto, **precisaremos apenas colher uma amostra pequena de 10 mL de sangue (equivalente a 2 colheres de chá)** da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



COLETA DE SANGUE

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

coletado pode sobrar. Este sangue não será armazenado e sim descartado conforme as leis municipais de descarte de resíduos infectantes.

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 participante 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 um possível medicamento para impedir a transmissão da doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente a novas estratégias de controle da malária. O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora de maneira correta para não poluir o meio ambiente e nem contaminar as pessoas.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com o Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99342-6163 (qualquer dia e horário). O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá tirar dúvidas ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro, CEP: 69040-000) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas).

Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

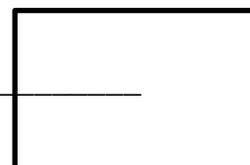
Eu, _____, entendi tudo sobre o estudo **“AVALIAR A ATIVIDADE DO ANTIMALÁRICO ATOVAQUONA E DERIVADOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Anopheles* spp. E NO BLOQUEIO DE TRANSMISSÃO DE *Plasmodium vivax*”** e aceito participar da pesquisa.

Data: ____ /
____ / ____

Endereço: _____

Telefone: (____) - _____ - _____

Assinatura voluntário: _____



7.3 Cálculos feitos para para diluição dos compostos

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

Código POP	POP_IPCCB_LAB_007_v01_PT		
Título	Procedimentos para diluição de compostos atovaquona, terpy e DPPT		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Aline Santiago Camila Fabbri	Revisado por: Stefanie Lopes	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 15/04/2022

**COMPOSTOS
DERIVADO DA ATOVAQUONA
(Referência Paton et al, 2019)**

1. Compostos

- 1.1 Atovaquona (droga controle) – PM 366 g/mol
- 1.2 Terpy - PM 957 g/mol
- 1.3 Dppb - PM 964 g/mol

2. Cálculos

2.1 Placa de petri

- 80 mm de diâmetro.
- área de 50,24 cm² (0,005024 m²)
- levando em consideração que uma gota tem 50 uL, com o diluente da acetona, após teste em papel filtro, atingiu uma área de 2,36 cm² (0,00236 m²).

Sendo assim:

$$1 \text{ gota} - 50 \mu\text{L} - 0,00236 \text{ m}^2$$

$$X - 0,005024 \text{ m}^2$$

X = 1064,41 μL , logo para completar a área do papel filtro que cobre uma placa de petri irá se gastar em aproximadamente 1 mL do composto diluído no veículo acetona.

Obs: 1 placa pode-se expor até 30 fêmeas.

2.2 Concentrações das drogas para cada teste e quantidade a ser utilizada:

2.2.1 SOBREVIDA

O artigo utiliza a concentração de 1 mmol/m². Para produzir essa solução em 1 mL do diluente (ou seja, uma placa) utiliza-se (com base nas soluções estoques já disponíveis):

	Atovaquona	Terpy	Dppb	Lap	Lap.Dppb
Solução estoque (SE)	4mg/mL	4,4 mg/mL	3,5 mg/mL	4,7 mg/mL	2,6 mg/mL
Quantidade da SE	91,5 µL	217,5 µL	275, 43µL	177,23 µL	322,69 µL
Diluente	908,5 µL	782,5 µL	724,57 µL	822, 77 µL	677,31 µL
Volume Final	1 mL				
Quantidade de placas necessárias para 5 isolados	5 placas. Cada placa, exposição de 30 fêmeas 5 mL no mínimo de cada composto para o total de 5 isolados				

2.2.2 OVIPOSIÇÃO

O artigo utiliza a concentração de 1 mmol/m². Para produzir essa solução em 1 mL do diluente (ou seja, uma placa) utiliza-se (com base nas soluções estoques já disponíveis):

	Atovaquona	Terpy	Dppb	Lap	Lap.Dppb
Solução estoque (SE)	4mg/mL	4,4 mg/mL	3,5 mg/mL	4,7 mg/mL	2,6 mg/mL
Quantidade da SE	91,5 µL	217,5 µL	275, 43µL	177,23 µL	322,69 µL
Diluente	908,5 µL	782,5 µL	724,57 µL	822, 77 µL	677,31 µL
Volume Final	1 mL				
Quantidade de placas necessárias para 5 isolados	5 placas. Cada placa, exposição de 30 fêmeas 5 mL no mínimo de cada composto para o total de 5 isolados				

2.2.3 DMFA

O artigo utiliza as concentrações de 1000 µmol/m², 100 µmol/m², 10 µmol/m², 1 µmol/m² e 100 ηmol/m².

- Fazer diluição seriada a partir da maior concentração;
- Cada isolado gasta-se no mínimo 4 placas ($30 \times 4 = 120$ fêmeas) para cada composto por concentração;
- Fazendo 5 isolados para cada composto são no mínimo 24 mL do composto na maior concentração. Como a diluição é seriada, as demais concentrações não precisam entrar no cálculo para quantidade de droga.
- Essa é a conta para somente pré-alimentação Se for fazer também pós-alimentação, soma mais 24 mL, logo, 48 mL do composto na maior concentração

	Atovaquona				
Solução estoque (SE)	4mg/mL				
Concentrações	(1) 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(2) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(3) 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(4) 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(5) 100 $\eta\text{mol}/\text{m}^2$
Volume total	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL
Quant. da solução	109,8 μL (SE)	120 μL (1)	120 μL (2)	120 μL (3)	120 μL (4)
Diluyente	1090,2 μL	1080 μL	1080 μL	1080 μL	1080 μL

	Terpy				
Solução estoque (SE)	4,4 mg/mL				
Concentrações	(1) 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(2) 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(3) 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(4) 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	(5) 100 $\eta\text{mol}/\text{m}^2$
Volume total	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL	1,2 mL
Quant. da solução	261 μL (SE)	120 μL (1)	120 μL (2)	120 μL (3)	120 μL (4)
Diluyente	939 μL	1080 μL	1080 μL	1080 μL	1080

3. Quantidade de composto por placa

Na maior concentração 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, gasta-se por placa as seguintes concentrações dos compostos:

- Atovaquona: 0,4 mg/placa
- Terpy: 1,1 mg/placa
- Dppb: 1,1 mg/placa

7.4 Procedimento para dissecação de intestino médio e detecção microscópica da infecção de anofelinos por *Plasmodium spp*

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

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

1. OBJETIVO

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

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

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

1. DEFINIÇÕES

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

2. RESPONSABILIDADES

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

3. POPs RELACIONADOS

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

4. MATERIAIS

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

5. PROCEDIMENTOS

Dissecção dos anofelinos

1. Os mosquitos infectados devem ser mantidos na sala de infectados com solução açucarada 10%, temperatura entre 25-26°C e 80% de umidade;
2. Após 7 dias de infecção, retirar os mosquitos da sala de infectados, conduzi-los para sala de dissecção, retirá-los das gaiolas utilizando um capturador e adormecê-los no frio em freezer - 20°C;
3. Após adormecidos, faz-se uma lavagem utilizando uma placa de petri contendo álcool 70%, seguido de uma segunda lavagem em PBS 1X, todo o

procedimento de dissecação deve ser realizado sobre o gelo (evitando que o mosquito acorde e voe).

4. Dissecar as fêmeas individualmente, da seguinte forma:

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

Detecção de oocistos de *Plasmodium spp*

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

7.5 Procedimento para Infecção experimental via DMFA

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

Código POP	POP_IPCCB_LAB_007_v01_PT		
Título	Procedimento para Infecção experimental		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Camila Fabbri	Revisado por: Stefanie Lopes	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 15/04/2023

**POP - Infecção Experimental – DMFA
Parte 1 – preparo do sangue**

Materiais e Reagentes:

- Meio RPMI aliquotado
- Soro inativado AB
- Pipetas pasteur (3 a 5 und)
- Lâminas (3 und)
- Pincel
- Eppendorf (10 und)
- Estante para tubo Falcon
- Estante para eppenforf
- Ponteiras de 1000 uL
- Ponteiras de 10 uL
- Pipeta de 1000 uL
- Pipeta de 10 uL
- Descarte para líquidos (add hipoclorito)
- Descarte para contaminados (colocar saco para autoclave dentro do fluxo)
- droga congelada

Preparação do fluxo laminar:

1. **ANTES DE LIGAR**, limpar o fluxo com álcool 70%;
2. Inserir todos os reagentes (exceto o soro inativado AB e a droga congelada) e materiais dentro do fluxo, sempre higienizando antes com álcool 70%;

3. Organizar os materiais e reagentes no fluxo reservando a parte central para manipulação, lado direito área suja e lado esquerdo área limpa.
4. Ligar o fluxo e ligar o UV – deixar por 15 min – NÃO MANIPULAR COM O UV LIGADO;
5. Desligar a luz UV e deixar o fluxo ligado até o final do uso.

Preparação do sangue:

ATENÇÃO: REALIZAR TODOS OS PROCEDIMENTOS DENTRO DO FLUXO LAMINAR. ATENTAR PARA O USO DAS PIPETAS PASTEUR PARA NÃO CONTAMINAR REAGENTES.

1. Após a coleta de sangue em tubo de heparina, separar 0.5 mL do sangue total em eppendorf para realizar hemograma do paciente. O restante do sangue não descartar. Identificar o eppendorf com o código do paciente, data, “ST” e armazenar.
2. Colocar 1 gota do sangue total em duas lâminas previamente identificadas (código do paciente e data). Realizar o esfregaço sanguíneo. Esperar secar.
3. Centrifugar o tubo de sangue por 5 minutos a 2000 RPM. Enquanto centrifugar, corar o esfregaço sanguíneo na seguinte sequência: 1 – metanol (incolor); 2 – eosina (rosa, mergulhar 8x) e 3 – hematoxilina (azul – mergulhar 8x). Lavar a parte traseira da lâmina e esperar secar;
4. Com o auxílio de um pipeta pasteur, remover o plasma. Armazenar 1 mL do plasma em tubo de eppendorf (identificar o eppendorf com código do paciente, “plasma” e a data), o restante, descartar;
5. Lavar a papa de sangue adicionando meio RPMI com o auxílio de uma pipeta pasteur na na proporção de 1:1 (visualmente). Tampar e homogeneizar;
6. Centrifugar novamente (5 min 2000 RPM);
7. Repetir o procedimento anterior 2x (lavagem da papa de sangue);

8. Em um eppendorf identificar com código do paciente, data e “trizol”. Colocar 950 uL de trizol e 50 uL de papa de sangue;
9. Identificar mais quatro eppendorfs: “C”, “5”, “10” e “20”;
10. Reconstituir o sangue à 40% de hematócrito em soro humano inativado AB para um total de 1mL em cada eppendorf identificado acima, da seguinte forma:

	Controle	10 uM	100 uM	1mMu
Soro humano inativado AB	600 uL	600 uL	600 uL	600 uL
Papa de sangue	400 uL	400 uL	400 uL	400 uL

11. Organizar o fluxo, jogar o lixo líquido no resíduo biológico, colocar o lixo contaminado para autoclavar (não esquecer de fechar), guardar os reagentes e estantes, limpar as pipetas e colocá-las no volume máximo e limpar o fluxo com álcool 70°GL;
12. Armazenar a droga, plasma, sangue total e trizol no criobox do freezer -80°C;
13. Levar os tubos de eppendorf para a infecção experimental em luva ou dentro de caixa de isopor para o insetário.

7.6 Parecer consubstanciado do cep

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade do antimalárico Atovaquona na sobrevivência de *Anopheles aquasalis* e no bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax*

Pesquisador: ALINE DE SOUSA SANTIAGO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57291122.5.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.357.919

Apresentação do Projeto:

Avaliação da atividade do antimalárico Atovaquona na sobrevivência de *Anopheles aquasalis* e no bloqueio de transmissão de *Plasmodium vivax*

Pesquisador Responsável: ALINE DE SOUSA SANTIAGO

Objetivo da Pesquisa:

Documentos anexados a Plataforma em resposta às Pendências estabelecidas por este comitê após avaliação de acordo com normas CNS portaria 466/2012

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Pesquisador apresentou todos os documentos com suas adequações solicitadas a partir de lista de pendência deste CEP, Sendo Projeto de Pesquisa com modificações referentes a Critério de Inclusão e Pacientes recrutados, Cronograma devidamente modificado e respeitando a data posterior a avaliação ética, TCLE devidamente corrigido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista que o Pesquisador cumpriu todas as solicitações apresentadas a partir da avaliação realizada por este CEP, a partir de lista de Pendências , considero SMJ o projeto APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente protocolo de pesquisa 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_1891288.pdf	09/04/2022 11:37:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ILUSTRADOATOVAQUONAALINE.docx	09/04/2022 11:29:12	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ILUSTRADOATOVAQUONAALINE.pdf	09/04/2022 11:28:59	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	AnuenciaEntomologia.docx	25/03/2022 19:31:04	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	anuencialPCCB.docx	25/03/2022 19:30:39	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PropostaProjetoAlineSantiago.docx	25/03/2022 19:29:57	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PropostaProjetoAlineSantiago.pdf	24/03/2022 14:03:29	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	LattesCamilaFabbri.pdf	24/03/2022 14:00:37	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	LattesAlineSantiago.pdf	24/03/2022 14:00:16	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	Lattesstefanie.pdf	24/03/2022 13:59:05	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	AnuenciaEntomologia.pdf	24/03/2022 13:56:04	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
Outros	anuencialPCCB.pdf	24/03/2022 13:55:18	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito

Continuação do Parecer: 5.357.919

Folha de Rosto	FolhadeRosToDENPE.pdf	24/03/2022 13:52:55	ALINE DE SOUSA SANTIAGO	Aceito
----------------	-----------------------	------------------------	-------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 19 de Abril de 2022

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

7.7 Procedimentos para Análise de Fecundidade

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

Código POP			
Título		Procedimentos para Análise de Fecundidade	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Aline Santiago Camila Fabbri	Revisado por: Stefanie Lopes	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação: 15/02/2023

1. OBJETIVO

Este POP tem como objetivo elucidar o procedimento operacional padrão para análise de fecundidade de mosquitos fêmeas de *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium vivax* expostos a diferentes concentrações de Atovaquona e derivados no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratório de Entomologia

3. DEFINIÇÕES

DMFA: Ensaio de alimentação direta por membrana

4. RESPONSABILIDADES

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

5. POP'S RELACIONADOS

5.1 Coleta de sangue;

5.2 Fixação de drogas em placa para teste de suscetibilidade *in vitro* em *Plasmodium* spp;

5.3 Infecção Experimental

5.4 Procedimentos para diluição de compostos atovaquona, terpy e DPPT

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a) 5 Placas de Petri já impregnada conforme o protocolo do item 5.3;
- b) Sistema de Alimentação direta por Membrana (5 alimentadores);
- c) 5 gaiolas de infecção;
- d) 5 gaiolas grandes;
- e) 150 plaquinha de oviposição;
- f) Algodão;
- g) 2 folhas de Papel filtro;
- h) Capturador de Castro

7. Procedimentos

7.1 120 fêmeas de cada grupo serão expostas a ATQ e Derivados em diferentes concentrações na placa de Petri;

7.2 Em seguida as fêmeas serão retiradas e colocadas em gaiolas pequenas, onde as mesmas serão alimentadas através de ensaio de alimentação direta por membrana (**DMFA**);

7.3 Os mosquitos alimentados serão retirados das gaiolas pequenas e colocados em gaiolas maiores e transferidos para a sala dos infectados;

7.4 3 dias após a alimentação (DMFA), serão retiradas 30 fêmeas de cada gaiola de diferentes concentrações e cada fêmea será colocada em plaquinhas de petri (5cm³) (**total de 150 plaquinhas**) de oviposição com água, junto a um papel filtro umedecido para a postura;

7.5 Após 24h,48h e 72h os papeis de filtro úmidos com os ovos depositados serão removidos e os ovos serão contabilizados. Além do mais diariamente serão removidas fêmeas mortas ou que já depositaram seus ovos.