



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO
PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FORMAÇÃO DE ROSETAS POR
GAMETÓCITOS DE *Plasmodium vivax* NA TRANSMISSÃO DO
PARASITA AO VETOR**

VANESSA BARBOSA ROSA CARNEIRO

Manaus - AM
2020



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

VANESSA BARBOSA ROSA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FORMAÇÃO DE ROSETAS POR
GAMETÓCITOS DE *Plasmodium vivax* NA TRANSMISSÃO DO
PARASITA AO VETOR**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Dr^a. Stefanie Costa Pinto Lopes
Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Djane Clarys Baia da Silva

Manaus - AM
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

C289a

Carneiro, Vanessa Barbosa Rosa

Avaliação do papel da formação de rosetas por gametócitos de *Plasmodium vivax* na transmissão do paciente vetor. / Vanessa Barbosa Rosa Carneiro. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2020.

67 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2020.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Stefanie Costa Pinto Lopes.

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Djane Clarys Baia da Silva.

1. Malária 2. Plasmodium vivax 3. Anopheles aquasalis
I. Título

CDU 616.936:576.8(043.3)

CDD 616.9362

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11 287

Folha de Julgamento

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FORMAÇÃO DE ROSETAS POR GAMETÓCITOS DE *Plasmodium vivax* NA TRANSMISSÃO DO PARASITA AO VETOR

VANESSA BARBOSA ROSA CARNEIRO

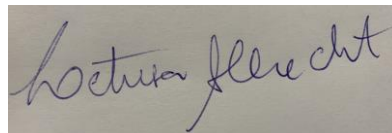
Banca julgadora:



Prof^ª. Dr^ª Stefanie Costa Pinto Lopes
Presidente



Prof^ª. Dr^ª Claudia Maria Rios Velasquez
Membro



Prof^ª Dr^ª Letusa Albrecht
Membro

Dedico este trabalho a todos que fizeram e fazem parte desta trajetória, incentivando e apoiando a realização dessa mais nova etapa da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, primeiramente, à Deus que me permitiu usufruir dessa oportunidade ímpar na minha carreira, e pela fé de que tudo é possível e que sou capaz de realizar tudo aquilo que almejo.

À todos que compartilharam de mais uma etapa da minha vida profissional e que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa.

À minha família que sempre apoio e incentivou minhas realizações profissionais.

Ao meu marido, especialmente, que é meu maior incentivador e apoiador e que nunca me deixa desistir da busca dos meus sonhos. Agradeço pela compreensão e paciência nos dias que estive ausente realizando este trabalho de pesquisa.

À Doutora Stefanie Costa Pinto Lopes, minha orientadora, por tão pacientemente me transferir seus conhecimentos. Agradeço pela atenção e orientação que contribuíram para minha excelente formação. Obrigada sobretudo por ter acreditado e confiado à mim sua pesquisa.

Aos professores e doutores do Instituto Leônidas & Maria Deane da Fiocruz Amazônia (ILMD), pelos conhecimentos transmitidos os quais são essenciais à minha formação profissional.

Aos meus colegas de turma do mestrado bem como meus companheiros da equipe de pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT- HVD), pela parceira e pelo compartilhamento de conhecimentos.

À agência fomentadora fundação de amparo à pesquisa do estado do Amazonas-FAPEAM, pelo subsídio ao projeto do programa PPG-BIO.

RESUMO

Plasmodium vivax é o parasita da malária mais difundido geograficamente, causando malária principalmente fora da África subsaariana. Casos graves e mortes por malária vivax têm sido relatados nos últimos anos. A princípio acreditava-se que eventos como citoaderência e formação de rosetas eram restritos ao *P. falciparum*, como sendo seus principais fatores de virulência. No entanto, atualmente há evidências que apoiam a ideia de que *P. vivax* sofre o fenômeno de citoaderência e o processo de formação de rosetas foi descrito há mais de 20 anos em *P. vivax*. Entretanto poucos estudos foram feitos até hoje para investigar este fenômeno em *P. vivax* a fim de correlacionar o evento com a patogênese da doença. Assim o papel preciso das rosetas na patogênese da malária ainda permanece controverso. Por essa razão, o objetivo deste estudo é avaliar o papel do fenômeno de rosetas na transmissão do parasita ao vetor na malária vivax. Os ensaios foram realizados a partir do isolamento de gametócitos de *P. vivax* provenientes de amostras de sangue periférico de pacientes infectados, posteriormente foram feitos ensaios de roseteamento *in vitro* seguido de infecção experimental em *Anopheles aquasalis* para determinar a taxa de infectividade através da quantificação de oocistos do intestino médio do mosquito após 7 dias de infecção. Todas as amostras testadas foram capazes de formar rosetas com taxa de roseteamento variando entre 5,8 a 27%. Quanto a infectividade, observou-se que a taxa e intensidade de infecção é maior em isolados em formação de rosetas quando comparados com os que não formam rosetas. Além disso, foi realizada análise enzimática das enzimas digestivas do intestino do mosquito e correlacioná-la com o fenômeno de roseteamento. Por conseguinte, este estudo visa responder perguntas sobre o impacto do fenômeno de roseteamento de *Plasmodium vivax* na transmissão do parasita ao vetor e com isso portanto cooperar como uma ferramenta para estudos a posteriori que visem medidas alternativas de controle da transmissão da malária.

Palavras chaves: Malária; *Plasmodium vivax*; Gametócitos; Rosetas; *Anopheles aquasalis*; Cinética enzimática

ABSTRACT

Plasmodium vivax is the most widespread malaria parasite geographically and the dominant human malaria parasite in most countries outside of sub-Saharan Africa. Despite being known to cause benign infection in humans, severe cases and deaths have been reported last years. For a long time *Plasmodium vivax* was a neglected parasite, due to its low parasitemia and inability to adapt to in vitro culture conditions, however, due to present severe clinical manifestations such as cerebral and placental malaria, similar to the most lethal parasite that is *Plasmodium falciparum*, thus suggesting that *P. vivax* has a certain pathogenic profile similar to *P. falciparum*, therefore the attention of the academic community turned to *P. vivax*. At first it was believed that events such as cytoadherence and rosette formation were restricted to *P. falciparum* as their main virulence factors. However, there is currently evidence supporting the idea that *P. vivax* undergoes the phenomenon of cytoadherence and the rosette formation process has been described for more than 20 years in *P. vivax*. However, few studies were made until today to investigate this phenomenon in *P. vivax* in order to correlate the event with the pathogenesis of disease. Thus the precise role of rosettes in the pathogenesis of malaria remains controversial. Therefore, the goal this study is to evaluate the role of rosettes phenomenon in vector transmission of the parasite in *vivax* malaria. The assays were performed from isolation of *P. vivax* gametocytes from peripheral blood samples from infected patients, later were made rosetting *in vitro* assays followed by experimental infection in *Anopheles aquasalis* to determine the infectivity rate by quantifying oocysts of the mosquito's midgut after 7 days of infection. All samples tested were able to form rosettes with a rate of rosetting ranging from 5,8 to 27%. As for infectivity, of infection is higher in isolates forming rosettes when compared to those that do not form rosettes. In addition, enzymatic analysis of digestive enzymes in the mosquito midgut was carried out and correlated with the phenomenon of rosetting. Therefore, this study aims to answer questions about the impact of the *Plasmodium vivax* rosetting phenomenon on the transmission of the parasite to the vector and therefore cooperate as a tool for later studies aimed at alternative measures to control malaria transmission

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; Gametocytes; Rosetting; *Anopheles aquasalis*; Enzymatic Kinetics

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos dados obtidos nos ensaios de formação de rosetas na população de estudo	31
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da incidência da malária.....	2
Figura 2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	8
Figura 3. Reação de hidrólise do N-Benzoil-L-Arginina 4 nitroanilida (BAPNA).....	28
Figura 4. Taxa de roseteamento e fatores envolvidos	32
Figura 5. Ruptura mecânica de rosetas formadas por isolados de <i>Plasmodium vivax</i>	33
Figura 6. Papel das rosetas na infecção de <i>Anopheles aquasalis</i> por <i>Plasmodium vivax</i>	35
Figura 7. Cinética das enzimas tripsina e quimiotripsina nos mosquitos infectados com <i>P. vivax</i> em formação de rosetas ou após sua reversão.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP`s	Peptídeos antimicrobianos
Anaq-Try-1	Tripsina tipo 1
Anaq-Try-2	Tripsina tipo 2
Anachy- 1	Quimiotripsina tipo 1
Anachy-2	Quimiotripsina tipo 2
ANP1	Aminopectidase 1
CSA	Sulfato de condroitina A
CD-36	Cluster de diferenciação 36
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
HS	Sulfato de Heparan
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
iRBC	Células vermelhas do sangue infectada
IGFBP7	Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina
MP	Matriz Peritrófica
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCM	Programa Nacional de controle da Malária
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>

<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PBS	Tampão fosfato salino
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RBC	Células vermelhas do sangue
Rel 1	Fator relish 1
STAT	Sinal ativador e tradutor de transcrição
SOAP	Proteína adesiva de oocineto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TSP	Trombospondina 1
VWF	Fator de Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia da Malária.....	1
1.2 Agentes infecciosos causadores da malária.....	3
1.3 Vetores da malária.....	4
1.4 Ciclo biológico do parasita.....	6
1.5 Dinâmica do parasita no vetor	8
1.6 Intestino médio.....	9
1.6.1 Lúmen do intestino médio.....	9
1.7 Matriz peritrófica.....	11
1.8 Epitélio intestinal.....	12
1.9 Hemocele.....	13
1.10 Imunidade do mosquito.....	13
1.11 Genes envolvidos no desenvolvimento do parasita no mosquito.....	14
1.12 Patogênese da malária.....	15
1.13 Malária assintomática.....	16
1.14 Sequestro e citoadesão.....	17
1.15 Formação do rosetas.....	18
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Local de Estudo.....	24
4.2 Questões éticas	24
4.3 Delineamento do Estudo	24
4.3.1 Coleta de Sangue.....	24
4.3.2 Processamento da Amostra.....	24
4.3.3 Ensaio de Rosetas de <i>P. vivax</i>	25
4.3.4 Avaliação de Rosetas	25
4.3.5 Obtenção de Anofelinos	25

4.3.6 Infecção Experimental de <i>Anopheles aquasalis</i> com <i>Plasmodium vivax</i>	26
4.3.7 Atividade Enzimática	26
4.3.8 Análise dos dados.....	28
5. RESULTADOS	30
5.1 População de Estudo.....	30
5.2 Ensaio de Rosetas	30
5.3 Infecção experimental.....	33
5.4 Cinética enzimática.....	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS	52
9.1 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	53

1) INTRODUÇÃO

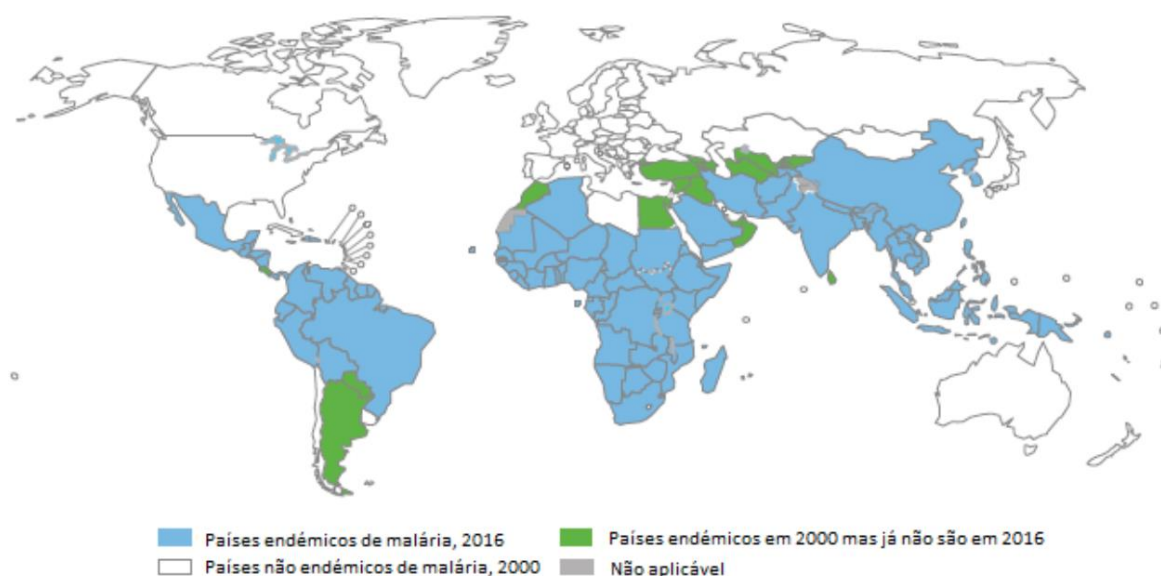
1.1) Epidemiologia da Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, potencialmente grave, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium spp.*, que é transmitido ao homem através da picada de fêmeas do mosquito *Anopheles spp.* A malária é um problema de saúde pública e apresenta impacto e relevância epidemiológica mundial, atingindo aproximadamente 35% da população e cerca de 3,2 bilhões de pessoas, mais da metade da população mundial, estão sob o risco de serem infectados em 97 países. Nas Américas, considera-se que cerca de 128 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão da doença. Atualmente cerca de 89 países encontram-se com transmissão ativa da malária, 10 destes países estão em fase de pré-eliminação e 9 em fase de eliminação da malária (WHO, 2019; AREVALO-PINZON, 2020; RECKER 2018).

O número de casos de malária ainda é preocupante e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2018 ocorreram 228 milhões de casos de malária em todo o mundo e 405.000 mortes. A maioria dos casos (93%) encontram-se na região africana. 94% das mortes ocorreram na África e no sudeste asiático. A taxa de incidência da malária diminuiu globalmente entre 2010 e 2018, de 71 casos por 100 habitantes para 57 casos por 1.000 (**Figura 1**). Grandes reduções foram observadas no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental e África. Nas Américas, contudo, registrou-se um aumento da incidência devido em grande parte ao aumento da transmissão da malária na República bolivariana da Venezuela. A redução global dos casos na última década se deve a um significativo avanço na escala de controle de vetores, juntamente com a implementação de terapias combinadas a base de artemisinina (WHO, 2019).

No Brasil, a malária é basicamente restrita à região amazônica com 99,5% dos casos de malária no país. Entre 2010 e 2015, houve um declínio no número de casos, entretanto a partir de 2016 os casos vem aumentando, devido principalmente aos baixos investimentos na implementação de políticas públicas direcionadas ao diagnóstico, tratamento e controle da transmissão da malária, o que

consequentemente afeta a saúde pública (WHO, 2019; OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2017).



Fonte: Oliveira & Oliveira, 2017

Figura 1 : Evolução da incidência da malária no mundo. Países que permanecem endêmicos em 2016 (azul) e países que eram endêmicos em 2000 (verde).

A incidência da doença depende da susceptibilidade do meio ambiente a vetores locais em termos de altitude, clima e vegetação, bem como implementação de medidas de controle, inviabilidade aos serviços de saúde, diagnóstico e tratamento da doença, condições socioeconômicas precárias, características de moradia e proximidade dos domicílios ao habitat natural do mosquito vetor, sendo portanto impreterivelmente uma doença ligada à pobreza. Além do aumento populacional que vem ocorrendo nas regiões endêmicas, fatores como o contínuo desmatamento e exploração mineral podem afetar a distribuição dos anofelinos favorecendo assim a expansão da malária (FERREIRA, 2016).

Mensurar a prevalência dos casos de malária continua um desafio, por causa da proporção de pacientes assintomáticos, com baixa parasitemia, especialmente em regiões endêmicas. No entanto, com o aprimoramento dos métodos moleculares para detecção de parasitas, fica evidente que a microscopia, ainda padrão ouro para malária, perde grande número de infecções de baixa parasitemia. E as incertezas

associadas à aptidão do parasita no mosquito, a medida que ele transita do estágio de gametócitos sexuais até esporozoíto, significam que existam ainda maiores dificuldades em relacionar quantitativamente a medida padrão de prevalência (RECKER, 2018).

1.2) Agentes infecciosos causadores da malária

Mais de 120 espécies de *Plasmodium* infectam mamíferos, pássaros e répteis. Seis espécies, atualmente, são capazes de causar malária em humanos. São elas: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium*, sendo estas duas últimas conhecidas anteriormente por causar infecções apenas em primatas não humanos. A identificação da infecção por *P. simium* em humanos ocorreu em 2017, sendo a espécie reconhecida como causadora de malária na região de Mata Atlântica brasileira (VALLEJO, 2016; ALVARENGA, 2017; BUERY, 2017).

P. falciparum e *P. vivax* são as espécies predominantes em todo o mundo com uma incidência estimada de 207 milhões e 8,5 milhões de casos, respectivamente, em 2016. O *P. falciparum*, é responsável por causar casos mais graves da doença. A grande maioria da malária *falciparum* ocorre na África sub-saariana (aproximadamente 190 milhões de casos) onde a transmissão permanece intensa em algumas localidades. (WHO, 2019)

O *Plasmodium vivax* é a segunda espécie mais prevalente, sendo endêmica em 58 países, onde anualmente são relatados entre 16 e 22,2 milhões de casos. A malária *vivax* na África é menos incidente, pois a população é largamente negativa à expressão do antígeno Duffy. Estudos demonstraram que indivíduos Duffy negativos são refratários à infecção por *P. vivax*. Na Ásia e Oceania, o número de casos de malária é geralmente mais baixo e as proporções de *P. falciparum* e *P. vivax* são similares, enquanto que nas Américas, malária *vivax* é duas vezes superior à malária *falciparum*. No Brasil, o *Plasmodium vivax* é a espécie relevante por causar cerca de 85% dos casos de malária. (WHO, 2019; MS, 2017; VALLEJO, 2016)

P. malariae e *P. ovale* têm distribuição global mas a incidência é baixa. *P. ovale* é encontrado principalmente na África e sul da Ásia. *P. knowlesi* é encontrado principalmente na Ásia, mais especificamente na Malásia e macacos são os hospedeiros naturais, sendo considerado, portanto, uma espécie zoonótica (ASHLEY, 2018).

1.3) Vetores da malária

Os anofelinos são mosquitos de grande importância epidemiológica, pois podem transmitir a malária, a filariose e arbovírus. O mosquito do gênero *Anopheles* é encontrado em regiões tropicais, estando presentes em 91 países do mundo. No continente americano, aproximadamente 70 espécies são consideradas vetores da malária. 33 espécies são descritas na região amazônica. No Brasil, *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* são as espécies prevalentes. (WHO, 2019; VALLEJO, 2016; ALVARENGA, 2017).

Anopheles darlingi exige condições físicas estáveis para sua reprodução, a exemplo de: Temperatura (20-28°C), pH (6,5 – 7), estabilidade química e proporções de luz/sombra. Essas características fazem com que as margens da floresta sejam os principais criadouros dessa espécie na Amazônia. Somados a isso, as intensas chuvas na região, criam um ambiente favorável, pois diminuem a acidez do rio e criam pântanos de águas claras em áreas onde as águas possuíam pH baixo e alta salinidade. (HIWAT & BREATAS, 2011)

An. darlingi é o principal vetor de malária na Amazônia e sua colonização em condições de laboratório é difícil. *An. aquasalis* é uma espécie predominante ao longo da costa do Atlântico por causa da sua tolerância ao ambiente de água salobra e naturalmente se infecta com *Plasmodium vivax*. Esta espécie é colonizada em laboratório por acasalamento livre desde 1995. Instituições na Amazônia Brasileira possuem colônia desta espécie facilmente adaptada às condições laboratoriais e vem sendo utilizadas para estudos experimentais, a fim de estudar principalmente

aspectos da interação *Plasmodium*-vetor. (HAY et al, 2010; VELASQUEZ-RIOS, 2013; SINKA et al, 2012).

A transmissão da malária é mais intensa em lugares onde o tempo de vida do mosquito é mais longo (de modo que o parasita tenha tempo pra completar seu desenvolvimento no interior do mosquito). A longa vida e o hábito altamente antropofílico - hematófago das espécies de mosquitos vetores africanos é a principal razão pela qual quase 90% dos casos de malária no mundo se encontram nesta região. (ASHLEY, 2018)

As fêmeas do mosquito *Anopheles* dependem do repasto sanguíneo para fazer a oviposição. Por vezes uma alimentação sanguínea já é o suficiente para postura dos ovos. As fêmeas depositam os ovos na água que ao eclodirem liberam as larvas que se desenvolvem em adultos alados. As fêmeas adultas completam seu ciclo reprodutivo a cada três dias, quando completam seu ciclo gonotrófico. Cada ciclo pode resultar na produção, em média, de 100 ovos. O ciclo gonotrófico, a longevidade e a composição etária são características importantes e essenciais para determinar a capacidade de transmissão da malária. (ASHLEY, 2018; CLAYTON, 2014; OKECH, 2007).

Estudos feitos em laboratório, demonstraram que a nutrição larval afeta a competência vetorial, bem como o tamanho do mosquito adulto, e pressupõe-se que exista uma relação entre o tamanho do mosquito e a infectividade com *Plasmodium*. A influência do habitat natural das larvas no fitness do *Anopheles* e a competência vetorial devem ser consideradas para melhor compreensão da ecologia do vetor da malária. Assume-se que em ambientes urbanos, os poluentes ambientais provavelmente reduzam a capacidade de sobrevivência do mosquito e sua competência vetorial. É imprescindível identificar os focos de habitats produtivos das larvas, pois contribuem positivamente para a transmissão da malária (MARTINS, 2018).

Há controvérsias sobre a relação entre o desmatamento e a transmissão da malária. Alguns estudos afirmam que desmatamento pode contribuir para diminuição da malária, pois reduzem os habitats naturais de desenvolvimento dos vetores, por

outro lado outros estudos afirmam que o desmatamento é um fator de risco para a transmissão da malária, pois promoverá a movimentação e adaptação dos mosquitos às regiões peridomiciliares (CHAVES, 2018).

1.4) Ciclo biológico do parasito

O ciclo do parasita *Plasmodium spp.* é complexo e possui algumas peculiaridades de acordo com a espécie, o qual foi ilustrado na Figura 2. O conhecimento do ciclo do parasita *Plasmodium* é importante para melhor compreensão da patogenia, e conseqüentemente do tratamento e profilaxia da doença. (SMITH , 2018)

O ciclo é heteroxênico. No hospedeiro vertebrado o parasita apresenta os seguintes estágios evolutivos: esporozoítos, merozoítos, esquizontes, trofozoítos e gametócitos (macrogametócitos e microgametócitos), enquanto no hospedeiro invertebrado encontram-se microgameta, macrogameta, zigoto, oocineto, oocisto e esporozoítos, (ASHLEY, 2018).

O esporozoíto é a forma infectante para humano. eles são transmitidos ao homem através da picada do anofelino, que os inocula na derme. Uma vez depositados na derme, os esporozoítos levam cerca de 1 a 3 horas para sair deste compartimento. os esporozoítos são formas móveis que apresentam movimento circular chamado *gliding* que os ajudam a atingir e migrar pelos capilares e então alcançar a corrente sanguínea. Aqueles que permanecem na pele são destruídos e drenados pelo sistema linfático. (COWMAN, 2016)

O parasita possui tropismo pelo fígado, onde inicia o ciclo pré-eritrocitário. Após invasão dos hepatócitos, se diferenciam em esquizontes através de divisões mitóticas por processo denominado de esquizogonia. Os esquizontes liberam os merozoítos na circulação, os quais invadem as hemácias, e iniciam o ciclo eritrocitário. O ciclo pré-eritrocitário dura tipicamente 1 a 2 semanas. *P. vivax* tem a capacidade de permanecer latente no fígado, no estágio de hipnozoíto. No fígado pode ficar por

meses até anos e causar recaídas da doença. As baixas parasitemias podem dificultar o diagnóstico rápido da infecção e permitir o maior tempo de circulação do parasita e sua transmissão (ASHLEY, 2018; SMITH, 2014).

O ciclo eritrocítico dura cerca de 48 horas (a depender da espécie), nessa fase os merozoítos se diferenciam trofozoíto jovem (anel) e posteriormente em trofozoíto maduro. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com consequente formação de esquizontes dando origem aos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos por um processo denominado gametocitogênese. O gamétocito é a forma sexuada e infectante para o mosquito vetor. (ASHLEY, 2018; COWMAN, 2016)

O vetor se infecta ao fazer o repasto sanguíneo em um indivíduo doente. No repasto ingerem os gametócitos. Os gametócitos no intestino assumem a forma arredondada, deixam as hemácias e se diferenciam em gametas. Na exflagelação ocorre o desenvolvimento do microgametócito (gameta masculino) que posteriormente fecunda o macrogametócito (gameta feminino) e forma o zigoto. Este se diferencia em oocineto, forma móvel, que invadem a matriz peritrófica e posteriormente o epitélio intestinal. Na lâmina basal do epitélio intestinal, se diferenciam em oocistos, que atingem a maturidade aproximadamente no 7º dia após a infecção e cerca de 14 dias pós infecção os oocistos se rompem e liberam os esporozoítos, os quais migram pela hemocele até atingirem as glândulas salivares do mosquito, onde ficam armazenadas até um próximo repasto sanguíneo e início de um novo ciclo (COWMAN, 2016; SMITH, 2014).

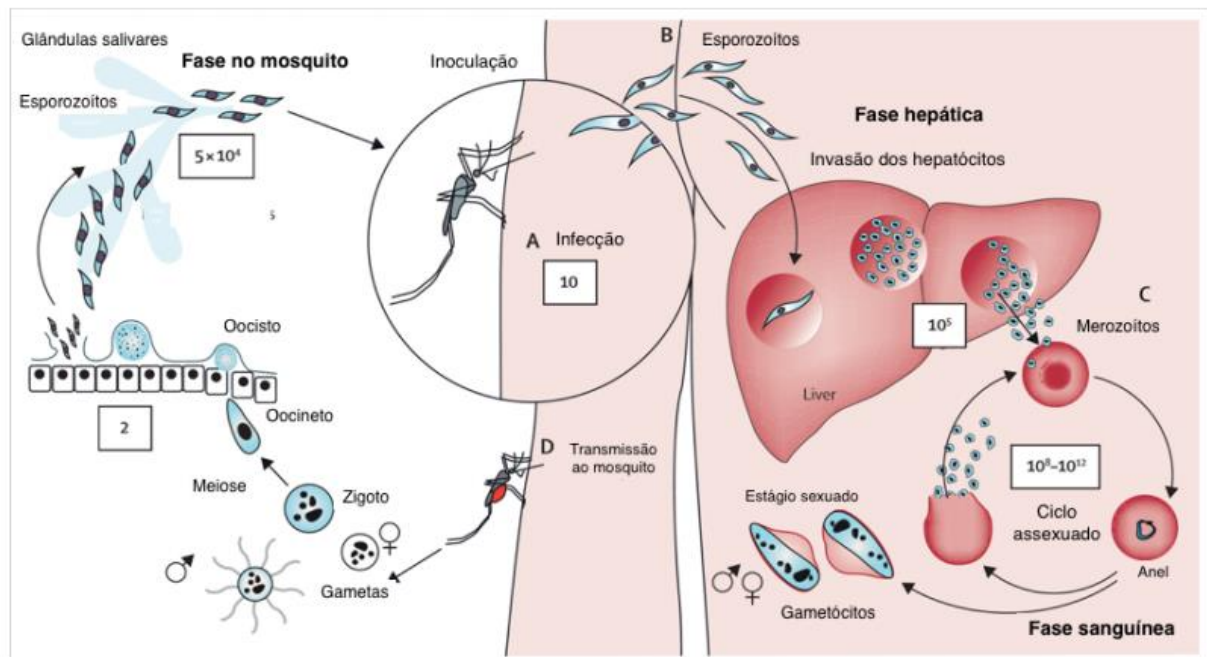


Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium*. (A) O ciclo se inicia com a inoculação dos esporozoítos pelo mosquito vetor. (B) Os esporozoítos invadem os hepatócitos, iniciam a esquizogonia. Os esquizontes formados rompem e liberam os merozoítos na circulação. (C) Os merozoítos invadem as hemácias e se diferenciam em trofozoítos jovens (anel) que amadurecem e posteriormente alguns se diferenciam em gametócitos forma infectante para o mosquito vetor (D). No vetor, os gametócitos sofrem exflagelação gerando gametas que fecundarão formando zigoto, o qual se diferencia a oocineto e posteriormente a oocisto no intestino médio do mosquito. Adaptado de White et al. 2014.

1.5) Dinâmica do parasita no vetor

A transmissão da malária pelo mosquito depende do desenvolvimento esporogônico bem sucedido. O desenvolvimento do ciclo de vida do *Plasmodium* no vetor envolve interações com diversas células e tecidos. Fatores como densidade de gametócitos ingeridos no repasto, alteração de temperatura na transição do parasito do hospedeiro vertebrado para o invertebrado, presença de substâncias antimaláricas no sangue e fatores imunológicos do mosquito bem como fatores parasitários intrínsecos podem influenciar na viabilidade, na migração e infectividade dos gametócitos e conseqüentemente na formação de oocistos. (ASHLEY, 2018).

A interação do *Plasmodium spp.* com o mosquito ocorre de maneira compartimentalizada e cada compartimento possui características moleculares e celulares próprias que favorecem ou reduzem a invasão parasitária.

1.6) Intestino médio

O intestino médio é o primeiro e principal gargalo para o desenvolvimento dos estágios iniciais do *Plasmodium* em anofelinos.

1.6.1) Lúmen do intestino médio

a) Fatores do hospedeiro vertebrado

O sistema complemento faz parte da defesa imune inata e é uma defesa de primeira linha contra patógenos incluindo bactérias, fungos e protozoários. A infecção do hospedeiro humano por parasitas da malária ativa as vias clássicas e alternativas do sistema complemento. Grotendorst e colaboradores (1986) ao comparar a infecciosidade dos anofelinos alimentados com gametócitos de *Plasmodium*, usando soro nativo e inativado por calor (calor degrada a atividade do complemento), observou que os parasitas no soro inativado produziram sistematicamente mais oocistos, demonstrando portanto que o sistema complemento pode ser responsável pela redução do número de parasitas. Curiosamente, os estágios iniciais do parasita no mosquito (gametócitos, gametas e zigoto) são mais protegidos do sistema complemento que os estágios posteriores (oocineto, oocisto), sugerindo que o *Plasmodium* tenha desenvolvido um mecanismo de proteção dos seus estágios mais vulneráveis. (GROTENDORST, 1986; SMITH, 2014)

Estudo realizado por Simon e colaboradores (2013), demonstraram que o pico da atividade do complemento no intestino médio do mosquito é na primeira hora após a alimentação sanguínea e permanece ativo até seis horas após a alimentação. No

entanto, a digestão do bolo sanguíneo não ocorre de forma uniforme, prevê-se que as moléculas do complemento mais próximas da periferia do bolo alimentar serão inativadas mais rapidamente pelo sistema imune do vetor e conseqüentemente os parasitas localizados nessas áreas serão mais protegidos. (SIMON, 2013)

b) Enzimas digestivas

As enzimas digestivas produzidas pelas células epiteliais do mosquito degradam proteínas do soro, células sanguíneas e patógenos ingeridos no repasto sanguíneo. Os estágios iniciais de desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito (Gameta, zigoto e oocineto) são suscetíveis a ação dessas enzimas digestivas no lúmen intestinal. (ABRAHAM, 2004)

A tripsina é a principal enzima digestiva que degrada o bolo alimentar e os parasitos no interior do intestino médio do anofelino. Baia- Da- Silva et al (2018) ao tratar *Anopheles aquasalis* com um inibidor de tripsina, evidenciou um aumento na intensidade da infecção com *Plasmodium vivax*, confirmando portanto que essa enzima modula o desenvolvimento do parasita no vetor. Além disso, a quantidade de glóbulos vermelhos no bolo alimentar influenciam diretamente a produção de enzimas digestivas e isso pode refletir no desenvolvimento do parasito. (BAIA-DA-SILVA et al, 2018; SMITH, 2014).

Alguns fatores contribuem para que os parasitas não sofram degradação enzimática no lúmen intestinal. O primeiro deles é o tempo cronológico de secreção das enzimas. A secreção das principais enzimas ocorre após algumas horas depois do repasto sanguíneo e possui um pico de produção, aproximadamente, 24 horas depois da alimentação, quando o parasita potencialmente já atravessou a matriz peritrófica e o epitélio intestinal. O segundo é o controle do fluxo de enzimas digestivas pela matriz peritrófica (MP), que por sua vez não permite a distribuição homogênea de enzimas no bolo alimentar, assim parasitos próximos a MP estão expostos às enzimas, sendo assim degradados facilmente, enquanto os oocinetos localizados mais no centro do bolo de sangue, e portanto mais distantes da ação dessas enzimas,

conseguem sobreviver e têm maior tempo para se desenvolverem. (ABRAHAM, 2004; SMITH, 2014; DIAS-LOPES et al, 2015; ROMOLI & GENDRIN, 2018)

Atualmente, foram identificadas duas tripsinas (Anaq- Try-1 e Anaq-Try-2) e duas quimiotripsinas (Anachy- 1 e Anachy-2) induzidas pela alimentação sanguínea. Essas enzimas têm sua quantidade máxima de atividade entre 36 e 48 horas após o repasto sanguíneo. Informações sobre a expressão de serina-proteases são escassas. Portanto o estudo da expressão e identificação dessas proteases no intestino do mosquito é necessário e pode ajudar na melhor compreensão da interação *Plasmodium*-vetor e como estratégias para o bloqueio de transmissão (DIAS-LOPES, 2015)

c) Microbiota

O intestino, glândulas salivares e órgãos reprodutivos do mosquito são colonizados por uma microbiota composta por bactérias, vírus e fungos. A microbiota pode (i) interferir na colonização do *Plasmodium* no intestino, (ii) afetar aspectos fisiológicos do mosquito, especialmente sua vida útil, (iii) induzir a resposta imune do mosquito, resposta que pode ter atividade antiplasmodial e/ou (iv) produzir substâncias que podem ter atividade antiplasmodial ou que podem permitir o desenvolvimento do parasito. Dessa forma, a microbiota é considerada alvo potencial para o bloqueio de transmissão e estudos demonstram que o efeito inibitório da microbiota sobre o desenvolvimento do *Plasmodium* independe da espécie de *Anopheles* e *Plasmodium* (ROMOLI & GENDRIN, 2018).

1.7) Matriz peritrófica

A distensão do intestino médio do mosquito por uma refeição de sangue induz as células epiteliais do intestino a secretarem componentes de uma camada conhecida como matriz peritrófica (MP), a qual envolve completamente o sangue ingerido. A MP é composta por proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos ligados estruturalmente por quitina, e é considerada a primeira barreira física que impede o contato direto de patógenos com o epitélio do intestino médio. Contudo, Baia- Da-

Silva et al (2018), demonstraram que a MP pode fornecer um ambiente propício para desenvolvimento do parasita no intestino médio. A MP ao controlar o fluxo de enzimas digestivas produzidas pelo epitélio do intestino médio pode ajudar o desenvolvimento do parasito, ao protegê-lo do dano proteolítico. (BAIA-DA-SILVA et al, 2018; SMITH, 2014; ASHLEY, 2018).

Embora a MP seja considerada a primeira barreira para o desenvolvimento do parasito, o *Plasmodium* desenvolveu mecanismos para driblá-la e assim garantir sua sobrevivência. O oocineto de *Plasmodium* é capaz de secretar quitinases, que rompem a MP e os colocam em contato direto com o epitélio intestinal. Algumas espécies do parasita secretam precursores da quitinase as quais são ativadas pelas proteases do mosquito, indicando assim uma adaptação do parasita ao ambiente rico em proteases do intestino do mosquito para facilitar seu próprio desenvolvimento. (SATO, 2014)

1.8) Epitélio intestinal

A invasão do intestino médio do mosquito vetor é uma etapa crítica para o ciclo de vida do *Plasmodium* e envolve em um primeiro momento, o reconhecimento e adesão a moléculas na superfície do epitélio do intestino médio. Oligossacarídeos e oligoproteínas são importantes ligantes de reconhecimento e adesão e medeiam a invasão de oocinetos no intestino médio do mosquito. Aminopeptidase N1 (APN1), isoforma de proteína como anexina, receptores sequestradores Croquemort (SCRBQ2), proteoglicanos sulfatados, proteína de ligação enolase (EBP) e mucinas, são algumas moléculas na superfície apical do intestino médio do anofelino que são conhecidas por apresentarem um papel importante na invasão de oocinetos, e portanto são alvos para metodologia de bloqueio de transmissão da malária (ZIELER & DVORAK, 2000; MOLINA-CRUZ, 2015; ELDERING, 2016).

Proteínas da superfície de oocineto podem desempenhar um papel importante no processo de invasão do epitélio intestinal. Alguns anticorpos direcionados para essas proteínas podem inibir a invasão do epitélio ou a progressão do oocineto para estágio de oocisto. Por exemplo, anticorpos direcionados para as proteínas

circunsporozoíta ou proteína relacionada a TRAP e proteína adesiva de oocineto (SOAP), podem prejudicar a capacidade de invasão do intestino médio pelo oocineto. (MOLINA-CRUZ, 2015).

1.9) Hemocele

Os mosquitos respondem a organismos estranhos que se acumulam na sua hemocele (sistema circulatório do mosquito), abrangendo processos celulares e humorais visando a destruição do patógeno. Essas respostas incluem fagocitose, encapsulação celular e humoral e produção de peptídeos antimicrobianos. (HERNANDEZ-MARTINEZ, 2002)

Estudos realizado por Blandin e colaboradores (2008) relatou que a proteína específica para hemócitos semelhante ao complemento (TEP1) presente na hemocele de *Anopheles gambiae*, liga-se e medeia a morte dos estágios do parasita *Plasmodium berghei* presente no intestino médio do anofelino. Reforçando, Eldering et al. (2016) reportou que ao silenciar TEP1, houve um aumento significativo do número de oocistos em *An. gambiae*. A TEP1 se comporta como uma opsonina promovendo a fagocitose de bactérias e a melanização do oocineto de *Plasmodium spp.* Outras proteínas que atuam no desenvolvimento do parasita também foram descritas como a proteína de repetição rica em leucina (LRR), a proteína 1 imune de repetição rica em leucina (LRIM1) e a proteína de repetição responsiva a *Anopheles-Plasmodium* rica em leucina 1 (APL1), estes são considerados as principais fatores que regulam a carga parasitária no mosquito juntamente com TEP1. (BLANDIN, 2008; ELDERING, 2016)

1.10) Imunidade do mosquito

Os mosquitos possuem um potencial sistema imune inato que incluem cascatas de coagulação, produção de melanina, fagocitose, encapsulamento, produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Foram descritos alguns fatores moduladores chaves da resposta imune

como a STAT, Rel 1, Rel 2 e Jun/FOS, as quais fazem parte das principais vias de sinalização da resposta imune inata do mosquito JAK-STAT, Toll, Imd e JNK, respectivamente. (BAHIA, 2011; BAHIA, 2018; SMITH, 2014)

As vias Toll e IMD têm sido relacionadas com a produção de peptídeos antimicrobianos a exemplo da cecropina e a defensina. Enquanto a via JAK-STAT tem sido associada à imunidade antiviral e bacteriana. Acredita-se que essas vias também medeiam a resposta anti-*Plasmodium*. Evidências indicam que a via JNK esteja envolvida na resposta imune do mosquito ao *Plasmodium spp.* E ainda que a via JAK-STAT esteja envolvida no controle dos estágios precoces do *Plasmodium vivax* em *An. aquasalis*. Bahia e colaboradores (2018) mostraram mecanismo mediado pelo gene GATA que regula a resposta imune de *Anopheles aquasalis* contra o *Plasmodium vivax*, e esta é a primeira evidência do envolvimento de hemócitos nesse processo. (BAHIA, 2011; BAHIA, 2018; SMITH, 2014)

1.11) Genes que afetam o desenvolvimento do parasito no mosquito

Os genes que afetam o desenvolvimento do parasita podem ser divididos em cinco categorias de acordo com a resposta produzida pelo seu silenciamento. A primeira categoria é aquela que aumenta drasticamente a carga parasitária em mosquitos susceptíveis. A este fenótipo pertence a molécula TEP1, a primeira molécula encontrada para controlar o número de parasitas nos mosquitos. A segunda categoria consiste naqueles que resultam em um fenótipo inverso, ou seja, torna mosquitos suscetíveis em refratários, um exemplo seria o gene cactos, um inibidor do fator de transcrição NF- κ B, que ao ser silenciado inibe completamente o desenvolvimento do parasita. A terceira categoria de genes imunes são aqueles que afetam de forma moderada mas consistentemente a carga parasitária, um exemplo seria a expressão das enzimas serina proteases com domínio CLIP como CLIPB14 e CLIPB15. A quarta categoria compreende a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são induzidas ao longo da alimentação sanguínea, e que por sua vez, comprovadamente, promovem a lise de oocinetos. E por fim a quinta categoria são genes que estão envolvidos na melanização de oocinetos mortos, como por

exemplo, foi evidenciado por Mendes e colaboradores (2008) que a Apolipoforina III inibe a melanização de oocinetos em mosquitos refratários (BLANDIN, 2008).

1.12) Patogênese da malária

Os sinais e sintomas da malária incluem febre, que pode ser periódica, calafrios, sudorese, anemia hemolítica e esplenomegalia. Os picos febris alternados característicos da malária, conhecido como acessos maláricos, são derivados da liberação de merozoítos pelos eritrócitos na corrente sanguínea. Os sintomas, geralmente aparecem quando a parasitemia é superior a 100 parasitas por μL aproximadamente (ASHLEY, 2018).

As manifestações mais comuns de malária grave incluem malária cerebral, lesão pulmonar aguda, que pode progredir para síndrome respiratória aguda, lesão renal aguda, geralmente apresentando necrose tubular aguda e acidose. A malária *vivax* grave tende a ocorrer em pacientes com comorbidades e não é comumente observada em pacientes viajantes primo-infectados. Por muito tempo, acreditava-se que *Plasmodium vivax* era um parasita que apresentava quadro clínico benigno, quando se compara a parasitemia do *P. falciparum* que pode alcançar mais de 100.000/ μL e *P. vivax* não ultrapassa 10.000/ μL , no entanto sabe-se que *P. vivax* pode causar complicações tão graves quanto *P. falciparum*. Esta característica de *P. vivax* se dá pela sua capacidade de alcançar os seios extravasculares do tecido hematopoiético da medula e do baço. (ASHLEY, 2018; WHO, 2018; BAIRD, 2019)

A malária é uma doença tratável e evitável, mas que pode apresentar gravidade se não diagnosticada e tratada precocemente. As infecções pelo *Plasmodium falciparum*, um parasito altamente patogênico e letal, devem ser consideradas uma emergência médica. O diagnóstico e o tratamento precoce da malária reduz a incidência da doença, evitam mortes e contribuem para redução da transmissão. Crianças tem a maior probabilidade de morte por malária, devido à ausência de uma imunidade montada contra o parasito. Distintamente, indivíduos em exposição repetidas durante um longo período ao parasita desenvolvem imunoproteção e menor

probabilidade de apresentar as formas graves e complicadas da doença . Na infecção por *P. falciparum*, a imunoproteção se deve à aquisição de anticorpos contra PfEMP1. A imunidade parcial é perdida de forma gradativa após um indivíduo deixar uma área endêmica, ou em uma população com queda na transmissão (ASHLEY, 2018; Ministério da Saúde, 2019).

As complicações e gravidade da doença anteriormente estava associada exclusivamente ao *P. falciparum*. Contudo, nos últimos anos tem sido relatado complicações relacionadas ao *P. vivax* que incluem por exemplo, malária cerebral, distúrbio respiratório agudo e anemia grave. Anemia é a característica mais comum na malária e é de origem multifatorial. A anemia é resultado da perda de eritrócitos, depuração esplênica de hemácias não infectadas e redução da produção de eritrócitos. Uma das hipóteses da gravidade na malária *vivax* é o processo inflamatório ligado à inflamação mediada por citocinas. No entanto, alguns estudos sugerem que a citoadesão e processo de sequestro de eritrócitos infectados podem contribuir para a gravidade na malária *vivax*. Marín Menéndez et al. (2014), correlacionaram a anemia na malária *vivax* com a formação de rosetas pelo parasita, sendo observado maior frequência de rosetas em indivíduos anêmicos, sugerindo, portanto, que o fenômeno de rosetas possa estar envolvido na complicação da malária *vivax*, no entanto, esse mecanismo ainda não foi bem elucidado (ASHLEY, 2018; CARVALHO, 2010; MARIN- MENENDEZ et al, 2014).

1.13) Malária assintomática

A malária assintomática é frequente no mundo. Em regiões tropicais, a frequência de malária *vivax* assintomática varia entre 30-50%, sendo mais comum em crianças. As infecções assintomáticas muitas vezes passam despercebidas e conseqüentemente não são tratadas, resultando em fontes importantes de gametócitos para vetores locais. Em um estudo realizado por Martins-Campos (2018), usando isolados da amazônia brasileira, relatou que mesmo em isolados com baixa parasitemia foram capazes de infectar mosquitos. Ainda foi observado que portadores assintomáticos mostraram uma proporção maior de gametócitos maduros e foram tão

eficazes quanto os sintomáticos na infecção do anofelino. (KONDRASHIN, 2018; MARTINS-CAMPOS, 2018)

Técnicas moleculares evidenciaram que os parasitas podem persistir por anos sem desenvolver sintomas, muito mais do que se pensava possível anteriormente. O desenvolvimento de uma imunidade protetora e características da biologia do parasita levam à presença de um número significativo de infecções assintomáticas em regiões endêmicas de malária. Estudo realizado por Martins-campos e colaboradores (2018), revelou que indivíduos que tiveram vários episódios anteriores de malária sintomática têm maior probabilidade de se tornarem portadores assintomáticos após a infecção por *Plasmodium spp.* (ASHLEY, 2018; KONDRASHIN, 2018; MARTINS-CAMPOS, 2018)

As infecções assintomáticas são um bom exemplo do equilíbrio entre parasito e hospedeiro, contudo esse equilíbrio pode ser perturbado, em casos de reinfeção ou imunossupressão, por exemplo. Em caso de imunidade reduzida na malária assintomática, a doença pode retornar em sua forma mais grave. Ainda as infecções assintomáticas contribuem para a manutenção da transmissão do parasita dificultando o controle e eliminação da doença. (KONDRASHIN, 2018)

1.14) Sequestro e citoadesão

A clínica e a gravidade da malária é frequentemente causada pelo sequestro dos parasitos na microvasculatura e que levam à inflamação local, hemorragias, dano tecidual e obstrução do fluxo sanguíneo. A alta virulência do *Plasmodium falciparum* é associada ao sequestro de células vermelhas infectadas no endotélio vascular. No sequestro os eritrócitos infectados (iRBCs) aderem a receptores de células endoteliais por meio de proteínas do parasita, a exemplo da proteína 1 de membrana de eritrócito (PfEMP1). (ASHLEY, 2018; CARVALHO, 2010)

PfEMP1 é codificada por genes da família *var*. Essa proteína é exportada para superfície da membrana do eritrócito infectado. A exibição dessas proteínas na superfície resulta em exposição a anticorpos do hospedeiro. Ao passo que a sua

capacidade adesiva, permite que os parasitas sejam sequestrados no leito vascular. Os eritrócitos infectados se ligam a células não infectadas, menos deformáveis, promovendo a obstrução vascular. (ASHLEY, 2018; RECKER, 2018).

Embora os parasitos ao invadirem as células fique restrito ao vacúolo parasitóforo, eles produzem proteínas, a exemplo de PfEMP-1 expressas por *Plasmodium falciparum*, que são exportadas para a membrana do iRBCs. A expressão dessas proteínas na superfície dos iRBCs, torna-os alvo chave para resposta imune adaptativa do hospedeiro. Contudo, o parasito desenvolveu mecanismos de escape a essa resposta, através da expressão de variações antigênicas, a exemplo da variação antigênica dos genes *var*. Alguns estudos relataram que o parasita é adepto à mutações no seu genoma a fim de escapar do sistema imune do hospedeiro. (COWELL, 2018; RECKER, 2018)

Anteriormente, acreditava-se que o fenômeno de citoaderência era restrito apenas a *P. falciparum*, mas atualmente já foi relatado que os glóbulos vermelhos infectados por *P. vivax* são capazes de citoaderir. Contudo, estudos avaliando citoaderência por *P. vivax* são escassos. Lopes et al. 2014, demonstraram que mais da metade dos pacientes diagnosticados com malária *vivax* apresentaram ausência de esquizonte na circulação periférica, sugerindo, assim, que o parasito tenha sido sequestrado na vasculatura profunda e que a maturação dos estágios tardios ocorra fora da circulação periférica. (LOPES, 2014; COWMAN, 2018)

A expressão de proteínas envolvidas na citoadesão são pouco conhecidas para o *P. vivax*, sendo ainda motivo de especulações. Em um estudo Carvalho et al. (2010) utilizando isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira, observaram que células vermelhas infectadas tem capacidade de aderir a ICAM- 1 e CSA, no entanto, com baixa intensidade. Além disso, os autores também mostraram que as proteínas VIR, exclusivas de *P. vivax*, estão associadas a citoadesão ao endotélio. (RECKER, 2018; COWELL et al, 2018; ROBERTS et al, 2018).

1.15) Formação de Rosetas

O *Plasmodium spp.* tem capacidade de aderir a diferentes receptores, tanto no endotélio vascular como às plaquetas e às células não infectadas circulantes. A adesão de um eritrócito infectado por *Plasmodium spp.* a pelo menos dois eritrócitos não infectados é chamada de roseta (CHOTIVANICH, 1998).

Existem duas hipóteses biológicas para a formação de rosetas que podem explicar sua importância na sobrevivência do parasita no hospedeiro. A primeira hipótese é a “invasão assistida por rosetas” que sugere que as rosetas facilitam o encontro de merozoítos recém emergidos das células com eritrócitos não infectados. E a segunda teoria proposta é que as rosetas não infectadas servem como proteção para as células infectadas do sistema imune do hospedeiro. (LEE et al, 2014)

Inicialmente pensava-se que o *P. vivax* utilizava as rosetas para recrutar glóbulos vermelhos não infectados e facilitar a invasão dos merozoítos. No entanto essa teoria foi descartada por Lee et al. (2014), esses autores mostraram que as rosetas de *P. vivax* ocorrem preferencialmente com hemácias maduras, que são refratárias à invasão por merozoítos desta espécie. Para facilitar a invasão dos merozoítos, os esquizontes deveriam aderir a reticulócitos (escassos na circulação periférica) não infectados. (LEE et al, 2014)

Ainda existem poucos estudos sobre a formação de rosetas para *Plasmodium vivax*. A primeira descrição de formação de rosetas na malária vivax foi descrita em 1995 na Tailândia por Udomsanpetch e colaboradores. Até então esse fenômeno era associado somente à malária *falciparum*. Mais tarde, em 1998 Chotivanich et al demonstraram que apesar de raramente *P. vivax* causar malária grave, todos os isolados apresentaram capacidade de formar rosetas, enquanto somente alguns isolados de *P. falciparum* podem formar rosetas, isso sugere que a formação de rosetas sem citoaderência, não é suficiente para causar malária grave e que o *P. vivax* pode apresentar perfis patogênicos semelhantes ao *P. falciparum* (MARIN-MENENDEZ et al, 2013; UDOMSANPETCH et al, 1995; CHOTIVANICH et al, 1998).

Lee et al em 2014 descreveram que a formação de rosetas é uma característica de estágios tardios do *P. vivax*, ocorrendo com trofozoítos maduros e

esquizontes, ou gametócitos com eritrócitos maduros, os chamados normócitos. Estágios jovens do parasita não foram evidenciadas formando rosetas. A frequência de formação de rosetas aumenta com a maturação eritrocitária do parasito. Lee et al, 2014 evidenciaram a formação de rosetas 24 horas após cultivo e aumento da taxa de rosetas com o amadurecimento do trofozoíto. Segundo Chotivanich e colaboradores (1998), o processo de formação de rosetas é dependentes de fatores plasmáticos e evidenciaram que os grupos sanguíneos A e B têm maior capacidade de formar rosetas quando comparados ao grupo O, conhecido como um fator protetor da malária grave. (CHOTIVANICH, 1998; Lee et al, 2014).

Chotivanich et al 1998, descreveram que o plasma de indivíduos saudáveis tem a capacidade de reverter a formação de rosetas, enquanto, que o plasma do próprio paciente não, isso sugere a existência de um componente específico mediado por anticorpos para que as rosetas sejam formadas. Tripsina e heparina também podem reverter a formação das rosetas. Chotivanich et al (1998) observaram que as rosetas de *P. vivax* são extremamente sensíveis à tripsina e são inibidas completamente por heparina. Mais tarde, Lee et al. (2014) demonstraram que a Glicoforina C (CD236R) medeia o processo de rosetas. No entanto, mais estudos são necessários para descoberta de novos receptores eritrocitários. (CHOTIVANICH, 1998; LEE, 2014)

Estudos reológicos de rosetas em *P. falciparum* mostraram que elas são estáveis e que a força de ligação dos eritrócitos infectados aos não infectados tendem a ser muito forte. Zhang et al. (2016) demonstram que as rosetas estão associadas ao aumento significativo na rigidez dos eritrócitos infectados com *P. vivax* e que os responsáveis por essa rigidez são a segmentação dos esquizontes e a própria formação de rosetas. Assim, alterações na membrana da célula infectada por *Plasmodium spp.*, especialmente suas propriedades de adesividade e deformabilidade aumentam a susceptibilidade dos eritrócitos infectados à depuração esplênica. Contudo, o parasita tem mecanismos de escape da depuração esplênica. (ALBRECHT et al, 2020; ZHANG, 2016; Handayani, 2009)

Em estudo recente, Lee et al. (2020), descreveram um novo tipo de roseta, chamado de roseta tipo II e identificaram a proteína IGFBP7 (Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina) que é secretada por monócito em

resposta a invasão do eritrócito e estimulam a formação de rosetas por *P. falciparum* e *P. vivax*. Diferentemente da roseta tipo I formadas pela ligação direta dos eritrócitos infectados aos receptores dos eritrócitos não infectados, na roseta tipo II a ligação é mediada por IGFBP7. Esse tipo de roseta depende de fatores séricos adicionais como o fator de Von WilleBrand (VWF) e a Trombospondina 1 (TSP-1). O IGFBP7 se liga ao Sulfato de Heparan (HS) na superfície do eritrócito não infectado e interage com VWF e TSP-1 estimulando o roseteamento (LEE et al, 2020)

Lee e colaboradores (2020), produziram um ensaio em que adicionaram monócitos cultivados em laboratório na presença de glóbulos vermelhos infectados com *Plasmodium spp.* e observaram-se que as células se agruparam, sugerindo que há na circulação algo alertando o parasita para formação das rosetas e consequente defesa ao ataque imune do hospedeiro. Albrecht e colaboradores (2020) correlacionaram a formação de rosetas à ocorrência de fagocitose, mostrando que a taxa de fagocitose reduz com o aumento da frequência de rosetas, comprovando a formação de rosetas favorece o escape do *P. vivax* do sistema imune do hospedeiro. Uma explicação para isso é que além dos eritrócitos não infectados protegerem os eritrócitos infectados dos anticorpos, fornecem uma barreira física que restringe o contato com fagócitos e outras células efetoras do sistema imune (ALBRECHT, 2020; LEE, 2020)

Importante, estudo anterior do nosso grupo revelou que a formação de rosetas interferia com a infectividade do vetor *An. aquasalis* em infecções experimentais. Salazar & Lopes (2017) demonstraram que isolados formadores de rosetas apresentam maior taxa e intensidade de infecção; ainda que houve uma correlação positiva entre a taxa de roseteamento com a taxa e intensidade da infecção. (SALAZAR & LOPES, 2017)

2) JUSTIFICATIVA:

Embora a descoberta do processo de formação de rosetas em *P. vivax* tenha sido há mais de 20 anos, o seu papel na patologia da malária *vivax* ainda é pouco compreendido. Estudo prévio do nosso grupo observou que isolados que apresentavam altas taxas de roseteamento possuíam maiores taxas e intensidade de infecção de *P. vivax* em anofelinos, contudo os mecanismos pelo qual parasita formador de rosetas consegue maior sucesso na infecção do mosquito ainda não é conhecido. Este projeto, portanto, visou correlacionar a taxa de roseteamento com a taxa e intensidade de infecção no vetor, e elucidar como esta formação pode interferir na infectividade ao anofelino, ao avaliar o comportamento do parasita, bem como a atividade de enzimas digestivas do intestino médio do mosquito e seu impacto no desenvolvimento do parasita.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Avaliar a formação de rosetas por gametócitos de *Plasmodium vivax* e seu papel na transmissão do parasita ao vetor *Anopheles aquasalis*.

3.2) Objetivos específicos

- Avaliar a formação de rosetas por gametócitos em *Plasmodium vivax* em diferentes isolados;
- Verificar se a taxa de formação de rosetas de diferentes isolados de *P. vivax* tem influência na taxa e na intensidade de infecção de *Anopheles aquasalis*;
- Inibir a formação de rosetas de isolados de *P. vivax* com alta taxa de rosetamento e avaliar sua influência na taxa e na intensidade de infecção no *Anopheles aquasalis*;
- Avaliar a cinética de produção e secreção de enzimas digestivas no intestino médio do intestino do anofelino e correlacioná-la à taxa de rosetamento de *P. vivax*.

4) METODOLOGIA

4.1) Local do estudo

Este é um estudo experimental realizado no laboratório do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema e no Insetário Agostinho Cruz da Gerência de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

4.2) Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FMT-HVD (CAAE: 54234216.1.0000.0005). Os voluntários foram recrutados entre Junho de 2019 e Setembro de 2020. Todos os voluntários foram devidamente orientados sobre sua participação, objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3) Delineamento do estudo

4.3.1) Coleta de Sangue

Pacientes maiores de 18 anos e diagnóstico microscópico de malária vivax com densidade parasitária maior ou igual a duas cruzes atendidos na FMT-HVD, foram convidados a participar deste estudo e os que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Posteriormente, 27mL de sangue periférico foram coletadas por punção venosa com sistema à vácuo em tubo BD Vacutainer® contendo heparina. Os pacientes receberam tratamento conforme as diretrizes nacionais de tratamento da malária preconizado pelo ministério da saúde.

4.3.2) Processamento da amostra

O sangue periférico foi centrifugado a 1500 rpm a 37°C por 5 minutos para separação do plasma. As papas de células foram lavadas de 2 a 3 vezes com meio

RPMI e transferidas para coluna de celulose, para remoção dos leucócitos e plaquetas. Os eritrócitos, foram então lavados 2 vezes com meio RPMI e posteriormente passaram por um processo de enriquecimento. Este processo é realizado por meio de um gradiente de concentração de Percoll® a 45%, conforme descrito por Vera et al. (2015). Os eritrócitos parasitados foram transferidos para tubo de Falcon de 15mL e lavado três vezes em meio RPMI. Lâminas foram confeccionadas usando a técnica de esfregaço, para determinar a parasitemia e gametocitemia.

4.3.3) Ensaio de rosetas de *P. vivax*

Para os ensaios de formação de rosetas, as células parasitadas obtidas através do processo de purificação foram ajustadas para uma parasitemia de 10% usando eritrócitos sadios do próprio paciente e hematócrito ajustado a 4% em meio IMDM contendo 20% de plasma autólogo. 50µL da solução foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços, incubadas a 37°C por cerca de 1 hora. Os ensaios foram feitos em duplicata. Após uma hora de cultivo, 200 µL da amostra foi submetido a agitação constante em *vórtex* por cerca de 5 minutos e passagens sucessivas durante 2 minutos em seringa de 1ml, para ruptura mecânica das rosetas.

4.3.4) Avaliação de rosetas

Para avaliação das rosetas presentes no cultivo e na ruptura mecânica, uma alíquota foi removida de cada condição (Plasma-cultura x Ruptura Mecânica), para confecção das lâminas para análise por microscopia de fluorescência. As amostras foram coradas com laranja de Acridina na concentração 1mM e analisadas em microscópio de fluorescência invertido digital EVOS™ FL. A taxa de formação de rosetas, foi então determinada pela razão entre a quantidade de hemácias parasitadas em rosetas e a quantidade total de hemácias parasitadas.

4.3.5) Obtenção de *Anopheles aquasalis*

Mosquitos da espécie *Anopheles aquasalis* foram obtidos em uma colônia bem estabelecida na FMT-HVD. Os insetos na colônia são criados a temperatura de 26-28°C, em unidade de 70-80% e ciclos de 12 horas claro-escuro. As larvas são mantidas em cubas plásticas com solução salina na concentração de 0.2% e alimentadas diariamente com ração de peixe (Tetramin®). As pupas são coletas e transferidas para gaiola de papel até o aparecimento dos adultos que são mantidos por 3 dias com solução açucarada. Para manutenção da colônia fêmeas realizam repasto sanguíneo em camundongos da espécie *Mus musculus* e são colocadas posteriormente em postura forçada.

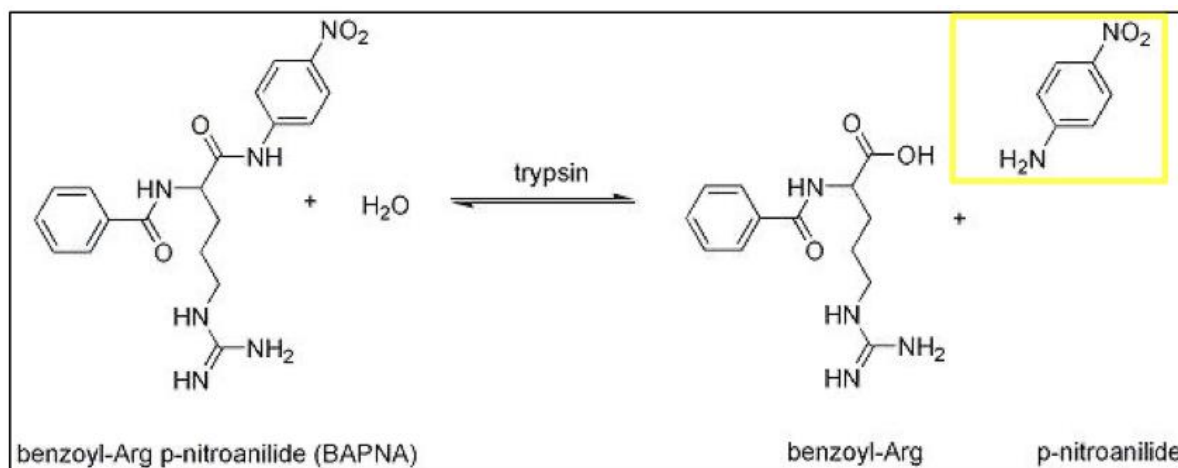
4.3.6) Infecção experimental de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium vivax*

Para infecção experimental, as fêmeas obtidas foram colocadas em jejum por 12 horas e posteriormente cerca de 150 fêmeas foram distribuídas em potes específicos para infecção experimental. A infecção seguiu a metodologia proposta por Pimenta et al. 2015.

Resumidamente, após o cultivo (1 hora) as amostras foram reconstituídas a hematócrito 40% com hemácias e soro do próprio paciente. Em seguida, para as fêmeas de *Anopheles aquasalis* foi oferecido 1ml de sangue em duas condições diferentes: (ii) parasitas cultivados por 1 hora em rosetas e (iii) solução com rosetas rompidas por ruptura mecânica (sem rosetas). Após uma hora do oferecimento das soluções em alimentadores artificiais, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas e colocadas em gaiolas de papel e mantidas com solução açucarada (10%) por 7 dias a temperatura controlada (26- 28°C). No sétimo dia após a infecção, as fêmeas foram dissecadas e os intestinos obtidos. Os intestinos foram então corados com solução de mercurocromo a 2% e analisados por microscopia para determinação das taxas e intensidade de infecção nas distintas condições.

4.3.7) Atividade enzimática

Para análise da atividade enzimática das enzimas digestivas no intestino médio do mosquito, como a tripsina e quimiotripsina, ao longo do bolo de sangue infectado foram realizadas análises da cinética enzimática até às 24 horas da alimentação sanguínea nas condições descritas acima no item 4.3.3 (Isolados formadores de rosetas x Roseta rompida). As fêmeas de *Anopheles* foram alimentadas com sangue infeccioso e adormecidas no gelo e no álcool etílico 70° INPM e dissecadas em PBS 1x nos tempos 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea. Posteriormente, os intestinos médios isolados na dissecação foram transferidos para microtubo contendo 500 µL de água destilada, onde foram isolados e macerados (5 intestinos por grupo), e em seguida o homogeneizado foi levado para centrifugação a 3000 rcf por 10 minutos a 4° C. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo as enzimas foram transferidos para o microtubo e então armazenados a -20°C. Resumidamente, para a análise da atividade enzimática da tripsina e quimiotripsina, as amostras passaram por processo de descongelamento a temperatura ambiente. Após o descongelamento, foram transferidos 10 µL da amostra para placa de 96 poços, em duplicata para cada tempo e isolado, adicionando em seguida 190 µL do substrato cromogênico da tripsina e quimiotripsina (Cloridrato N- Benzoil-L- Arginina 4 nitroanilida e N- Succinil-ALA-ALA-PRO-PHE p-nitroanilida da Sigma-Aldrich®, respectivamente) na concentração de 50 µM em PBS contendo DMSO (0,05%), como controle foi utilizado intestino isolado de anofelinos alimentados com solução açucarada. Então a densidade ótica foi monitorada continuamente a 405 nm e a 30°C durante toda a reação enzimática por 1 hora em leitor de microplacas multimodal de fluorescência GLOMAX®. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 8800 mM/ cm e uma unidade de enzima foi definida como atividade necessária para hidrolisar 1mmol de substrato por minuto. (OKUDA, 2005)



Fonte: <https://pediaindifferencetwotrypsin-and-chymotrypsin/>. Acesso em 25 de Agosto de 2020

Figura 3: Reação de hidrólise do N-Benzyloxycarbonyl-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Reação de consumo do substrato N-Benzyloxycarbonyl-L-arginina-p-nitroanilida pela enzima tripsina formando o produto p-nitroanilida (cor amarela).

4.3.8.) Análise dos dados

Os dados dos pacientes como número de infecções prévias, hematócrito e parasitemia periférica foram determinados através de questionário, hemograma e leitura de lâmina de gota espessa. O número de episódios progressivos foram apontados pelo próprio paciente. O hematócrito foi obtido no equipamento Sysmex e a parasitemia periférica apresentada como parasitas/ μL de sangue foi determinada através da leitura da quantidade de parasitos em 200 leucócitos na gota espessa e ajustados de acordo com os dados do hemograma correspondente. A parasitemia pós Percoll foi avaliada em esfregaço sanguíneo contando-se a razão de células parasitadas pelo número de células totais em pelo menos 500 células. A gametocitemia periférica ou pós Percoll foi determinada através da avaliação morfológica em esfregaço sanguíneo da proporção de parasitos no estágio de gametócitos sendo contados pelo menos 100 parasitos para esta análise.

A taxa de roseteamento foi determinada em microscópio de fluorescência para os grupos avaliados como a razão de parasitas em formação de rosetas pelo número total de parasitas.

Os dados da infecção experimental como número de mosquitos utilizados, número de mosquitos totalmente ingurgitados, número de mosquitos dissecados, número de oocistos encontrados em cada intestino nos dois grupos avaliados para todos os isolados foram obtidos e plotados em planilhas de Excel onde foram determinadas as taxas e intensidades de infecção e taxas de mortalidade.

A determinação das concentrações das enzimas tripsina e quimiotripsina no intestino dos mosquitos foi realizada de acordo com a lei de Beer através da equação:

$$\text{Concentração da enzima } \left(\frac{U}{L}\right) = \left(\frac{\Delta Abs}{d \times \epsilon}\right)(10^6) \left(\frac{V_{total}}{V_{amostra}}\right)$$

O delta da absorbância (ΔAbs) foi obtido através da média da diferença das absorbâncias nos diferentes intervalos de leitura em até 30 minutos após o início da reação. O coeficiente de eliminação (ϵ) das duas enzimas utilizado foi de 8800 mM/min, O comprimento do caminho de passagem da luz (d) utilizado foi de 0,56 cm de acordo com o poço (placa de 96 poços) e volume (200 μ L) utilizados.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism vs 8. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Correlações de Spearman entre taxa de roseteamento e diferentes parâmetros foram realizadas para verificar os fatores que podiam interferir com este fenótipo. Diferenças nas taxas de roseteamento, taxas e intensidade de infecção e taxa de mortalidade entre os grupos rosetas versus ruptura foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon pareado. Diferença na cinética enzimática entre os grupos foi comparada através do teste t com múltipla comparação e correção por Bonferroni.

5) RESULTADOS

5.1) População de estudo

23 pacientes voluntários diagnosticados com malária vivax doaram amostras de sangue para este estudo. A parasitemia periférica média encontrada foi de 7.340 ± 4.896 parasitas/ μ L. A gametocitemia periférica variou de 0% a 85%. A maioria dos pacientes (14) relataram episódios prévios de malária (61%). Dos 23 pacientes 10 apresentaram anemia moderada segundo os critérios da OMS.

Um total de 8.050 mosquitos foram utilizados nos ensaios de infecção experimental, destes 2.282 ficaram totalmente ingurgitados após a alimentação sanguínea e 994 foram dissecados para obter os dados de taxa e intensidade de infecção.

5.2) Ensaio de Rosetas

O enriquecimento das amostras com Percoll® 45%, foi bem sucedido e obtivemos parasitemia que variou entre 30 e 97%, a gametocitemia pós Percoll variou entre 4 a 76% ($30,08 \pm 22,62$). Todos os isolados foram capazes de formar rosetas, com taxa de roseteamento variando entre 5,8% a 27% (média 13%) (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos dados obtidos nos ensaios de formação de rosetas na população de estudo (n=23)

Nº	Parasitas / μ L	Par. Pós-Percoll (%)	Hem (%)	Gam (%)	Rosetas (%)	Taxa de Infecção no mosquito (%)		Intensidade de Infecção (Média \pm Desvio Padrão)	
						ROS	RUP	ROS	RUP
1	2.000	95	42,2	50,0	14,0	43,7	21,4	1,97 \pm 0,06	0,43 \pm 0,96
2	2.075	34	43,2	6,0	10,2	40,0	23,1	0,47 \pm 0,64	0,46 \pm 1,13
3	6.950	97	36,2	1,0	8,2	72,2	46,1	7,83 \pm 4,23	16,38 \pm 25,92
4	11.200	81	44,2	4,0	15,0	50,0	37,5	1,40 \pm 1,71	0,75 \pm 1,16
5	8.650	30	46,1	0,0	27,0	40,0	30,0	0,73 \pm 1,03	0,40 \pm 1,70
6	4.050	75	33,8	2,0	15,6	45,4	30,0	1,36 \pm 1,86	0,40 \pm 1,70
7	17.800	95	43,1	1,0	16,9	35,0	15,4	0,50 \pm 0,89	0,15 \pm 0,38
8	4.375	69	40,1	19,0	11,8	20,0	10,7	0,53 \pm 1,26	0,14 \pm 0,45
9	3.550	65	32,3	4,0	8,6	23,0	12,5	0,31 \pm 0,63	0,25 \pm 0,74
10	4.600	95	33,7	6,0	13,2	44,1	21,0	1,79 \pm 3,68	1,21 \pm 3,32
11	8.600	97	43,8	13,0	6,4	41,6	28,5	2,42 \pm 4,32	2,43 \pm 4,24
12	7.500	97	32,7	2,0	5,8	66,6	66,6	12,33 \pm 15,19	7,33 \pm 11,85
13	1.825	60	39,8	15,0	22,2	19,0	9,5	1,24 \pm 4,78	0,10 \pm 0,30
14	9.800	97	44,1	27,0	14,1	53,3	53,3	11,33 \pm 20,76	9,47 \pm 19,48
15	8.225	65	43,7	27,0	6,9	68,4	62,5	32,42 \pm 41,18	15,63 \pm 17,58
16	8.000	95	40,5	85,0	6,5	10,5	7,1	0,32 \pm 1,00	0,11 \pm 0,42
17	1.825	40	35,4	2,0	9,0	13,8	12,5	0,14 \pm 0,35	0,19 \pm 0,59
18	3.775	67	35,5	39,0	3,9	37,0	7,7	1,26 \pm 3,15	0,08 \pm 0,28
19	16.200	63	40,4	14,0	18,2	34,8	13,0	3,93 \pm 7,70	3,50 \pm 7,15
20	4.450	37	*	8,0	17,1	16,1	20,0	0,45 \pm 1,52	0,40 \pm 0,97
21	16.150	95	*	5,0	14,0	65,7	45,8	19,60 \pm 29,23	7,21 \pm 16,59
22	8.300	87	*	30,0	17,5	28,5	12,5	0,67 \pm 1,32	0,25 \pm 0,76
23	8.925	97	*	5,0	21,7	18,5	16,1	0,30 \pm 0,72	0,21 \pm 0,56

?

Não houve correlação entre a taxa de formação de rosetas e hematócrito ou número de episódios prévios de malária ($p= 0,2011$ e $p= 0,8743$ respectivamente). Também não encontramos correlação entre a taxa de formação de rosetas e a parasitemia periférica, a gametocitemia periférica ou a gametocitemia pós-percoll ($p= 0,1927$, $p= 0,4404$ e $p= 0,0703$, respectivamente) (figura 4).

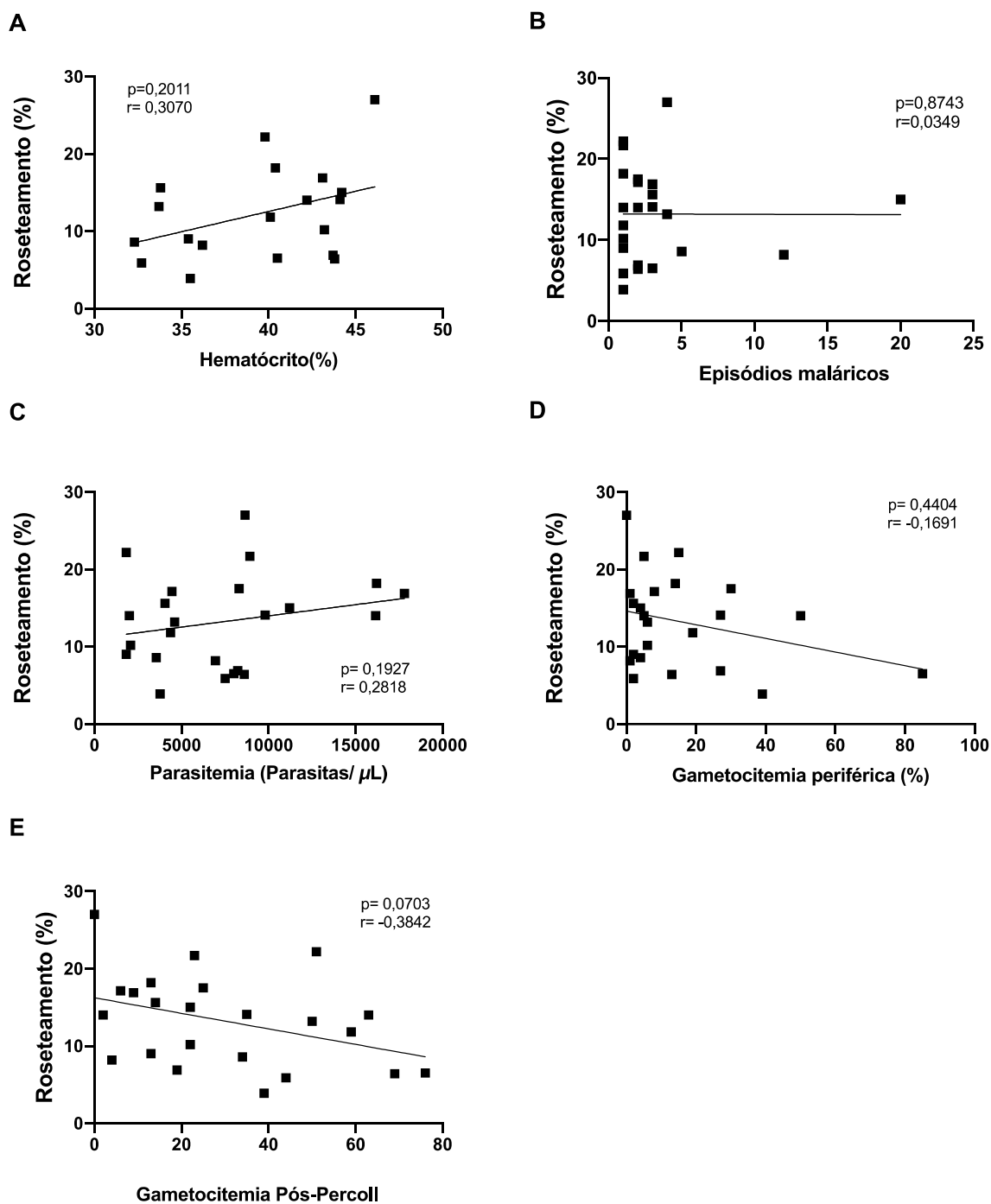


Figura 4: Taxa de roseteamento e fatores envolvidos. Correlação entre taxa de roseteamento e (A) Hematócrito, (B) número de episódios de malária, (C) parasitemia periférica, (D) gametocitemia periférica e (E) gametocitemia pós-percoll. Correlação de Spearman.

O processo de ruptura de rosetas mecanicamente mostrou-se eficaz e nestes a taxa de roseteamento variou entre 0 a 5%. Houve redução significativa na taxa de

roseteamento após processo conforme mostrado na Figura 5 (Teste pareado Wilcoxon, $p=0,0001$).

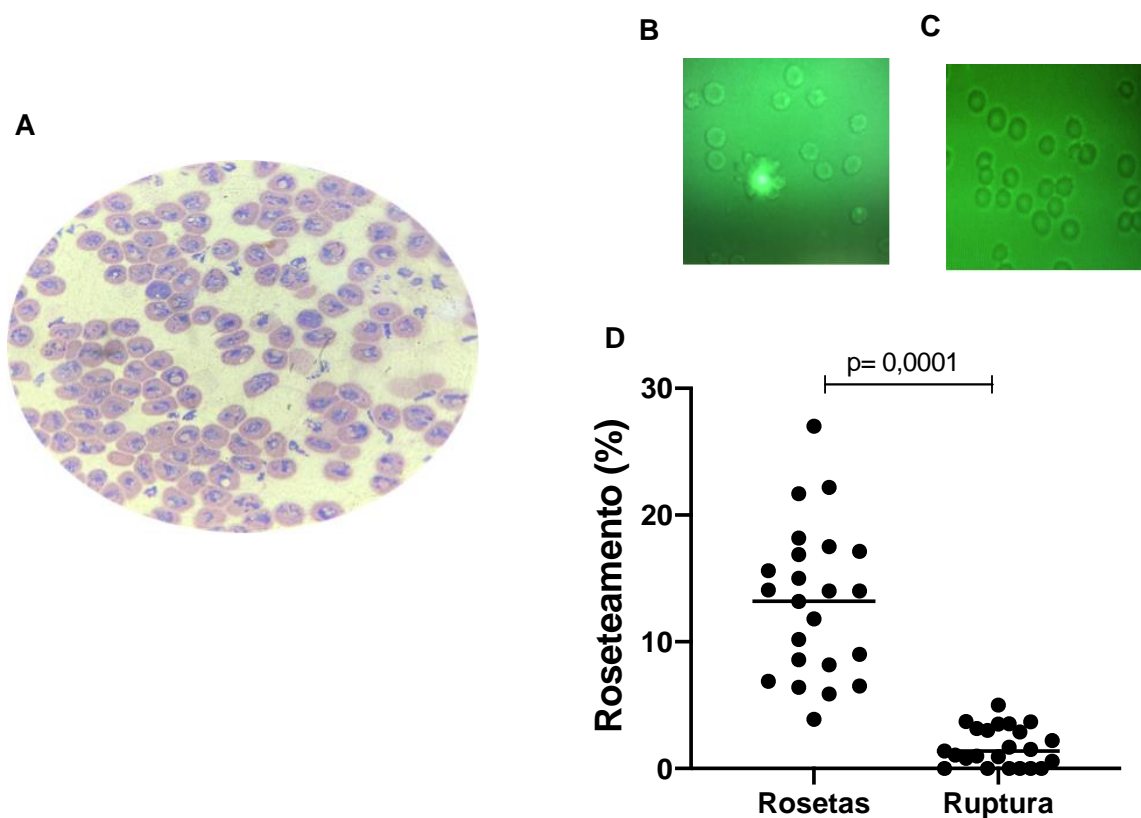


Figura 5: Ruptura mecânica de rosetas formadas por isolados de *Plasmodium vivax* (A) Eritrócitos infectados com trofozoítos e gametócitos após a etapa de enriquecimento da amostra com solução Percoll® 45%. (B) Gametócito em formação de roseta. (C) Ausência de roseta após as amostras serem submetidas à ruptura mecânica de rosetas. (D) Comparação entre taxa de roseteamento em amostras com rosetas (não submetidas à ruptura mecânica) e amostras sem rosetas (submetidas à ruptura mecânica).

5.3) Infecção Experimental

Foi avaliada a infectividade de fêmeas de *An. aquasalis* de 23 isolados em dois grupos pareados (rosetas versus ruptura). Todos os 23 isolados foram capazes de infectar os anofelinos e a taxa de infecção média foi de 37,6% variando de 7,14 a 72,2%. A intensidade de infecção variou de 0,30 a 32,42 (média de $28,67 \pm 33,26$) (Tabela 1). A taxa de infecção foi maior no grupo de rosetas ($37,95 \pm 19,20$) que no grupo ruptura ($26,23 \pm 17,73$) ($p < 0,0001$, Wilcoxon) (Figura 6C). De acordo, a intensidade de infecção também foi maior no grupo de rosetas ($4,49 \pm 7,83$) que no grupo ruptura ($2,93 \pm 4,91$) ($p = 0,0002$, Wilcoxon) (Figura 6D). Não houve correlação positivas entre a taxa de rosetamento e a taxa ou intensidade de infecção ($p = 0,1455$ e $p = 0,3490$, respectivamente) (Figura 6E e F). Não houve diferença na sobrevivência dos mosquitos após alimentação infectiva com amostras com rosetas e sem rosetas (Teste de Wilcoxon, $p = 0,7370$) (Figura 6G).

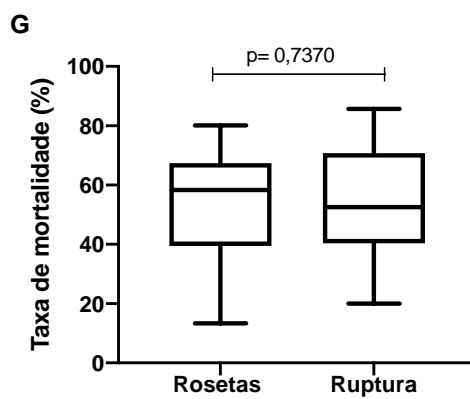
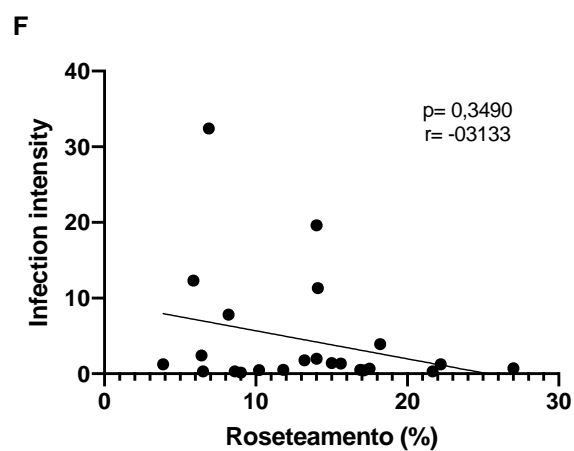
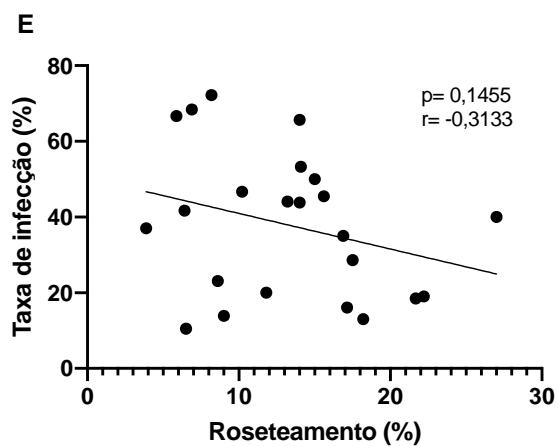
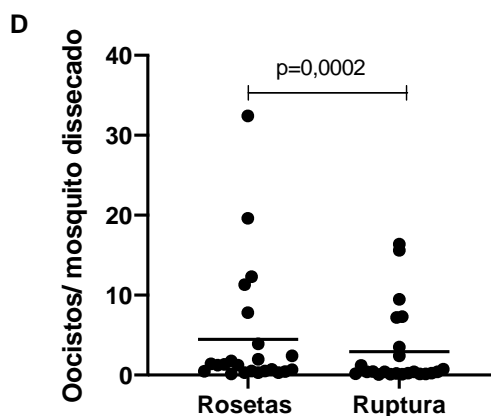
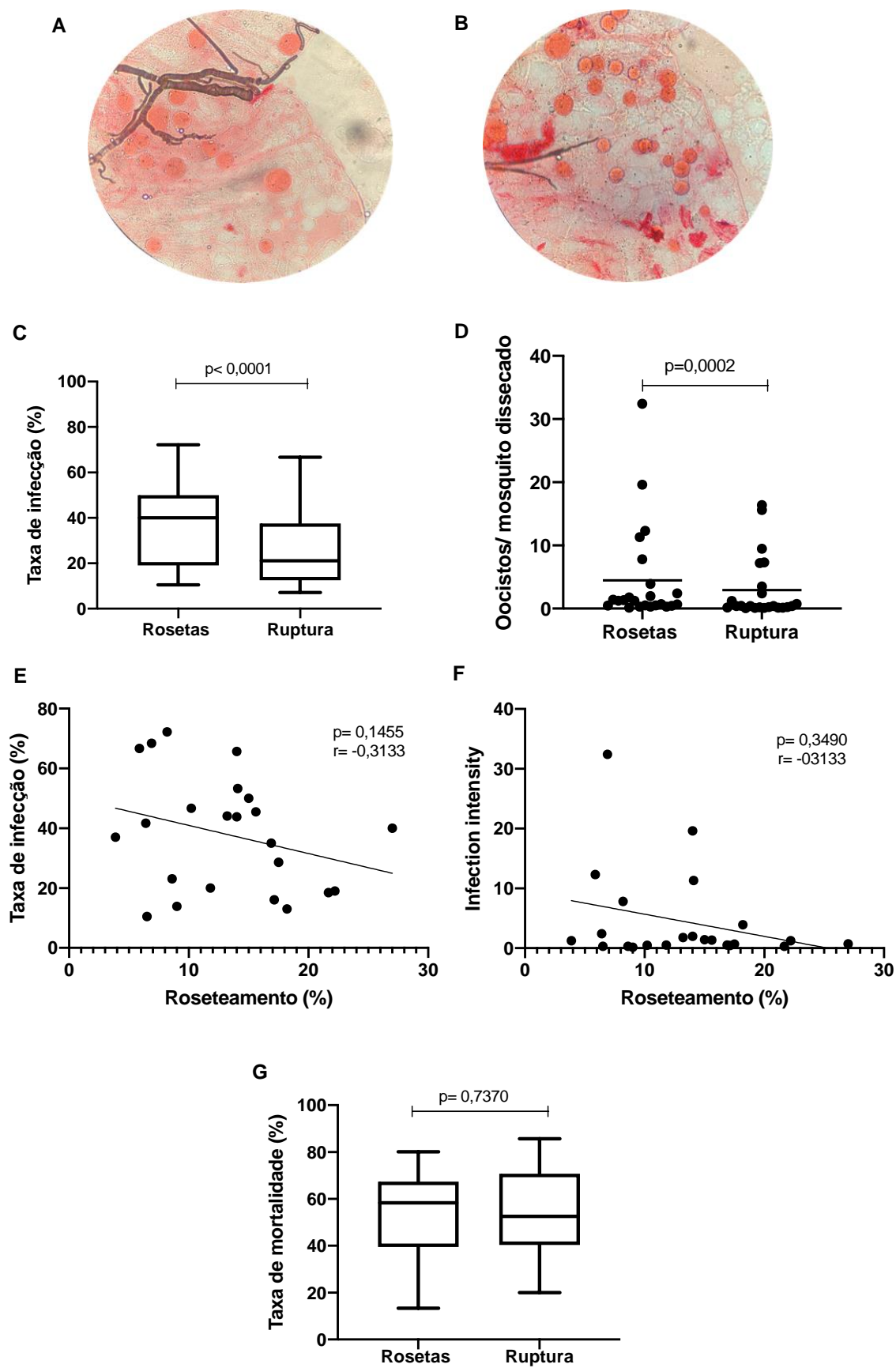


Figura 6: Papel das rosetas na infecção de *Anopheles aquasalis* por *P. vivax*. Foi avaliada a taxa e intensidade de infecção de *An. aquasalis* utilizando 23 isolados de *P. vivax* em duas condições experimentais (rosetas versus ruptura). (A e B) Fotomicrografias representativas de oocistos de *P. vivax* em intestino médio de *An. aquasalis* analisado em microscópio óptico na objetiva de 40x. (C) Taxa de infecção de *An. aquasalis* por *P. vivax* nos dois grupos avaliados. No gráfico valor mínimo, média e máximo representados. P apresentado é referente ao teste pareado de Wilcoxon. (D) Intensidade de infecção (média de oocistos) de *An. aquasalis* por *P. vivax* nos dois grupos avaliados. Cada círculo representa a média de oocistos para cada um dos 23 isolados avaliados. A linha preta corresponde a média dos 23 isolados. p apresentado é referente ao teste pareado de Wilcoxon. (E) Correlação da taxa de infecção e a taxa de roseteamento. (Spearman) (F) Correlação da intensidade de infecção e a taxa de roseteamento. (Spearman) (G) Taxa de mortalidade dos anofelinos após a refeição sanguínea infecciosa e transcorridos os setes dias de infecção, comparando a taxa de mortalidade nas duas condições avaliadas. No gráfico valor mínimo, média e máximo representados. P apresentado é referente ao teste pareado de Wilcoxon.

5.4) Cinética enzimática

A cinética das enzimas tripsina e quimiotripsina após a alimentação sanguínea foi avaliada e comparada em 6 amostras de *P. vivax* nos dois grupos rosetas *versus* ruptura nos tempos 0, 1, 3, 6, 12 e 24h. Há uma clara variação na produção de enzima a depender do isolado utilizado (Figura 7A, B, C e D). No entanto podemos destacar um perfil de aumento de produção de tripsina até 6h da alimentação sanguínea seguido de uma leve queda em 12h e posterior subida em 24 horas no grupo rosetas (Figura 7E). Este perfil é um pouco diferente no grupo ruptura, no qual o aumento é constante até 24h após a infecção, no entanto não encontramos diferença estatística. Para a quimiotripsina, ambos os grupos se comportaram similar com aumento até 6h pós-infecção seguido de leve queda em 12h e posterior aumento em 24h pós-infecção (Figura 7F).

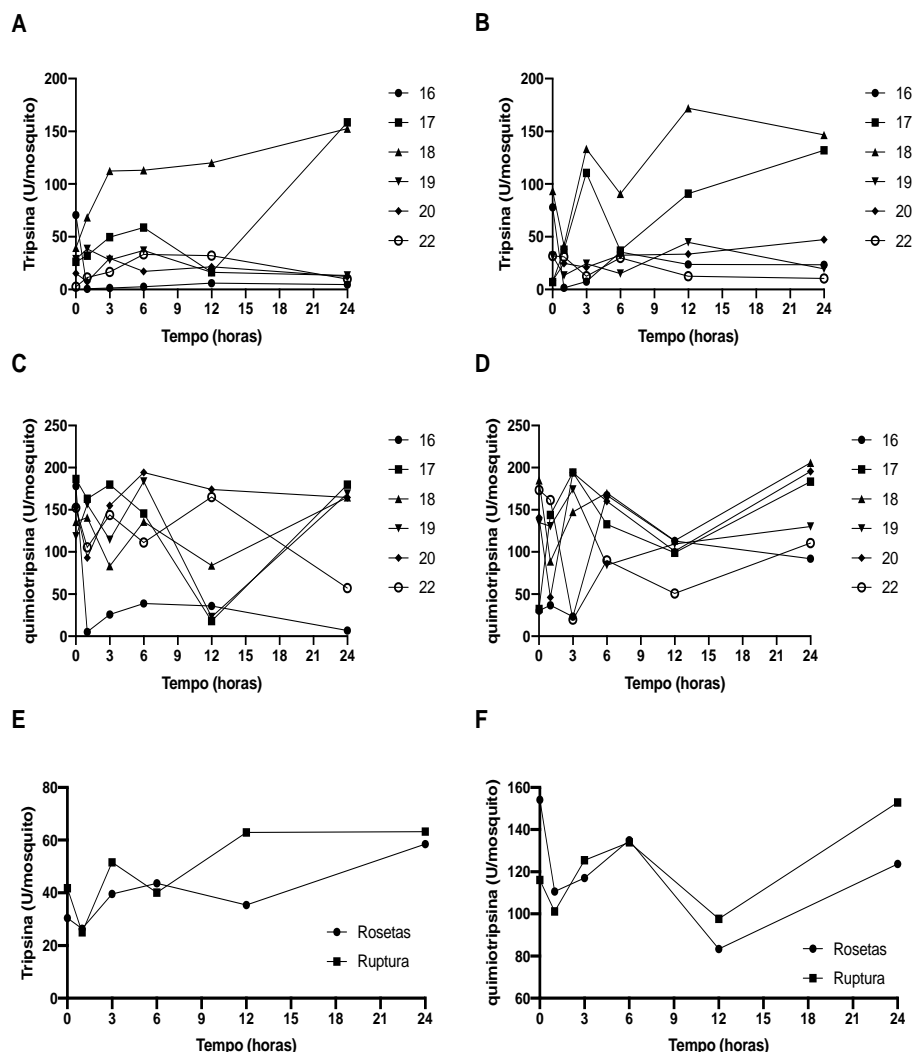


Figura 7. Cinética das enzimas tripsina e quimiotripsina nos mosquitos infectados com *Plasmodium vivax* em formação de rosetas ou após sua reversão. (A) Cinética da produção de tripsina nos intestinos de poll de cinco mosquitos de *Anopheles aquasalis* de 0 a 24h após infecção com 6 isolados de *P. vivax* em formação de rosetas. (B) Cinética da produção de tripsina nos intestinos de poll de cinco de mosquitos *Anopheles aquasalis* de 0 a 24h após infecção com 6 isolados de *P. vivax* que sofreram reversão de rosetas por ruptura mecânica. (C) Cinética da produção de quimiotripsina nos intestinos de poll de cinco de mosquitos *Anopheles aquasalis* de 0 a 24h após infecção com 6 isolados de *P. vivax* em formação de rosetas. (D) Cinética da produção de quimiotripsina nos intestinos de poll de cinco de mosquitos *Anopheles aquasalis* de 0 a 24h após infecção com 6 isolados de *P. vivax* que sofreram reversão de rosetas por ruptura mecânica. (E) Comparação da cinética da produção média de tripsina nos intestinos de 6 isolados de *P. vivax* em formação de rosetas e após sofrerem reversão de rosetas por ruptura mecânica. (F) Comparação da cinética da produção média de quimiotripsina nos intestinos de 6 isolados de *P. vivax* em formação de rosetas e após sofrerem reversão de rosetas por ruptura mecânica.

6) DISCUSSÃO

Embora a patogênese do *Plasmodium vivax* seja pouco compreendida, sabe-se que os reticulócitos infectados aderem a normócitos não infectados, formando as chamadas rosetas, que podem contribuir significativamente para a patogênese e/ou biologia do parasito da malária. Nosso estudo observou a capacidade de gametócitos de *P. vivax* em formar rosetas, corroborando com estudos anteriores de Udomsanpetch et al.(1995), Chotivanich et al. (1998), Lee et al. (2014) e Salazar & Lopes (2017).

Um estudo realizado por nosso grupo, evidenciou que 85,4% dos isolados de amostras de indivíduos com malária vivax tinham capacidade de formar rosetas. A taxa de rosetas variou entre 0 a 50%. No presente estudo, observamos que 100% das amostras analisadas foram capazes de formar rosetas, apresentando uma taxa de roseteamento entre 5,8 a 27%. Estes resultados mostram que fenômeno de roseteamento em *P. vivax* é frequente, sendo mais comum que na infecção por *P. falciparum*. Apesar da alta prevalência de rosetas, o papel biológico desse fenômeno na malária vivax ainda é desconhecido. (CHOTIVANICH, 1998; LEE, 2014; SALAZAR & LOPES, 2017)

O processo de reversão da formação de rosetas de *P. vivax* através da ruptura mecânica em agitação por vórtex e passagem repetida por seringa de insulina foi bem sucedido nestes isolados e pudemos comparar a infectividade de anofelinos do mesmo isolado em formação de roseta e após reversão deste fenótipo. Anteriormente, nosso grupo havia demonstrado que isolados de *P. vivax* com alta taxa de roseteamento eram mais efetivos na infecção de *An. aquasalis*, inclusive com maior quantidade de oocistos nos intestinos, no entanto não estava claro o quanto este fenômeno devia-se a características inerentes ao isolado ou à formação de rosetas. Nossos achados demonstram que a formação de rosetas parece estar envolvida neste aumento da capacidade infectiva, no entanto mais estudos são necessários para compreender como a formação de rosetas propicia esse aumento na infectividade. (ALBRECHT, 2020; CHOTIVANICH, 1998; SALAZAR & LOPES, 2017)

Neste estudo, os isolados com altas taxas de roseteamento podem ser

justificados pelo uso de plasma autólogo para reconstituição da amostra e adequação do hematócrito para os ensaios. Há evidências de que plasma autólogo favorece a formação de rosetas. Albrecht e colaboradores (2020) observaram a formação de poucas rosetas em ensaios em que plasma heterólogo de indivíduo não imune foi utilizado. Esses achados estão de acordo com os dados de Chotivanich e colaboradores (1998). Desta forma moléculas no plasma de indivíduos infectados parecem ter um papel crucial na formação de rosetas. Albrecht et al (2020) demonstraram que a taxa de roseteamento dos isolados está positivamente relacionada à quantidade de IgM no plasma dos indivíduos. Ainda há evidência de que indivíduos com infecções prévias carreguem isolados com maior capacidade de formar rosetas uma vez que indivíduos com presença de IgG1 contra AMA-1 apresentaram maiores taxas de roseteamento. Anticorpos contra AMA-1 normalmente são adquiridos após múltiplas infecções e costumam denotar infecções prévias. (ALBRECHT, 2020; CHOTIVANICH, 1998)

Adicionalmente, dados realizados anteriormente pelo nosso grupo também sugerem que pacientes com história clínica pregressa de infecção por *P. vivax* apresentaram uma maior taxa de roseteamento, sugerindo portanto que há um componente específico mediado por anticorpos para essa atividade. No entanto, neste estudo não observamos uma relação positiva entre o número de episódios maláricos e a taxa de formação de rosetas por gametócitos de *P. vivax*. Estudo realizado por Moll e colaboradores (2015) com *P. falciparum*, revelou que quando *P. falciparum* está em formação de rosetas dá ao parasita a vantagem de bloquear a ligação do eritrócito infectado ao anticorpo e subsequentemente sua depuração por células fagocíticas. A vantagem de sobrevivência para o parasita nas células dos glóbulos vermelhos pode, portanto, levar a uma maior parasitemia. (ALBRECHT, 2020; MOLL, 2015; SALAZAR & LOPES, 2017)

Recentemente, foi sugerido que a formação de rosetas na malária *vivax* é um mecanismo de evasão do parasita ao sistema imunológico do hospedeiro humano, pois em conjunto os dados de Albrecht e colaboradores (2020), evidenciaram que os parasitas que estavam em formação de rosetas são menos fagocitados, quando comparados com aqueles que não formavam rosetas (isolados que tiveram roseta rompida mecanicamente). A explicação para este achado é que os eritrócitos não infectados presentes na roseta protejam os eritrócitos infectados, fornecendo uma

barreira física a estes, impedindo assim que os mesmos sejam reconhecidos pelos fagócitos e sejam então endocitados. É compreensível que roseta seja uma adaptação importante, no entanto, seu papel específico e os mecanismos por trás da formação de rosetas devem ser melhor explorados, para melhor compreensão biológica do fenômeno. (ALBRECHT, 2020)

Fortes evidências sugerem que as rosetas forneçam proteção ao parasita no hospedeiro humano, nós hipotetizamos que as rosetas possam oferecer proteção ao parasita no vetor, propiciando assim a sobrevivência e o subsequente desenvolvimento do parasita no mosquito. Entretanto, os mecanismos pelo qual o parasita se utiliza desse fenômeno a fim de garantir seu completo desenvolvimento no vetor ainda é motivo de especulação. Por essa razão, compreender melhor a interação do parasita e hospedeiro é essencial para entender o comportamento do parasita no interior do mosquito e de que forma isso impacta na transmissão da infecção. (ALBRECHT, 2020)

Estudo anterior realizado por nosso grupo demonstrou que o fenômeno de rosetamento influencia na capacidade infectiva do parasita ao vetor. Entretanto, não conseguiu se estabelecer a relação causal entre a formação de rosetas e o aumento da taxa de infecção no anofelino. Neste estudo fomos capazes de evidenciar que as rosetas propiciaram o aumento na taxa e intensidade de infecção pois conseguimos comparar o fenômeno utilizando o mesmo isolado. Estudos reológicos de rosetas em *P.falciparum*, realizado por Zhang e colaboradores (2016), evidenciaram que a ligação entre os eritrócitos infectados e não infectados é tão forte que mesmo sob grande pressão as rosetas são mantidas, o que nos permite especular que as rosetas são mantidas durante o repasto sanguíneo e consequentemente nos permitiu comparar as duas condições de infecção experimental no anofelino: na presença de rosetas de *P.vivax* e ausência de rosetas. Um limitante a ser considerado é que não sabemos se a ruptura mecânica teve influência na viabilidade do parasita e portanto em sua infectividade no anofelino, no entanto, devido aos achados anteriores com os diferentes isolados, especulamos que a formação de rosetas possa ser a mediadora desta maior taxa de infecção. Estudos da viabilidade do parasita como exflagelação ou marcadores de viabilidade mitocondrial como rodamina devem ser realizados para confirmar nossos achados. (SALAZAR & LOPES, 2017; ZHANG, 2016)

Estudo realizado por Albrecht e colaboradores (2020) evidenciaram que o processo de rosetas relaciona-se com a parasitemia, pois pacientes com maior parasitemia apresentaram maior frequência de rosetas. No entanto, em nosso estudo não encontramos correlação positiva com a parasitemia, nem gametocitemia periférica e pós-percoll e a taxa de roseteamento de *P. vivax*. Um fato que pode ter contribuído para esta diferença é que os ensaios conduzidos por Albrecht et al. (2020) incubaram o parasita por cerca de 24h para seu amadurecimento e investigou a formação de rosetas pelos estágios assexuais maduros do parasita que sabidamente fazem mais rosetas; enquanto nosso estudo não cultivou o parasita para seu amadurecimento e desta forma avaliamos a formação de rosetas pelos parasitas nos estágios presentes na circulação no momento da tomada do sangue pois objetivamos avaliar o papel das rosetas nos estágios infectantes ao vetor (gametócitos). (ALBRACHT, 2020; LEE, 2014)

Esperávamos encontrar relação entre a gametocitemia pós-Percoll e a taxa de roseteamento, ou seja quanto mais gametócitos presentes na amostra maior capacidade de formar rosetas, no entanto, um fato que pode ter contribuído para a não relação é o gradiente de Percoll 45% recuperar também parasitas em estágios assexuais maduros e estes sabidamente apresentarem fenótipo de rosetas elevado. Também não encontramos relação com a gametocitemia periférica, mas como o perfil de parasitas é modificado após o gradiente este achado não apresenta grande importância. Independente da relação entre roseteamento e a presença de gametócitos, pudemos demonstrar que a formação de rosetas parece atuar para proteger o parasita e auxiliar na manutenção do seu ciclo no vetor.

Estudo feito por Marín Menéndez et al. (2013), correlacionaram também anemia com a formação de rosetas na malária *vivax*. Eles observaram que a frequência de rosetas era maior em indivíduos anêmicos quando comparado com indivíduos não anêmicos. No entanto, no presente estudo observamos que as rosetas foram independentes de hematócrito, similar aos achados de Albrecht et al (2020). Marín Menendez et al (2013) avaliou isolados de mulheres grávidas e os achados diversos podem se explicar por este cenário, ainda eles não utilizaram plasma autólogo nos ensaios o que pode ter levado a uma menor frequência e taxas de roseteamento. Baia- da-Silva et al (2018) demonstraram que hematócritos mais altos

conferem maior taxa e intensidade de infecção nos anofelinos, ou seja, repasto sanguíneo de anofelinos em indivíduos anêmicos podem levar a menor capacidade infectiva do vetor. Uma possível causa é o menor aporte de células do sangue, o que configuraria uma menor ingestão de parasitos. Mas outros fatores como fluxo de enzimas e localização no bolo alimentar podem ter contribuído para o fenômeno. Em nosso estudo, o hematócrito foi artificialmente padronizado para 40% em todos os grupos e isolados e não influenciou os achados. (ALBRECHT, 2020; MARIN-MENENDEZ, 2013; BAIA-DA-SILVA, 2018)

Para garantir seu completo desenvolvimento no anofelino o parasita se utiliza de algumas estratégias para driblar o sistema imunológico do mosquito. Há alguns estudos que descrevem mecanismos possíveis que estejam envolvidos no sistema imune do anofelino durante a evasão do *Plasmodium spp.* A exemplo é a Pfs47, uma molécula expressa na superfície de gametócito e gameta de *Plasmodium spp.*, a qual é utilizada pelo parasita como artifice para driblar o sistema imune do vetor. Há evidências de que a evasão do sistema imune mediada por Pfs47 é fundamental para a eficiente transmissão da malária por *An. gambiae*, além disso, verificaram que a interrupção de Pfs47 reduziu a sobrevivência do parasita no mosquito, e esse fenótipo pode ser revertido por complementação genética do parasita ou por desregulação do sistema complemento do mosquito, suprimindo a nitrificação do intestino médio, a qual é fundamental para ativar o sistema complemento. Ramphul et al, analisou se Pfs47 afetavam as vias de transdução de sinal que medeiam as respostas imunológicas do mosquito, e portanto mostrou que o Pfs47 altera o caminho da morte celular das células invasoras do intestino médio, interrompendo a sinalização de JNK e impedindo a ativação de caspases, resultando assim em uma resposta de nitrificação ineficaz fazendo com que o parasita fique indetectável pelo sistema complemento. Com isso a interrupção da ação imunomoduladora do gene Pfs47 no mosquito vetor pode ser uma possível metodologia para diminuir a transmissão da malária (YUOUNG, 2005; MOLINA-CRUZ, 2013; RAMPHUL, 2015).

Evidências sugerem que o sistema imune inato do mosquito tem um papel importante na morte de parasita nos estágios de oocineto e oocistos. A exflagelação e fecundação dos gametas de *Plasmodium spp.* e o desenvolvimento do oocineto são os primeiros passos cruciais que medeiam a transmissão bem sucedida do parasita da malária no vetor *Anopheles*. Mas nossa compreensão sobre resposta imune anti-

plasmodium que limitam esses estágios permanece incompleto. Em estudo recente, realizado por Ukegbu e colaboradores, demonstrou uma proteína de superfície de oocineto e esporozoíto designada como PIMMS43 (Screen 43 de infecção por *Plasmodium* no intestino do mosquito) a qual é requerida na resposta semelhante ao complemento durante a evasão do parasita em *An. coluzzii*. A transcrição de PIMMS43 se inicia em gametócitos com pico em zigoto e oocineto, não aparecem em oocistos (10 dias após a alimentação sanguínea) mas reaparecem na glândula salivar sugerindo sua expressão em esporozoítos. Assim, o estudo concluiu que a proteína PIMMS43 é importante para evasão do sistema imune do mosquito vetor pelo parasita, para isso, observaram que ao adicionar anticorpo contra PIMMS43 na refeição sanguínea afetou diretamente a evasão imunológica do parasita reduzindo significativamente a prevalência e a intensidade da infecção. Em adição, alguns autores evidenciaram moléculas que são expressas na superfície do intestino do mosquito como Agmuc 1, carboxipeptidase B, aminopeptidase N, o glicosaminoglicano sulfato de condroitina (CSGAGs), as quais estão envolvidas no desenvolvimento do *Plasmodium spp.* no vetor, e são capazes de reduzir o número de parasita no hospedeiro invertebrado. (UKEGBU, 2020; KWON, 2017).

O efeito das proteases do mosquito no desenvolvimento do *Plasmodium spp.* sugere que a digestão do sangue e desenvolvimento do parasita no interior do intestino médio do mosquito estão intimamente conectados. Estudo realizado por Almeida et al. (2003) identificaram quatro genes de serina proteases denominadas como Anachy 1 e Anachy 2 em *Anopheles aquasalis*, e Andchy 1 e Andchy 2 em *Anopheles darlingi*, os quais codificam quimiotripsinas no intestino médio do mosquito. O padrão da expressão de genes da quimiotripsina em *An. aquasalis* indicou que são induzidos por alimentação sanguínea e são detectáveis somente 24 horas após a alimentação. Em 44 horas após alimentação observou que Anachy 1 e Anachy 2 não foram detectáveis indicando que a transcrição dessas enzimas foram eliminadas ao final da digestão. Esse processo de identificação dos genes induzíveis da quimiotripsina é um passo essencial para a compreensão do processo de digestão de sangue no intestino do anofelino, pois a secreção dessas enzimas digestivas podem interferir diretamente no desenvolvimento do *Plasmodium spp.* no interior do anofelino. Estudo realizado por Pimenta e colaboradores (1997), evidenciou que ao passo que a matriz peritrófica pode servir como uma barreira para o desenvolvimento

da infecção por *Leishmania spp.* em mosquitos, pode também promover a sobrevivência parasitária ao moderar a atividade das proteases no interior do intestino médio. (ALMEIDA, 2003; PIMENTA, 1997)

Um estudo realizado por Baia- Da-Silva et al (2018) tratou anofelinos com um inibidor de tripsina o que resultou em um aumento na intensidade da infecção, evidenciando assim que a expressão dessas enzimas podem modular o desenvolvimento do parasita *Plasmodium spp.* no mosquito vetor. Por esta razão, hipotetizamos que isolados em formação de rosetas reduzem de alguma forma a secreção de enzimas digestivas como a tripsina e quimiotripsina, aumentando portanto a taxa e intensidade de infecção no mosquito. Entretanto não encontramos diferença na cinética de produção destas enzimas nos grupos avaliados, sugerindo que outros fatores além da presença destas enzimas possam ter impactado na diferença encontrada na taxa e intensidade de infecção nos isolados formadores de rosetas. Em estudo realizado por Okuda e colaboradores (2005), evidenciou que a atividade da quimiotripsina e tripsina extraídas do intestino médio de *Anopheles darlingi* atingiam seu pico de atividade às 24 horas após a alimentação sanguínea, e eram mantidas até as 36 horas, posteriormente sua atividade diminuía gradativamente. Um limitante de nosso estudo é que estudamos a cinética destas enzimas até 24h após a alimentação, uma vez que especulamos que estas teriam papel na formação do zigoto, oocineto e invasão do epitélio, mas não avaliamos após este período onde estas enzimas podem também ter relevância na ação anti-parasitária, (BAIA-DA-SILVA, 2018; OKUDA, 2005).

7) CONCLUSÕES

- Todos os isolados de *Plasmodium vivax* (n=23) foram capazes de formar rosetas.
- Maior taxa e intensidade de infecção no *Anopheles aquasalis* em isolados formadores de rosetas do que em isolados que tiveram rosetas rompidas. Portanto este fenômeno aumenta eficácia da infecção no mosquito vetor, ampliando nosso conhecimento sobre a patogênese da malária *vivax* e abrindo novos caminhos para a pesquisa dos fenômenos de citoadesão como ferramentas para o controle da doença mediante estratégia de bloqueio de transmissão.
- Não houve diferença significativa na cinética de produção das enzimas tripsina e quimiotripsina entre os grupos analisados (Rosetas x Ruptura), sugerindo que outros fatores estejam impactando na capacidade infectiva do vetor.
- Necessidade de estudos a posteriori visando elucidar os mecanismos pelo qual o parasita *Plasmodium spp.* se utiliza do fenômeno de formação de rosetas para uma eficiente infecção no mosquito vetor.
- Nossa perspectiva futura neste estudo é realizar ensaios de RT-PCR de oocineto de *Plasmodium vivax* para identificar se o sucesso da infecção por *P. vivax* em formação de rosetas se sucede à invasão do oocineto no epitélio do intestino médio, isto é, ainda nos estágios sexuais do parasita ou após a invasão. Para então determinar a etapa crítica para o desenvolvimento do *Plasmodium spp.* em rosetas no mosquito vetor.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 34, p. 667- 671, Mar, 2004. DOI: 10.1016/j.ibmb.2004.03.019

ALBRECHT, L. et al. Rosettes integrity protects *Plasmodium vivax* of being phagocytized. *Scientific Report*. v. 10 (1), Oct, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-73713-w.

ADAMS, J.H.; MUELLER. I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect. Med*, Sep. 2017. DOI: 10.1101/cshperspect.a025585.

ALMEIDA, R.W. et al. Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, p. 307- 315, Mar 2003. DOI: 10.1016/s0965-1748(02)00245-x

AREVALO-PINZON, G. et al. *Plasmodium vivax* cell traversal protein for ookinetes and Sporozoites (CelTos) functionally restricted regions are involved in specific Host-pathogen interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, Mar, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00119

ASHLEY, A. E.; PHYO, P. A.; WOODROW. J. C. Malaria Review. *The Lancet*, Apr, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6.

BAHIA, C. A. et al. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *National Institutes of Health*, Sep 2014, 16(9): 2980–2994. doi:10.1111/1462-2920.12381.

BAHIA, C. A. et al. An *Anopheles aquasalis* GATA factor serpent is required for immunity against plasmodium and bacteria. *PLoS Negl Trop Dis*, Sep 2018. 12(9): e0006785.

BAHK, Y. et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* causing epidemic malaria in the republic of korea. *Korean Journal Parasitology*, Dec 2018. DOI: 10.3347/kjp.2018.56.6.545

BAIRD, J.K. ``Lively``invasive *Plasmodium vivax* causes severe and complicated malaria. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 30 (7- 8), Aug 2019. DOI: 10.1016/j.tmaid.2019.06.004.

BAIA-DA-SILVA, C. D. et al. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. *Parasites & Vectors*, Mar 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2752-5.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*, v. 24 (2), p. 377- 410, Apr, 2011. DOI: 10. 1128/CMR.00051-10

BHATNAGAR, R. K. et al. Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. *Biochemical and Biophysical research communications*. v. 304 (4), p. 783-787, May 2003. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00682-x

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Ministério da Saúde, 2010.

BELACHEW, B. E. Immune response and evasion mechanisms of *Plasmodium falciparum* parasites. *Journal of Immunology*, Mar 2018. DOI: 10.1155/2018/6529681

BOURGARD, C. et al. *Plasmodium vivax* biology: Insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8 (34), Feb 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.0004.

BORLON, C. et al. Cryopreserved *Plasmodium vivax* and cord blood reticulocytes can be used for invasion and short term culture. *International Journal Parasitology*, p. 155-160, Feb 2012. DOI 10.1016/j.ijpara.2011.10.011.

CARVALHO, O. B. et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax* infected erythrocytes. *The journal Infectious diseases*, v. 202, p. 638- 647 Aug 2010. DOI : 10.1086/ 654815

CHAVES, M. S. L. et al. Abundance of impacted forest patches less than 5Km² is a key driver of the incidence of malaria in Amazonian Brazil. *Scientific Reports*, May, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25344-5.

CHOTIVANICH, T. K. et al. Characteristics of *Plasmodium vivax*- infected erythrocyte rosettes. *American society of tropical medicine and hygiene*, p. 73- 76, Jul 1998. DOI:

CLAYTON, A. M.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. The Anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. *J Innate Immun*. 2014;6(2):169-81. Aug, 2014. DOI: 10.1159/000353602.

COSTA, F.T.M. et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malária: Perspectives from the Brazilian field. *International Journal of Parasitology*, p. 1099- 1105, Nov. 2012. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.08.007.

COWMAN, F. A. et al. Malaria: Biology and disease. *Cell*, p. 610- 624, Oct 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.055.

COWELL, N. A. et al. Mapping the malaria parasite druggable genome using in vitro evolution and chemogenomics. *Malarial Genomics*, p. 191- 199, Jan, 2018. DOI: 10.1126/Science.aan4472

DESSENS, J.T et al. SOAP, a novel malária ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Molecular Microbiology*. v. 19(2), p. 319-29, Jun 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03566.x

DIAS-LOPES, G. et al. Expressing of active trypsin-like serine peptidases in the midgut of sugar-feeding female *Anopheles aquasalis*. *Parasites & Vectors*. Biomed Central, May, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0908-0.

ELDERING, M. et al. Variation in susceptibility of African *Plasmodium falciparum* malaria parasites to TEP1 mediated killing in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nature Publishing Group*. v. 6 (20440), Sep 2016. DOI: 10.1038/srep20440

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, p. 284, May. 2016. DOI: 10.1186/s12936-016-1335-1.

FURUYA, T. et al. Reticulocytes from cryopreserved erythroblasts support *Plasmodium vivax* infection in vitro. *National Institutes Health*, p. 278- 284, Apr, 2014. DOI: 10.1016/j.parint.2013.11.011.

GETHING, P. W. et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*, p. e1814, 2012.

HANDAYANI, S. et al. High deformability of *Plasmodium vivax*- infected Red Blood cells under microfluidic conditions. *J Infect Dis*, v. 199(3), p. 445- 50, Feb, 2009. DOI: 10.1086/596048.

HAY, S.I. et al. Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Med* ;7(2):e1000209, Feb. 2010.

HERNANDEZ-MARTINEZ,S. et al. Cellular mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: *culicidae*). *Journal of Medical entomology*, v. 39 (1), p. 61- 69, Dec 2001. DOI: 10.1603/0022-2585-39.1.61.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* root with respect to vector importance: A review. *Parasite & Vectors*, Sep 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-177

HILLYER, J.F.; BARREAU, C.; VERNICK, K.D. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoites destruction in the mosquito. *International Journal Parasitology*, v. 37 (6), p. 673- 681, May 2007. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.12.007.

LEITE, A. H. F. et al. Malaria: from old drugs to new molecular targets. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v.2, n.4, p. 59-76, Dec 2013. DOI: 10.5433/2316-5200.2013v2n4p59.

LOPES, P. C. S. et al. Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *Brief Report*, p. 1403-1407, Jan 2014. DOI: 10.1093/infdis/jiu018.

MACKINNON, M.J; BELL, A; READ, A. F. The Effects of Mosquito Transmission and Population Bottlenecking on Virulence, Multiplication Rate and Rosetting in Rodent Malaria. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 145- 153, Feb 2005. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.11.011

MARTINS, L. M. O. et al. Diversity of Anopheles mosquitoes from four landscapes in the highest endemic region of malaria transmission of Brazil. *Journal Vector of Ecology*, p. 235- 244, Jun 2018. DOI: 10.1111/jvec.12307.

MARTINS-CAMPOS, K.M. et al. Infection of *Anopheles aquasalis* from symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections in Manaus, western Brazilian amazon. *Parasites & Vectors*, v. 11 (1) , May 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2749-0.

MENENDEZ-MARIN, A. et al. Rosetting in *Plasmodium vivax*: A cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, Apr 2013. e2155.

MOLINA-CRUZ, A. Et al. The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science*, v. 340 (6135), May 2013. DOI: 10.1126/Science.1235264

MOLL, K. et al. Evasion of immunity to *Plasmodium falciparum*: Rosettes of blood group A impair recognition of PfEMP1. *PLoS One*, v. 10 (12), Dec 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145120.

MULLER, H.M. et al. Members of a trypsin gene Family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *The EMBO journal*. v. 12(7), p. 2891-2900, Apr 1993.

OLIVEIRA- FERREIRA, J. Et al. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, p. 115, Apr 2010. DOI: 10.1186/1475-2875-9-115.

OLIVEIRA, M. D. L.; OLIVEIRA, M. A. J. Malaria: A dynamic approach about the disease. *Health and Diversity*, v. 1, p. 78- 85, Oct, 2017. e2625.

OKECH, A.B. et al. Larval habitats of *Anopheles gambiae* s.s (Diptera: Culicidae) influences vector competence to *Plasmodium falciparum* parasites. *Malaria Journal*, Apr, 2007. DOI: 10.1186/1475-2875-6-50.

OKUDA, K. et al. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *Journal of Insect Physiology*, v. 51, p. 769- 776, Mar 2005. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2005.03.010.

PIMENTA, P.F.P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, v.115, Oct 1997. DOI: 10.1017/s0031182097001510

RAMPHUL, U. N. et al. *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 112 (5):1273-80, Feb 2015 . DOI: 10.1073/pnas.1423586112

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, Jul 2017. DOI: 10.1186/s12936-017-1925-6

RECKER, M.; BULL. C. P.; BUCKEE, O. C. Recent advances in the molecular epidemiology of clinical malaria. *F1000Research*, Aug 2018. DOI: 10.12688.f100research.14991.1.

ROBBIANI, F. D. et al. Plasmodium infection promotes genomic instability and AID-dependent B Cell Lymphoma. Cell, p. 727- 737, Aug 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.019.

ROMOLI, O.; GENDRIN. M. The tripartites interactions between the mosquito, its microbiota and Plasmodium. Parasites & Vectors, Mar 2018. DOI: 10.1186/ s13071-018-2784-x.

SATO, Y.; MONTAGNA, G.N.; MATUSCHEWSKI,K. *Plasmodium berghei* sporozoites acquire virulence and immunogenicity during mosquito hemocoel transit. Infection and Immunity, v. 82, p. 1164- 1172, Mar 2014. DOI: 10.1128/AL.00758-13.

SHAW- SALIBA, K. et al. Infection of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. International Journal Parasitology, p. 679- 83, Oct 2016. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.06.003.

SINGH, N. et al. Experimental evaluation of cryopreservative solutions to maintain in vitro and in vivo infectivity *P. berghei* sporozoites. PLoS ONE, May 2017. 12(5): e0177304.

SINKA, E. M. et al. A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors. Apr 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-69.

SMITH, C.R.; VEGA-RODRIGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The *Plasmodium* bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, p. 644- 661, v. 109(5), Aug 2014. DOI: 10.1590/ 0074-0276130597.

SMITH, M.L & STYCZYNSKI, M. P. Systems Biology- Based investigation of host-*Plasmodium* interactions. Trends Parasitol, v. 34(7), p. 617- 632, jul 2018. DOI: 10.1016/j.pt.2018.04.003.

SRIPRAWAT, K. et al. Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *Plasmodium vivax* infected blood. Malaria Journal, Jun, 2009. DOI: 10.1186/1475-2875-8-115.

THOMSON- LUQUE, R. Et al. A continuous, Long- Term *Plasmodium vivax in vitro* blood- Stage culture: What are we missing? Trends Parasitol, Aug 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2018.04.005.

TOTINO, R. P.; LOPES, C. S. Insights into the cytoadherence phenomom of *Plasmodium vivax*: The putative role of phosphatidylserine. Frontiers in Immunology, v. 8, Art. 1148, Sep 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01148.

TREUTIGER, C.J. et al. Rouleax-forming serum proteins are involved In the rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Experimental parasitology, v.93, p. 215-224, Dec 1999. DOI: 10.1006/expr.1999. 4454

UKEGBU, C. V. et al. PIMMS43 is required for malaria parasite immune evasion and sporogonic development in the mosquito vector. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Mar, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1919709117.

VALLEJO, A. F. et al. Optimization of a membrane feeding assay for *Plasmodium vivax* infection in *Anopheles albimans*. PLoS Negl Trop Dis, p. e 0004807, Jun 2016. 10(6): e0004807.

VELASQUEZ- RIOS, M. C. Et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. Malaria Journal, Dec 2013. DOI: 10.1186/1475- 2875-12-460.

VERA, O. et al. Purification methodology for viable and infective *Plasmodium vivax* gametocytes that is compatible with transmission- blocking assays. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 6638- 6641, Oct 2015. DOI: 10.1128/AAC.01136-15.

WHO, World malaria report, vol. 2016. Geneva: World Health Organization, 2016.

YOUNG, J. A. et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis Using ontology- based pattern identification. Molecular & Biochemical Parasitology. v. 143, p. 67-79, Apr 2005. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2005.05.007

YORDANOVA, A. I. et al. Micromanaging immunity in the murine host vs. The mosquito vector: Microbiota- dependent immune responses to intestinal parasites. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 8, Sep 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00308

ZIELER, H.; DVORAK, J. A. Invasion *in vitro* of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 97(21), p. 11516- 11521, Oct, 2000. DOI: 10.1073/pnas

9) ANEXOS

9.1) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Patogênese e Infectividade de *Plasmodium vivax*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

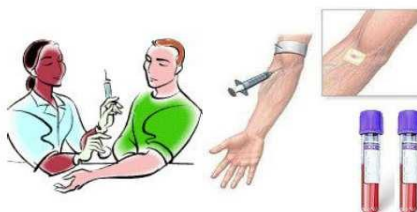
A **FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)** está fazendo um estudo com o objetivo de estudar a biologia do *Plasmodium vivax*, ou seja, o causador da doença que você tem no momento. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue do paciente para realizar alguns testes e ensaios funcionais com este sangue, a fim de se estudar a patogênese da doença.

Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes testes com sangue de pacientes com malária vivax (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 de 20 mL de sangue da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



Coleta de Sangue

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

Após a coleta de sangue, poderá ocorrer dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente poderá ocorrer desmaio ou infecções no local da punção. Todos os

9.2) Questionário



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.

Para evitar toda e qualquer situação de perda do sigilo e privacidade do sujeito da pesquisa, 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 não representa qualquer 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 sobre a biologia de *Plasmodium vivax* e sua patogenecidade. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente desenhar novas drogas e vacinas para o tratamento dos pacientes e prevenção de novos casos de malária vivax.

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

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

Eu,, entendi tudo sobre o estudo "**Patogênese e Infectividade de *Plasmodium vivax***"

Data: / /

Endereço:

.....

Telefone: (....)

Polegar direito:

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário:

..... Data: / /