

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM BIOLOGIA
DA INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBio – Interação)**

Mário Roberto Lopes de Araújo Ypiranga dos Guaranys

**Otimização da produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em
Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae), em condições laboratoriais**

Manaus - AM

2020

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM BIOLOGIA
DA INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBio – Interação)**

Mário Roberto Lopes de Araújo Ypiranga dos Guaranys

**Otimização da produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em
Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae), em condições laboratoriais**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Claudia María Ríos Velásquez

Manaus - AM

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

G914o

Guaranys, Mário Roberto Lopes de Araújo Ypiranga dos

Otimização da produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae), em condições laboratoriais. / Mário Roberto Lopes de Araújo Ypiranga dos Guaranys. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2020.

65 f.

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Maria Ríos Velásquez.

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

CDU 616.936 (043.3)

CDD 616.9362

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos - CRB-11/ 287

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, pelo curso oferecido e pela estrutura do PPG.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal – CAPES; Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio ao PPG e concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Bill e Melinda Gates pelo financiamento parcial do projeto.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e às equipes de diagnóstico e microscopia de malária pela colaboração na coleta de sangue e diagnóstico dos pacientes.

Ao Dr. Marcus Lacerda pela parceria na realização do projeto.

Às Dras. Rosa Santana e Stefanie Lopes pelo apoio e ensinamentos durante para realização das dissecções com maior êxito.

Ao Msc. Antônio Balieiro pela inestimável colaboração na análise dos dados.

À Dra. Claudia Ríos, pela sua orientação, no que consta a paciência e compreensão quanto às minhas deficiências no desenvolvimento do mestrado, acompanhando o possível na execução dos experimentos e o esforço contínuo na elaboração do projeto e dissertação. Assim como no apoio nas circunstâncias fora do mestrado em momentos de maior necessidade. Mas principalmente a amizade conquistada nesse pequeno período de início à conclusão do mestrado.

Ao Dr. Felipe Pessoa pelo apoio por meio de questionamentos relacionados a aspectos de alta relevância do projeto, que me proporcionou maior articulação na compreensão do conteúdo apresentado no projeto de mestrado.

À Dra. Monick Martins-Campos e ao Msc. Jordam Williams pelo constante apoio na realização dos experimentos, incentivando com frequência o necessário para futuras arguições relacionadas à metodologia do projeto, os exemplos de determinação e dedicação assim como pela amizade que me proporcionou muitos momentos de alegria e risadas no insetário do laboratório.

Ao Msc. Eric Fabrício Marialva, Heliana Belchior, Hermon Mendes, João Nobre e Anny Caroline pela extensa colaboração em etapas específicas dos experimentos proporcionando obtenção de dados que enriqueceram o projeto de modo a apresentar resultados mais robustos.

Às técnicas de laboratório Kelly Regina, Raissa Moura, Jhennifer Alcântara e Fabiana Siqueira pelo esplêndido esforço na criação dos mosquitos provendo o necessário para realização de quaisquer experimentos e articulação na resolução de quaisquer problemas relacionados a manutenção das colônias e laboratório do EDTA com auxílio de maior supervisão.

Ao Msc. Alexandre Menezes e Dr. Dilcindo Barros pela assistência frequente em momentos de maior necessidade que me permitiram continuar executando as atividades referentes ao mestrado com maior tranquilidade.

Aos amigos de laboratório, Msc. Rebeca Guimarães, Msc. Jessica Feijó, Msc. Amanda Picelli, Jokebede Melinda, Adria Telles, Msc. Emanuelle Farias, Msc. Antônio Leão, Sanmya Santos, Ellen Sabrina, Gabriella Caroline, Jhonata Santiago, não apenas pelas piadas, mas também pela amizade e companheirismo que tornaram a convivência no insetário e o instituto como um todo cheia de humor e compaixão.

À amiga Patrícia Mello por todo o seu carinho e atenção não só a mim como a todos que encontrou em seu caminho, se distinguindo por sua notável expressão de ânimo e euforia que contagiou a todos do laboratório, dos que ficaram e já passaram, permitindo que pudéssemos executar nossas atividades com mais confiança e determinação, características essas que a tornaram essencial no insetário. Sempre lembrada e amada.

Aos amigos Mayumi Murakami, Leonardo Fernandes, Eduardo Vital e Caio Sombra pela amizade duradoura que me acolheram sem qualquer pedido ou súplica, e se mantiveram presentes sempre que possível, oferecendo conselhos, risos e atenção nos momentos em que isso faltava.

Ao Banguela, Rebeca, Layla, Marvin, Shuri, Stite e Anita, meus animais de estimação, donos da casa, por todos os momentos de emoção e o consolo ainda que silencioso que me proporcionaram nesses dois anos.

A minha mãe e irmãos de coração, Luciana Quadros de Araújo, Poliana Quadros de Araújo e Nathan Satoru da Silva por todo o apoio e amor inquestionável e incondicional proporcionado que me permitiu seguir em frente e a constante luta para que não me faltasse na medida do possível.

E por último aos meus pais biológicos, Roberto Câmara Lima Ypiranga dos Guaranys e Diná Lopes de Araújo Ypiranga dos Guaranys pelo incansável esforço, enquanto vivos e posteriori, para me proporcionar todas as condições necessárias para estar aqui.

Muitíssimo obrigado!

RESUMO

Nos últimos anos, a busca por estratégias alternativas para o controle da malária tem sido estimulada, incluindo o bloqueio de transmissão, que visa a interrupção do desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito e / ou no ser humano. Os esporozoítos são a forma parasitária infecciosa para humanos e são alvos importantes para bloquear a transmissão. No entanto, estudos sobre a interação entre esporozoítos, mosquitos e hepatócitos requerem um grande número destes. *P. vivax* é a espécie do parasito mais prevalente no Brasil, sendo responsável por mais de 80% dos casos. *Anopheles aquasalis* é um dos principais vetores nas regiões costeiras, além de ser facilmente colonizado em condições laboratoriais, facilitando estudos sobre a interação patógeno-hospedeiro. Este trabalho tem como objetivo estudar fatores que influenciam a produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* na glândula salivar de *Anopheles aquasalis*. Para os experimentos, fêmeas de *An. aquasalis* foram infectadas por sistema de alimentação por membrana. Para avaliar o efeito da temperatura após a alimentação, as fêmeas foram transferidas para gaiolas e mantidas a 20°C, 24°C e 28°C. Para avaliar o efeito dos fatores do sistema complemento, um grupo de mosquitos foi alimentado com sangue contendo soro inativado e outro com sangue total. E para avaliar a influência da microbiota, um grupo de fêmeas foi alimentado com solução açucarada contendo antibiótico (PenStrep, por 3 dias antes da infecção experimental enquanto o grupo controle só foi alimentado com solução açucarada. No 6º dpi, para cada fator, o intestino médio de 10 fêmeas foi dissecado para contagem de oocistos. No 13º dpi, as glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítos contados. Fêmeas mantidas a 28°C apresentaram altas taxas de infecção (60-90%) assim como elevado número de oocistos (2-231 por mosquito) e esporozoítos (1-1142 por mosquito). O maior número de oocistos e esporozoítos foi de mosquitos alimentados com antibiótico (231; 962) e soro inativado (215; 1020), respectivamente, enquanto que aqueles mantidos a temperaturas mais baixas (24°C, 20°C) apresentaram as menores cargas do parasito. Não houve diferença significativa entre os grupos com maior número de parasitos, apenas quando comparados aos de menor carga ($p < 0,001$). A obtenção de maior número de esporozoítos auxiliará no conhecimento dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, assim como na busca por alternativas para eliminação da malária.

Palavras-Chave: produção de esporozoítos; *Anopheles aquasalis*; *Plasmodium vivax*; temperatura; microbiota; soro inativado.

ABSTRACT

In recent years, research into alternative strategies for controlling malaria has been encouraged, including blocking transmission, which aims to stop the development of *Plasmodium* in mosquitoes and / or humans. Sporozoites are a parasitic form of infection by humans and are also important in blocking transmission. However, studies on the interaction between sporozoites, mosquitoes and hepatocytes can be used in large numbers. *P. vivax* is a species of parasite most prevalent in Brazil, being responsible for more than 80% of cases. *Anopheles aquasalis* is one of the main vectors in coastal regions, in addition to being easily colonized under laboratory conditions, facilitating studies on a pathogen-host interaction. This work aims to study factors that influence the production of sporozoites from *Plasmodium vivax* in the salivary glands of *Anopheles aquasalis*. For the experiments, females of *An. aquasalis* were infected by the membrane feeding assay. To assess the effect of temperature after feeding, the females were transferred to cages and kept at 20°C, 24°C and 28°C. To assess the effect of the complement system factors, a group of mosquitoes was fed with inactivated blood serum and another with whole blood. And to assess the influence of the microbiota, a group of females was fed with a sugary solution including antibiotics (PenStrep) for 3 days before the experimental infection while another group fed only with sugary solution. At 6° dpi, for each factor, the midgut of 10 females was dissected for oocyst count. At 13° dpi, the salivary glands were dissected and the sporozoites were counted. Females maintained at 28°C presented high infection rates (60-90%) as well as high number of oocysts (2-231 per mosquito) and sporozoites (1-1142 per mosquito) in most replicates. The largest number of oocysts and sporozoites contained was in mosquitoes fed with antibiotics (231; 962) and inactivated serum (215; 1020), respectively, while the females kept in lower temperatures (24°C, 20°C) presented the lowest loads of the parasite. There was no significant difference between the groups with the highest number of parasites, only when compared to the lowest loads ($p < 0.001$). A greater number of sporozoites will assist in the knowledge of the mechanisms of pathogen-host interaction, as well as in the search for alternatives to alter malaria.

KeyWords: sporozoite production; *Plasmodium vivax*; *Anopheles aquasalis*; temperature; microbiota; inactive blood serum.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Países com casos autóctones de malária entre 2000 e 2018..... | 16 |
| Figura 2: Mapa das áreas de risco para malária no Brasil, 2018..... | 17 |
| Figura 3: Mapa da distribuição mundial das espécies de <i>Anopheles</i> vetoras dominantes de malária | 20 |
| Figura 4: Mapa com a distribuição das espécies vetoras de malária dominantes no continente americano..... | 21 |
| Figura 5: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado humano..... | 22 |
| Figura 6: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro invertebrado <i>Anopheles</i> spp..... | 23 |
| Figura 7: Diferentes formas de exposição de mosquitos <i>Anopheles</i> a microrganismos que podem impactar sua competência vetorial para <i>Plasmodium</i> | 26 |
| Figura 8: Insetário do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – EDTA..... | 33 |
| Figura 9: Sistema de alimentação por membrana artificial..... | 34 |
| Figura 10: Desenho experimental para avaliar o efeito da temperatura na produção de esporozoítos de <i>Plasmodium vivax</i> | 35 |
| Figura 11: Desenho experimental para avaliar o efeito de uso antibiótico na produção de esporozoítos de <i>Plasmodium vivax</i> | 37 |
| Figura 12: Desenho experimental para avaliar o efeito da inativação de soro humano na produção de esporozoítos de <i>Plasmodium vivax</i> | 38 |

Figura 13: Oocistos de *Plasmodium vivax* em intestino médio de *Anopheles aquasalis*.....41

Figura 14: Gráfico de análise de incidência de riscos para produção de oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos..... 43

Figura 15: Esporozoítos de *Plasmodium vivax* em glândulas salivares de *Anopheles aquasalis*.....45

Figura 16: Gráfico de análise de incidência de riscos para produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em glândulas salivares de *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos.....45

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Parasitemia e contagem de gametócitos das diferentes replicatas realizadas..... | 40 |
| Tabela 2: Taxas de infecção por oocistos de <i>Plasmodium vivax</i> em <i>Anopheles aquasalis</i> submetidos a diferentes tratamentos. | 42 |
| Tabela 3: Análise da razão de prevalência do número de oocistos em <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i> submetidos a diferentes tratamentos de temperatura | 42 |
| Tabela 4: Número de esporozoítos de <i>Plasmodium vivax</i> em glândulas salivares de <i>Anopheles aquasalis</i> submetidos a diferentes tratamentos de temperatura | 44 |
| Tabela 5: Análise da razão de prevalência do número de esporozoítos em <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i> e submetidos a diferentes tratamentos..... | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATC: Artemisina.

B.O.D.: Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio.

CAAE: Comitê de Ética em Pesquisa.

Dpi: Dia pós-infecção.

EDTA: Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis da Amazônia.

g: Grama.

G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase.

HR: Umidade relativa.

IImd: Instituto Leônidas e Maria Deane.

JAK/STAT: Janus Kinase/ transdutores de sinal e ativadores de transcrição.

Mic+: Microbiota positiva.

Mic-: Microbiota negativa.

mL: Milímetro.

MS: Ministério da Saúde.

Ooc: oocisto.

PBS: solução salina de fosfato.

PenStrep: Penicilina/ streptomina.

Rpm: rotação por minuto.

SIVEP: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica.

SIN: Sangue com Soro Inativado.

SMFA: Ensaio de sistema de alimentação por membrana.

Spz: esporozoíto.

ST: Sangue Total.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

µg: Micrograma.

WHO: World Health Organization.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 16 |
| 1.1 - Malária | 16 |
| 1.2 - Os parasitos | 17 |
| 1.3 - Os vetores | 19 |
| 1.4 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> | 21 |
| 1.5 – Glândulas salivares | 23 |
| 1.6 - Fatores que influenciam a infecção do mosquito pelo <i>Plasmodium</i> | 24 |
| 1.6.2.3- Sistema complemento | 24 |
| 1.6.2.4- Anticorpos | 25 |
| 1.6.2.5- Microbiota intestinal (flora bacteriana) | 25 |
| 1.6.3- A temperatura como fator de influência na infecção de <i>Anopheles</i> pelo <i>Plasmodium</i> | 28 |
| 1.7- Produção de esporozoítos | 29 |
| 2. Objetivos | 31 |
| 2.1 - Objetivo Geral | 31 |
| 2.2 - Objetivos Específicos | 32 |
| 3. Material e métodos | 32 |
| 3.1 - <i>Anopheles aquasalis</i> | 32 |
| 3.2 - Coleta de sangue | 33 |
| 3.3 - Infecção experimental | 33 |
| 3.4 - Avaliação do desenvolvimento de <i>P. vivax</i> em <i>An. aquasalis</i> | 34 |
| 3.4.1 - Avaliação do efeito da temperatura no desenvolvimento de <i>P. vivax</i> em <i>An. aquasalis</i> | 34 |
| 3.4.2 - Avaliação do efeito de antibiótico no desenvolvimento de <i>P. vivax</i> em <i>An. aquasalis</i> | 35 |
| 3.4.3 - Avaliação do efeito da inativação do soro no desenvolvimento de <i>P. vivax</i> em <i>An. aquasalis</i> | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.5 - Contagem de oocistos no intestino médio de <i>An. aquasalis</i> | 38 |
| 3.6 - Contagem de esporozoítos em glândula salivar de <i>Anopheles aquasalis</i> | 39 |
| 3.7 - Análises dos dados | 39 |
| 4. Resultados | 40 |
| 5. Discussão | 46 |
| 6. Conclusão | 50 |
| 7. Referências | 51 |
| 8. Anexo | 62 |
| 8.1 - Dados de mortalidade de <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i> submetidos aos diferentes tratamentos | 62 |
| 8.1.1 - 1ª Replicata (Infecção Experimental - 11/10/19) | 62 |
| 8.1.2 - 2ª Replicata (Infecção Experimental - 21/10/19) | 63 |
| 8.1.3 - 3ª Replicata (Infecção Experimental - 31/10/19) | 64 |
| 8.1.4 - 4ª Replicata (Infecção Experimental - 12/11/19) | 65 |
| 8.1.5 - Total (1ª, 2ª, 3ª e 4ª Replicata)..... | 66 |

1. Introdução

1.1 - Malária

A malária, também conhecida como “paludismo”, febre palustre, maleita ou sezão, é caracterizada como uma doença infecciosa febril aguda. Os sintomas, febre, dores de cabeça, calafrios, dores corporais, dentre outros, se manifestam entre 10 a 15 dias após a picada do mosquito infectado. Caso haja demora no tratamento, a doença pode evoluir para sintomas mais graves, como convulsões generalizadas, edema pulmonar, falha renal aguda, coma e morte do indivíduo (WHO 2020).

A malária está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde atualmente há 89 países endêmicos. Em 2018 foram registrados 228 milhões de casos clínicos e 405 mil mortes (Figura 1). A maioria dos casos ocorreu no continente Africano (93%), Sudeste asiático (3,4%) e oeste do Mediterrâneo (2,1%) (WHO 2019).

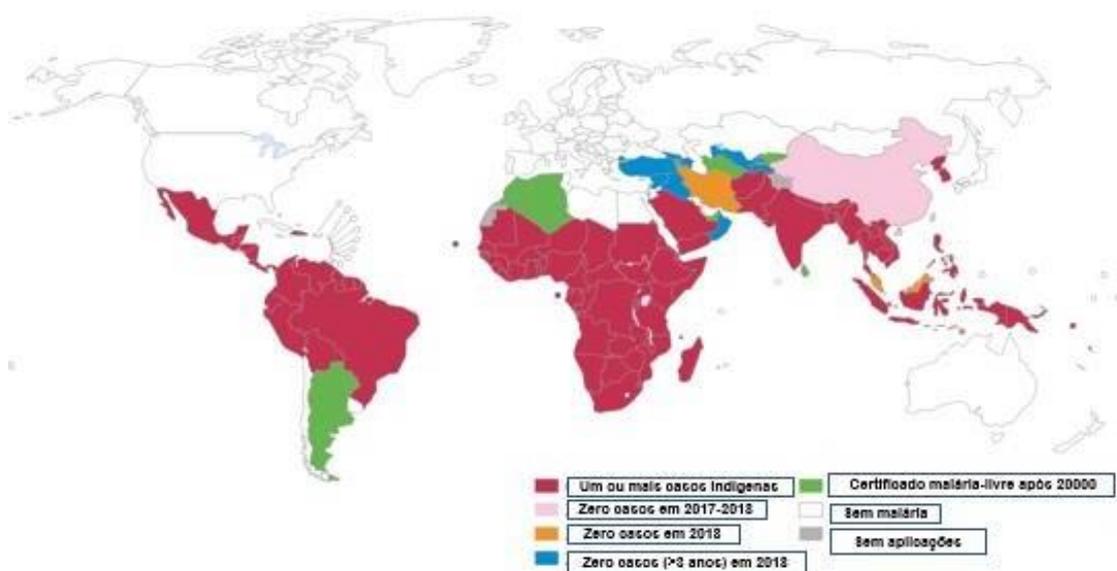


Figura1: Países com casos autóctones de malária entre 2000 e 2018 (WHO 2019).

Em 2018, cerca de 138 milhões de pessoas estavam em risco de contrair a doença nas Américas, com um estimado de 1 milhão de casos e 600 mortes. Brasil, Venezuela e Colômbia foram responsáveis por 80% dos casos registrados no continente (WHO 2019).

No Brasil, foram notificados 156.055 casos de malária em 2019, 19% a menos que o ano anterior, sendo a maioria deles (99,7%) registrados na região Amazônica (Figura 2). Os estados do Amazonas (40,9%), Pará (23,6%), Roraima (13,2%) e Acre (7,1%) contribuíram

com o maior número de casos na região (MS 2019). Até o momento, foram registrados 23.045 casos em 2020.

Na região extra-Amazônica brasileira houveram 734 casos confirmados em 2018, 537 em 2019 e 79 até março de 2020 (MS 2020). Os estados de São Paulo (24,7%), Goiás (10,1%), Rio de Janeiro (9%), Paraná (8,1%), Minas Gerais (7,6%) e Paraíba (7%) são os que aportam o maior número de casos (Sivep/MS 2019).

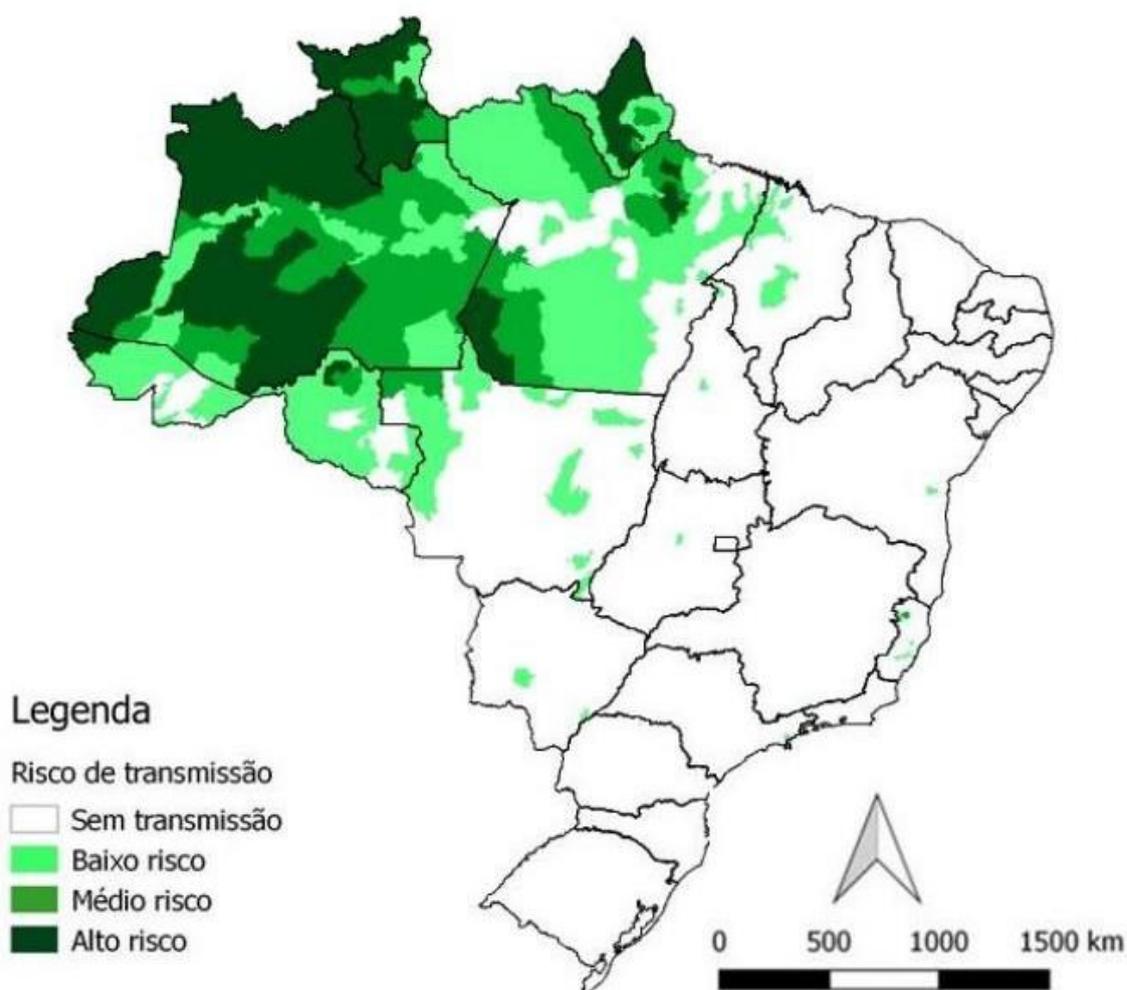


Figura 2: Mapa das áreas de risco para malária no Brasil, 2018 (MS 2020).

1.2- Os parasitos

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Até o momento foram registradas sete espécies de *Plasmodium* causando a doença em humanos: *Plasmodium*

falciparum, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium simium*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi* (Antinori et al. 2012, H ta et al. 2014, Brasil et al. 2017). Delas, as quatro primeiras circulam no Brasil.

O *Plasmodium falciparum* é a espécie predominante na África subsaariana e está associado a casos graves da doença (WHO 2019). Na década de 80, o *P. falciparum* era responsável por quase metade dos casos de malária diagnosticados no Brasil, entretanto, a implementação de novas estratégias de vigilância, diagnóstico e controle contribuíram de forma decisiva para diminuir a incidência para aproximadamente 11% (Ferreira e Castro 2013, MS 2020).

A infecção por *Plasmodium malariae* é considerada benigna. No Brasil, essa espécie de *Plasmodium* é responsável por menos de 0,1% dos casos de malária, ainda que diagnósticos moleculares indiquem sua presença em 9-12% dos pacientes com malária (Cavasini et al. 2000, Ferreira e Castro 2013). Acredita-se que as notificações de casos de malária por *P. malariae* são subnotificadas, devido à hemólise durante o processo de coloração com Giemsa, que deforma o parasito e impede a sua identificação (Oliveira-Ferreira et al 2010).

Plasmodium ovale está restrito a algumas regiões do continente africano, tendo poucos casos importados no Brasil (Sutherland et al. 2010; MS 2019).

Plasmodium knowlesi e *Plasmodium simium* são espécies zoonóticas que causam malária em símios, mas nos últimos anos tem sido constatado que estes parasitos também são capazes de infectar humanos.

O *Plasmodium knowlesi* é prevalente no Sudeste Asiático e foi subnotificado na Índia como *P. malariae* através de diagnóstico por gota espessa, em razão de semelhanças morfológicas (Singh & Danehsvar 2013). Ensaios *in vitro* revelaram a preferência dessa espécie por eritrócitos jovens, embora possa se adaptar a eritrócitos de maior idade. A doença causada por esse parasito apresenta complicações, ainda que raras, mas com maior frequência que *P. falciparum* e *P. vivax*, por exemplo (Milner 2017).

Plasmodium simium é uma espécie zoonótica que infecta primatas não humanos, mas recentemente foi comprovado como responsável pelos casos de malária nos surtos ocorridos nas regiões de mata Atlântica, corroborando a hipótese proposta por Leônidas Deane de que *Plasmodium* spp. que infectam macacos também estariam infectando humanos nessa região (Brasil et al. 2017).

Plasmodium vivax é amplamente distribuído no globo (WHO 2019). É a espécie predominante no continente americano e no Brasil foi responsável por 89% dos casos registrados em 2019 (Sivep/MS 2019).

Certas características dessa espécie a tornam um dos maiores desafios para o controle e eliminação da malária: a) inicialmente considerada causadora de uma infecção benigna, com sintomas brandos, nos últimos anos tem recebido atenção especial pelo aumento do número de casos envolvendo anemia e trombocitopenia grave, falhas respiratórias e renais e malária cerebral (Alexandre et al. 2010, Alencar Filho et al. 2018); b) desenvolvimento de formas hipnozoíticas, que podem permanecer no fígado por semanas, meses ou anos, causando posteriores recaídas da doença; c) a resistência à cloroquina; d) o desenvolvimento precoce de formas infectivas para o mosquito; e) carência de um sistema de cultura contínua *in vitro* do parasito (Ferreira e Castro 2013).

1.3 - Os vetores

O *Plasmodium* é transmitido ao homem através da picada de mosquitos conhecidos vulgarmente como carapanãs, pernilongos ou muriçocas. Estão classificados taxonomicamente dentro da Ordem Diptera, Família Culicidae, Gênero *Anopheles*. Os culicídeos são insetos holometábolos, ou seja, passam pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto durante seu desenvolvimento. As formas imaturas são aquáticas e as adultas, terrestres. As fêmeas são hematófagas e necessitam dos nutrientes presentes no sangue de hospedeiros vertebrados para a maturação dos ovos (Consoli e Oliveira 1994). Durante o repasto sanguíneo conseguem se infectar com diferentes organismos patógenos para o homem, tais como filárias, arbovírus e protozoários.

O gênero *Anopheles* é composto por um total de 475 espécies, das quais 70 são vetoras de malária (Figura 3) (Harbach 2019). Na região Amazônica as espécies incriminadas como vetoras são: *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* (Sinka et al. 2012).

Essa espécie é estenogâmica, não precisando de grandes espaços para copular. Dessa forma, o estabelecimento de colônias estáveis é mais fácil, assim como o desenvolvimento de pesquisas sobre as interações com os parasitos que é capaz de transmitir. No Brasil existem colônias estáveis de *An. aquasalis* em várias instituições de pesquisa no Rio de Janeiro, São Paulo, Rondônia, Minas Gerais e Amazonas. Trabalhos realizados pelo nosso grupo tem mostrado que *An. aquasalis* é tão suscetível ao *P. vivax* quanto o *An. darlingi* (Ríos-Velásquez et al. 2013); tem um repertório menor de genes de imunidade que o *Anopheles gambiae* (Bahia et al. 2010); ativa genes da via JAK-STAT (Bahia et al. 2011), espécies reativas de oxigênio (Bahia et al. 2013), e fatores GATA (Bahia et al. 2018) no controle da infecção por *P. vivax*.

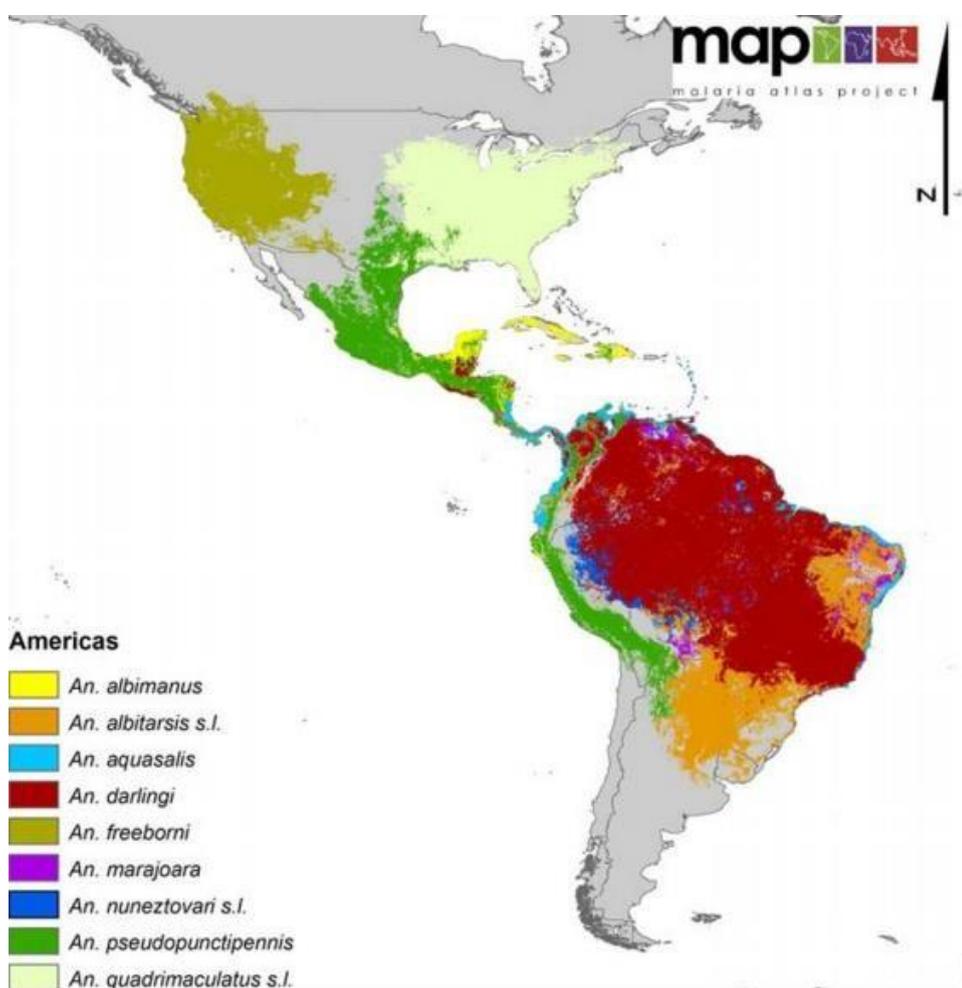


Figura 4: Mapa com a distribuição das espécies vetoras de malária dominantes no continente americano (Sinka et al. 2012).

1.4 - Ciclo de vida do *Plasmodium*

O *Plasmodium* é um parasito heteroxênico, precisando de dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, para completar seu desenvolvimento. No hospedeiro vertebrado ocorre o ciclo esquizogônico (Figura 5), iniciado com a inoculação de esporozoítos na derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do vetor. Esses esporozoítos migram pelos vasos sanguíneos até os hepatócitos, nos quais se diferenciam em trofozoítos, esquizontes e merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, onde invadem as hemácias e se transformam em trofozoítos em um contínuo ciclo de infecção das células vermelhas. Uma parcela desses merozoítos se diferencia em gametócitos masculinos e femininos, que são as formas infectivas para o mosquito (Soulard et al. 2015).

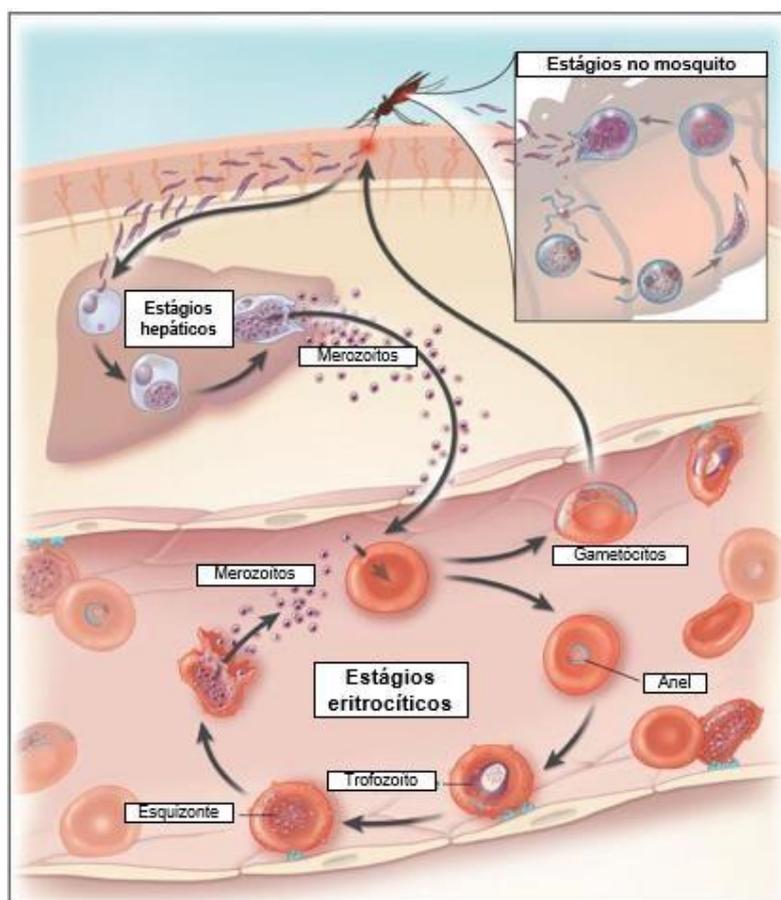


Figura 5: Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado humano (Rosenthal et al. 2008).

O ciclo esporogônico ou sexual ocorre no mosquito (Figura 6). Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, no intestino médio do mosquito ocorre a diferenciação em microgametas (masculinas) e macrogametas (femininas); as microgametas fecundam as macrogametas formando um zigoto; esse se transforma em oocineto, forma móvel do parasito que atravessa as células do epitélio intestinal, entra em contato com a lâmina basal e forma o oocisto. Dentro do oocisto, são formados os esporozoítos que, após uma ou duas

semanas, são liberados na hemocele, e de lá migram em direção às glândulas salivares, onde permanecem até o próximo repasto ou até o fim da vida do hospedeiro invertebrado (Baton & Ranford-Cartwright 2005; Vlachou et al. 2006; Mueller et al. 2010).

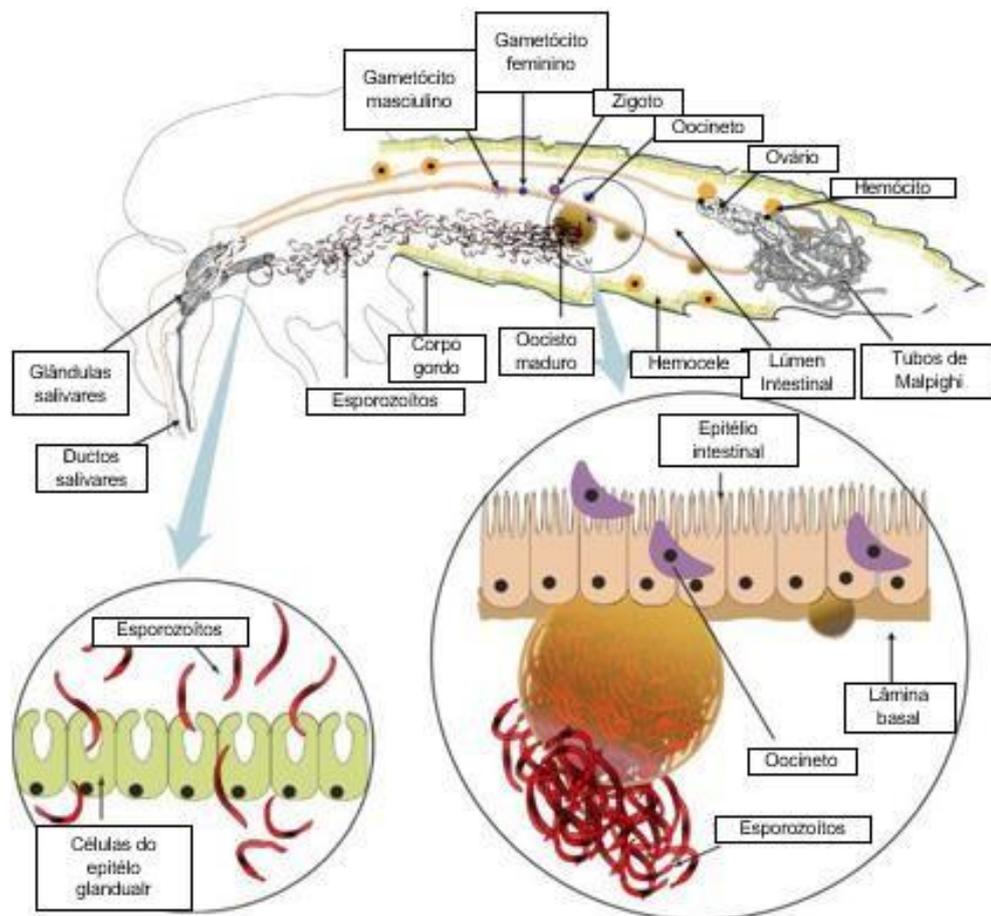


Figura 6: Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado *Anopheles* spp. (Sreenivasamurthy wet al. 2013).

Durante o desenvolvimento no vetor, o parasito passa por gargalos traduzidos em perda e ganhos no número de parasitos. Em geral, menos de 5% dos gametócitos ingeridos no sangue chegam à forma de oocistos, por multiplicação esporogônica dentro de cada oocisto são formação 1×10^3 - 1×10^4 esporozoítos, e aproximadamente 1×10^2 - 1×10^5 esporozoírtos conseguem invadir as glândulas salivares (Baton e Ranford-Cartwright 2005, Smith et al. 2014).

1.5 – Glândulas salivares

A invasão das glândulas salivares do mosquito pelos esporozoítos é fundamental para que ocorra a transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado. Os mecanismos utilizados

pelos esporozoítos para invadir as glândulas salivares permanecem pouco conhecidos. Após a liberação na hemocele, os esporozoítos se deslocam pela hemolinfa até as glândulas salivares. Durante a invasão do tecido glandular é formado um vacúolo parasitóforo que envolve o *Plasmodium*, e que é desintegrado ao passar pela cavidade secretora, onde os esporozoítos permanecem por dias até um próximo repasto (Vlachou et al. 2006; Roth et al. 2018).

Trabalhos tem demonstrado que os esporozoítos tem uma resposta quimiotática a proteínas das glândulas salivares (Akaki e Dvorak 2005) e a invasão da glândula requer interações espécie-específicas e reconhecimento das proteínas da superfície glandular (Gosh e Jacobs-Lorena 2009). Quantos esporozoítos conseguem invadir as cavidades da glândula salivar e quais são os fatores que modulam essa invasão continuam sendo incógnitas.

1.6 - Fatores que influenciam a infecção do mosquito pelo *Plasmodium*

Uma espécie de *Anopheles* é considerada vetora competente de *Plasmodium* quando o parasito consegue completar seu ciclo de desenvolvimento, desde a fase de gametócito, no sangue ingerido, até o esporozoíto, na glândula salivar. Essa capacidade vetorial é influenciada por fatores intrínsecos, tais como a genética do parasito, do vetor e do humano, as interações entre eles, e a microbiota intestinal; e extrínsecas, tais como a temperatura, pluviosidade, densidade populacional do vetor, comportamento de alimentação e longevidade (Kramer e Ciota 2015, Sinden et al. 2004, Gouagna et al. 1998, Hurd et al. 2005).

Neste trabalho analisamos a influência de fatores como o sistema de complemento, a supressão da microbiota pelo uso de antibióticos de amplo espectro e a temperatura, no desenvolvimento de *P. vivax* em *An. Aquasalis*.

1.6.1- Sistema complemento

Para escapar do sistema complemento, patógenos desenvolveram diferentes mecanismos como a inativação do sistema por proteases, proteínas que se ligam ao sistema e por proteínas reguladoras do complemento. Por meio do tratamento com tripsina, Grotendorst et al. (1986) demonstraram que gametas de *P. gallinaceum* tornam-se mais suscetíveis à ação do sistema complemento. Em um estudo recente foi demonstrado que gametas e zigotos do parasito se ligam a fatores H do soro do hospedeiro e a partir da alimentação com gametócitos

de *P. falciparum* em soro humano nativo com adição de anticorpos anti-FH, fêmeas de *Anopheles* tornaram-se resistentes à infecção (Simon et al. 2013).

Bousema et al. (2012), quando avaliaram diferentes formas de alimentação artificial, obtiveram um maior número de mosquitos infectados quando alimentados com soro inativado, (metodologia usada para desnaturação das proteínas constituintes do sistema complemento) comparado aqueles alimentados com plasma. Ríos-Velásquez et al. (2013), avaliando uma série de vetores de *Plasmodium*, observaram maior número de oocistos no intestinos de fêmeas alimentadas com *An. aquasalis* comparado a fêmeas de *An. darlingi*, quando alimentadas com soro inativado. Moreno et al. (2018) também obtiveram maior número de oocistos em fêmeas de *An. darlingi* após reposição do plasma. Diferentemente, ao comparar a suscetibilidade de *An. Aquasalis* a *P. vivax* de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, Martins-Campos et al. (2018) verificaram maior carga de oocistos em fêmeas alimentadas com sangue total, comparadas aquelas alimentadas com soro inativado.

1.6.2- Anticorpos

Quando não ingeridos pelo mosquito, gametócitos podem ser eliminados do organismo pelo sistema imune, o que pode desencadear a produção de anticorpos (Saeed et al. 2008), e esses anticorpos podem estar presentes no bolo sanguíneo ingerido durante o repasto. Anticorpos contra proteínas Pfs48/45 e Pfs230, atuantes na fertilização de gametas, possuem uma correlação negativa entre anticorpos e o ciclo do *Plasmodium* no vetor (van der Kolk et al. 2006, Bousema et al. 2007, 2010). Alterações gênicas nessas proteínas podem diminuir consideravelmente a infecção, como demonstrado para *P. falciparum* e *P. berghei* (van Dijk et al. 2001, 2010, Eksi et al. 2006). Anticorpos anti-Pfs230 na presença de soro com sistema complemento podem interromper o desenvolvimento de *P. falciparum*, por meio da ativação da via clássica desse sistema, causando a lise do parasito (Healer et al. 1997). Mendis et al. (1987) observaram uma correlação entre anticorpos produzidos em infecções agudas por *P. vivax* e a redução da transmissão mediada por soro em sistema de alimentação artificial por membrana (SMFA). Graves et al. (1988) verificaram que o soro de indivíduos com a doença reconhece estágios sexuais do parasito, ao avaliar a diminuição da transmissão por *P. falciparum*.

1.6.3- Microbiota intestinal (flora bacteriana)

Os mosquitos são expostos a uma grande diversidade de microrganismos. As formas imaturas adquirem microrganismos presentes nos criadouros e as formas adultas os adquirem das fontes alimentares, sangue e néctar (Figura 7) (Dieme et al. 2017).

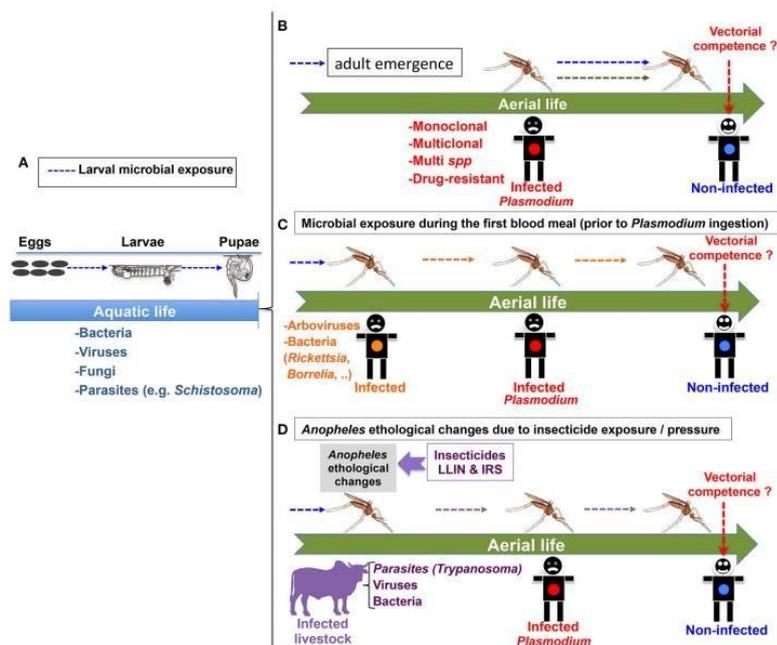


Figura 7: Diferentes formas de exposição de mosquitos *Anopheles* a microrganismos que podem impactar sua competência vetorial para *Plasmodium* (Modificado de Dieme et al 2017).

Muitos desses microrganismos fazem parte da flora intestinal (microbiota) dos mosquitos, e tem um papel importante nas interações destes com o *Plasmodium*. A flora bacteriana em ambiente natural é variável, muitas vezes espécie-específica, incluindo o nicho ecológico, hábitat, dentre outros fatores. Cianobactérias são as mais presentes nos estágios imaturos, sendo bactérias do gênero *Proteobacteria* mais frequentes em *An. Gambiae* adultos. *Eneterobacter*, *Serratia* e *Asaia* também são comuns (Dennisson et al. 2014). Algumas espécies de bactérias influenciam a competência vetorial por inibir total ou parcialmente o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito vetor (Dong et al. 2009, Cirimotich et al. 2011, Romoli e Gendrin 2018).

Alguns isolados de *Escherichia coli*, *Pantoea* sp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas putida* causaram diminuição na taxa de oocistos e na taxa de infecção por *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* (Tchioffo et al. 2013, Bahia et al. 2014,

Romoli e Gendrin 2018), e *Asaia* causou uma diminuição significativa na carga parasitária de *Plasmodium berghei* em *Anopheles stephensi* (Capelli et al. 2019).

Por meio da alimentação com isolados de *Enterobacter* (Esp_Z) e sangue de indivíduos infectados por *P. falciparum*, foi possível reduzir a carga parasitária dessa espécie em *Anopheles arabiensis*, possivelmente pela ROS secretada por Esp_Z (Cirimotich et al. 2011). Dong et al. (2009) verificaram aumento na expressão de genes imunes antimicrobianos pela população bacteriana residente no lúmen intestinal que pode agir contra o patógeno.

Esses microrganismos podem ser potencialmente utilizados como estratégia para bloquear o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito. Estratégias de bloqueio por competição natural e por paratransgênese tem sido estudadas (Tchioffo et al. 2013, Bahia et al. 2014, Wilke e Marrelli 2015). Na tentativa de impedir um número excessivo de bactérias na microbiota intestinal ocorre a formação de uma rede de ditirosina, a qual limita a interação bacteriana com o epitélio intestinal, que ao regular essa proliferação também prejudica o desenvolvimento do *Plasmodium* (Kumar et al. 2010). Também já foi sugerida uma resposta imune antibacteriana que afeta oocinetos por meio de bactérias liberadas durante a invasão da matriz peritrófica pelo *Plasmodium* (Kumar et al. 2010, Rodrigues et al. 2010).

Antibióticos também podem agir inibindo ou reduzindo certos processos do ciclo de vida do parasito. Como exemplo, o uso de azitromicina provocou a diferenciação de gametócitos de *P. falciparum* em gametas masculinos e a administração de doxiciclina reduziu a formação de oocinetos de *P. berghei* (Gendrin et al. 2016).

O uso de antibióticos durante a alimentação do mosquito tem se mostrado eficiente para reduzir a microbiota, aumentar a longevidade, fecundidade e suscetibilidade do vetor ao mosquito. Papel esse que tornou a combinação de streptomomicina com penicilina de grande importância em estudos envolvendo a infecção de vetores pelo *Plasmodium* (Gendrin et al. 2015).

No mesmo estudo, também foi observada a competição inter-específica da microbiota do vetor em que ocorria aumento da população de uma espécie dessas bactérias em razão da diminuição de outra pelo uso de um antibiótico específico, algo já visto com a diminuição de *Enterobacteriaceae* coincidindo com o aumento de *Acetobacteriaceae* ou a redução de *Serratia* com o aumento de *Asaia* (Gendrin et al. 2015).

Não existe até o presente nenhum trabalho descrevendo a composição da microbiota de *An. aquasalis* em condições de laboratório, nem os efeitos da microbiota sobre a infecção por *Plasmodium* nessa espécie vetora. Esse trabalho não tem como foco o estudo da microbiota, mas sim estudar o efeito da presença/ausência da microbiota de *An. aquasalis* provenientes de colônia na invasão da glândula salivar por *P. vivax*.

1.6.4- Temperatura ambiente

O clima, além de outros fatores como a densidade e o hábitat, é de grande importância para a ecologia de populações de vetores e, por conseguinte, afeta a transmissão de patógenos. A relação da temperatura com a dinâmica de transmissão de patógenos já era observada desde a descoberta da malária e febre amarela e com isso, entomologistas aceitavam sua influência na capacidade e competência vetorial, de modo que a transmissão só ocorre em intervalos de temperatura considerados ideais para o vetor e o parasito, do ponto de vista do seu desenvolvimento, reprodução, e sobrevivência (Mordecai et al. 2019).

Variações na temperatura corporal de vetores em decorrência de variações na temperatura ambiente influenciam no desenvolvimento do vetor e do patógeno. Larvas de *Anopheles* em regiões de altas temperaturas passam para outros estágios mais rapidamente, os adultos realizam repasto com maior frequência, favorecendo a fecundidade, assim como pode reduzir o tempo de desenvolvimento do *Plasmodium* no vetor (Cella et al. 2019).

Estima-se que com o aumento da temperatura global nos próximos anos populações de insetos de regiões tropicais sofram maior impacto que aquelas de regiões temperadas. Essas mudanças podem provocar alterações graves na biologia desses artrópodes, seja o tamanho do indivíduo ou ainda o *fitness*, ambos relacionados a capacidade de transmissão de doenças (Chu et al. 2020).

Em geral, o intervalo de temperatura adequada para que haja transmissão de patógenos por mosquitos oscila entre 20°C e 30°C. Para *P. falciparum*, não ocorre transmissão abaixo de 20°C e para *P. vivax*, abaixo de 16°C (Petersen et al. 2013).

Grande porção dos estudos que associam a transmissão desse patógeno a fatores climáticos tem sido realizada na África. Mudanças climáticas influenciam consideravelmente a

incidência de malária no território (Egbendewe-Mondzozo et al. 2011) e alterações a curto prazo na temperatura e precipitação afetam fortemente a transmissão, embora fatores socioeconômicos também tenham importante papel (Jaenisch e Patz 2002, Halimi et al. 2013 e SalahiMoghaddam et al. 2017). Essas observações também foram demonstradas a partir de modelos matemáticos, considerando abundância do vetor, taxa de picada, mudanças ambientais, ciclo do vetor, dentre outros (Alonso et al. 2011, Omumbo et al. 2011, Beck-Johnson et al. 2013).

Em condições experimentais, usando alimentação por membrana artificial, *Anopheles stephensi* infectados com *Plasmodium yoelii* desenvolveram maior número de oocistos por intestino e maior taxa de infecção por esporozoítos na glândula salivar quando a infecção ocorria entre 22°C e 24°C (Murdock et al. 2014, Ohm et al. 2018). Suwanchaichinda & Paskewitz (1998) observaram que a melanização diminui gradativamente em fêmeas de *An. gambiae* conforme aumento da temperatura (24°C a 30°C).

Sob temperaturas elevadas (30°C e 32°C), em experimentos com *An. stephensi* infectados por *Plasmodium falciparum*, houve redução na invasão do epitélio intestinal dos anofelinos por oocinetos, embora o número de oocistos tenha aumentado. É sugerido que o impacto do aumento da temperatura seja maior nas fases iniciais do ciclo no vetor (do gametócito ao oocineto), se comparado às fases posteriores, de oocistos a esporozoíto (Noden et al. 1995, Oketch et al. 2004).

Determinar a temperatura ideal para o desenvolvimento do parasito e do vetor equivale a identificar as temperaturas ótimas para que ocorra transmissão do patógeno. Os efeitos das variações de temperatura na infecção do mosquito ajudam a compreender o efeito das mudanças climáticas na transmissão desses patógenos.

1.7- Produção de esporozoítos

A eliminação da malária é dificultada por fatores como a resistência do parasito aos antimaláricos, resistência dos insetos vetores a inseticidas, migrações humanas e ocupação desordenada, principalmente.

Atualmente o foco do controle da malária está em tratamentos do estágio sanguíneo da malária com presença de sintomas e medicamentos baseados em terapia de combinação de artemisinina (ATCs) contra *P. falciparum* e cloroquina contra *P. vivax*. O emprego de 8-

aminoquinolinas tem sido a única intervenção quimioterapêutica contra hipnozoítos, tais como a primaquina e a tafenoquina. Todavia, a toxicidade hemolítica que esses medicamentos podem causar em indivíduos com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) tem impedido seu uso em países endêmicos da doença, ainda que a tafenoquina tenha sido recentemente aprovada (Roth et al. 2018; Pewkliang et al. 2018).

Há apenas uma vacina contra *P. falciparum*, a RTS,S / AS01 até os últimos registros, que possui resposta temporária, com proteção parcial. Vacinas contra *P. vivax* permanecem em desenvolvimento pré-clínico (Roth et al. 2018). Dentre abordagens adotadas para o desenvolvimento de vacinas contra malária, vacinas com esporozoítos irradiados são as mais utilizadas, nas quais a irradiação impossibilita a replicação do DNA parasitário, impedindo o ciclo do patógeno (Goh et al. 2019). Em estudos com humanos, a infecção foi inibida em 92% dos voluntários (Clyde et al. 1973, Rieckmann et al. 1974, Hoffman et al. 2002). Porém, um dos requisitos para obtenção desse resultado é um número elevado de repastos sanguíneos, para que haja inoculação suficiente de esporozoítos no hospedeiros, razão essa que impediu a aplicação em massa dessa estratégia. A criopreservação de esporozoítos é uma das alternativas usadas, a qual já foi demonstrada com eficácia em humanos (Goh et al. 2019).

Frente a essa problemática, há um interesse em encontrar estratégias alternativas que permitam controlar o parasito, dentre elas mecanismos de bloqueio da transmissão, baseados em impedir a invasão dos epitélios intestinal e glandular do mosquito, por parte do oocineto e esporozoíto, respectivamente, assim como a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos (James et al. 2003).

Estima-se que menos de 20% dos esporozoítos liberados na hemocele conseguem chegar até as glândulas salivares (Hillyer et al. 2007), portanto, é necessário contar com milhares de esporozoítos para poder realizar ensaios direcionados para a obtenção de estratégias de bloqueio da transmissão do parasito. Para isso é importante contar com uma espécie de mosquito permissiva à invasão da glândula salivar e métodos de dissecação eficientes para extrair os esporozoítos.

A suscetibilidade de várias espécies de mosquitos amazônicos ao *P. vivax* tem sido estudada (Ríos-Velásquez et al. 2013), porém em nenhuma dessas espécies, exceto *Anopheles darlingi*, tem sido realizada a avaliação de esporozoítos na glândula salivar. Moreno et al. (2018) obtiveram uma quantidade de até 7300 esporozoítos por mosquito.

Para obter milhares de esporozoítos é necessário obter milhares de glândula salivares infectadas, sendo ponto crítico a dissecação das mesmas. Esforços para automatizar a dissecação das glândulas salivares dos mosquitos foram realizados através da utilização do Sporobot, um robô que corta a cabeça do anofelino e retira as glândulas salivares, e do sistema semi-automático de microdissecação de mosquitos (SAMMS), que funciona como uma “guilhotina” decapitando as fêmeas e utilizando o triturador ou amassador para retirar as glândulas (Schrum et al. 2019).

No entanto, embora a dissecação manual seja mais trabalhosa e demorada, processos voltados a sua substituição ainda estão em fase de desenvolvimento, que mantém o método manual como a metodologia mais indicada para extração de glândula salivar.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

- Avaliar os fatores que influenciam o desenvolvimento de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis*.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da temperatura no desenvolvimento de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis*;
- Avaliar o efeito da inativação de soro humano no desenvolvimento de esporozoítos de *P. vivax* em *An. aquasalis*.
- Avaliar o efeito do uso de antibiótico no desenvolvimento de esporozoítos de *P. vivax* em *An. aquasalis*.

3. Material e métodos

3.1 - *Anopheles aquasalis*

Para esse trabalho foram utilizados mosquitos da espécie *Anopheles aquasalis* colonizados no insetário do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, seguindo metodologia modificada de Silva et al. (2006). No laboratório, os mosquitos foram mantidos a 27°C, 70-80% HR e alimentados com solução açucarada 10% *ad libitum* (Figura 8).



Figura 8: Insetário do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – EDTA do Instituto Leônidas e Maria Deane – Ilmd, mostrando as bandejas e gaiolas utilizadas para a manutenção das larvas, pupas e adultos (L, P e A, respectivamente) e adultos infectados (AI).

3.2 - Coleta de sangue

Para os experimentos foi utilizado sangue de pacientes infectados por *P. vivax*, diagnosticados pelo método de gota espessa na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Os critérios de inclusão para participar no projeto foram: pacientes maiores de 18 anos, que aceitassem participar de forma voluntária na pesquisa, que apresentassem parasitemia igual ou maior a duas cruzes e gametócitos. O projeto foi devidamente explicado aos pacientes e aqueles que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados 3mL de sangue de cada paciente em tubo vacutainer heparinizado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE

39706514.2.0000.0005).

3.3- Infecção experimental

A infecção experimental foi realizada através de um sistema de alimentação por membrana artificial, usando membrana de Parafilm para revestir os alimentadores de vidro. Esses alimentadores eram conectados por mangueiras a uma bomba de água em um banho maria a 37°C, de modo que a água mantivesse o sangue nos alimentadores aquecido. Para os experimentos foram utilizadas fêmeas de 3 a 5 dias de idade, privadas de açúcar 24 horas antes da infecção experimental. As fêmeas foram alimentadas com sangue infectado por *P. vivax* e aquelas que estivessem completamente ingurgitadas foram transferidas para gaiolas limpas e mantidas nas condições de temperatura específicas de cada experimento (Figura 9).

A verificação da parasitemia do paciente era realizada pelo método da gota espessa utilizando a coloração de Giensa. A contagem dos parasitos era realizada em 300 campos, em microscópio de luz com aumento de 100x.

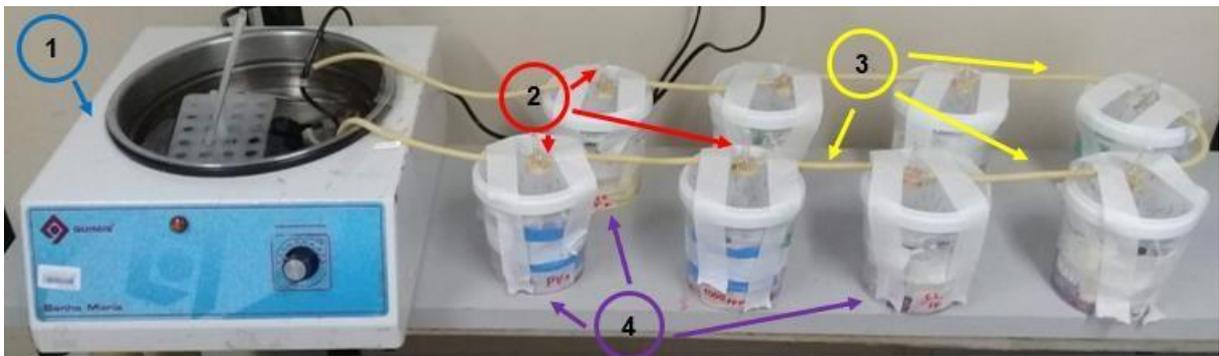


Figura 9: Sistema de alimentação por membrana artificial, composto por mangueiras (3) conectadas a alimentadores de vidro (2), cobertos com membrana de Parafilm, através da qual os mosquitos se alimentam (4).

O sangue é aquecido pela circulação de água a 37°C, desde o banho maria (1) até os alimentadores de vidro.

3.4 - Avaliação do desenvolvimento de *P. vivax* em *An. aquasalis*

Para obter um alto número de esporozoítos de *P. vivax* em glândulas dissecadas de *An. aquasalis*, foram selecionados fatores relacionados ao ciclo gonotrófico do mosquito que possibilitem condições para melhor andamento do ciclo do *Plasmodium* no anofelino. São eles: as variações de temperatura no ambiente de criação de mosquitos, que podem ou não acelerar o desenvolvimento do *Anopheles* no que diz respeito às formas aquáticas (ovo, larva, pupa) e

terrestre (adulto); a presença ou ausência da microbiota, já que as bactérias presentes no lúmen intestinal podem competir com o parasito inibindo ou facilitando o processo de infecção no hospedeiro invertebrado; e a ação do sistema complemento, por meio da inativação de soro humano presente no sangue de paciente infectado usado durante infecção experimental, que pode agir contra ou pró-infecção.

3.4.1- Avaliação do efeito da temperatura no desenvolvimento de *P. vivax* em *An. aquasalis*

Para avaliar o efeito da temperatura na produção de esporozoítos, mosquitos alimentados com sangue infectado com *P. vivax* foram separados em 3 grupos de 140 indivíduos cada. Cada grupo foi submetido a uma temperatura diferente, sendo as temperaturas de 20°C e 24°C mantidas sob controle em incubadoras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D). Os mosquitos submetidos a 28°C foram mantidos a temperatura ambiente do insetário. No sexto dia pós-infecção, foi realizada a dissecção de intestino médio para contagem de oocistos e no décimo terceiro, a dissecção de glândula salivar para contagem de esporozoítos (Figura 10).

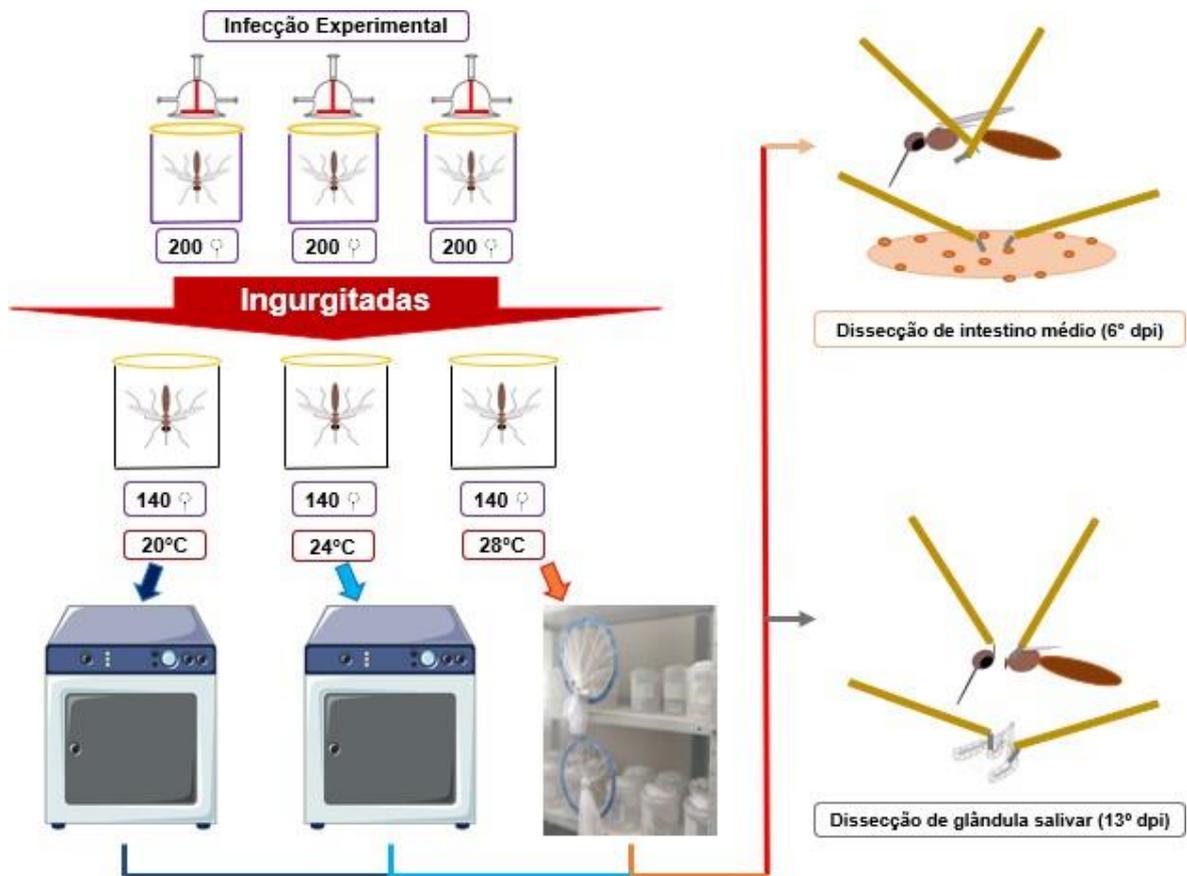


Figura 10: Desenho experimental para avaliar o efeito da temperatura na produção de esporozoítos de

Plasmodium vivax. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas são armazenadas em estufas B.O.D a 20°C e 24°C, e a temperatura ambiente, 28°C.

3.4.2 - Avaliação do efeito de antibiótico no desenvolvimento de *P. vivax* em *An. aquasalis*

Para esse experimento, foram utilizados dois grupos de 100 fêmeas de *An. aquasalis* de 3 dias de idade alimentadas desde a emergência do adulto com solução açucarada a 10%, um grupo controle, Mic+, com a microbiota normal ou com solução açucarada a 10% contendo 4 µg/mL do antibiótico PenStrep (penicilina/streptomicina), que era o grupo com a microbiota alterada, Mic-. Essa mistura de antibióticos foi selecionada pois a combinação é de amplo espectro, ou seja, age tanto contra bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, garantindo dessa forma a eliminação da microbiota intestinal dos mosquitos.

Para preparar a solução açucarada com PenStrep, para cada algodão utilizado, o mesmo era embebido em solução açucarada (constituída de 30 mL de água destilada autoclavada e 8,75g de açúcar) e em seguida era acrescentado 120 µL de PenStrep.

Após 3 dias da emergência os mosquitos foram alimentados com sangue de paciente malárico usando o procedimento para infecção experimental com membrana artificial anteriormente descrito. As fêmeas completamente ingurgitadas foram transferidas para gaiolas e mantidas a 70-80% de umidade relativa e 27-28°C. O grupo Mic- foi alimentado por mais um dia com solução açucarada contendo antibiótico para garantir a ação do PenStrep e nos dias seguintes as fêmeas foram alimentadas apenas com solução açucarada *ad libitum*, como o grupo Mic+ desde o primeiro dia pós-infecção (Figura 11).

No 6° dpi, foi realizada a dissecação do intestino médio para contagem de oocistos e no 13° dpi, a dissecação de glândulas salivares para contagem de esporozoítos.

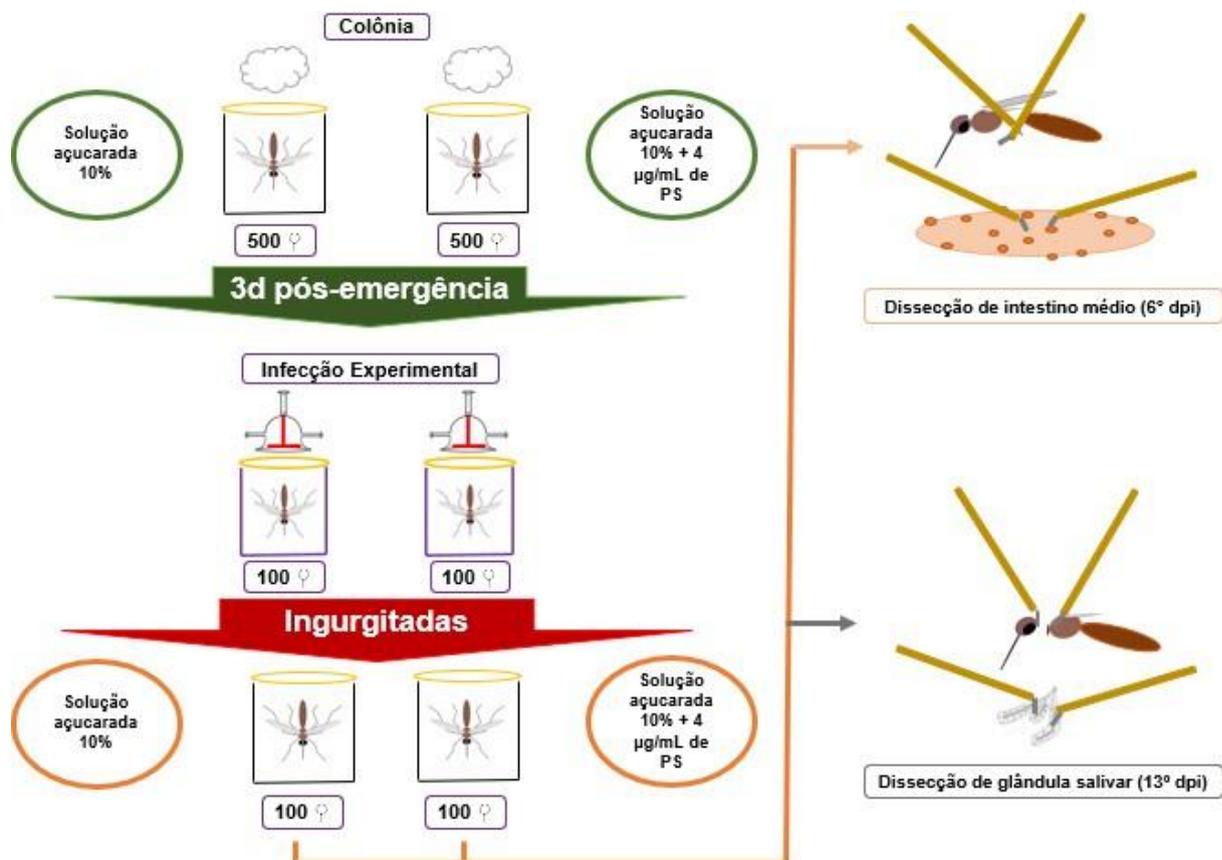


Figura 11: Desenho experimental para avaliar o efeito de uso antibiótico na produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax*. O grupo controle (com microbiota) foi alimentado com solução açucarada 10%, o grupo sem microbiota foi alimentado com solução açucarada mais PenStrep (PS).

3.4.3- Avaliação do efeito da inativação do soro no desenvolvimento de *P. vivax* em *An. aquasalis*

Quanto ao sangue utilizado para infecção, após a coleta do mesmo em tubo de heparina, 1mL foi transferido para um microtubo Eppendorf de 1,5mL, sendo a amostra então centrifugada a 5000 rpm por 1 min para retirada do soro (sobrenadante). Esse soro foi colocado em um novo microtubo Eppendorf de 1,5 mL e então inativado em bloco seco a 56°C por 1h. Após esse tempo, o soro foi homogeneizado junto ao 1 mL de sangue, para alimentar apenas as fêmeas selecionadas para esse grupo (Figura 12). Um segundo grupo serviu como controle, em que o sangue do paciente não sofreu alterações durante a infecção experimental.

No 6º dpi, foi realizada a dissecção de intestino médio para contagem de oocistos e no 13º dpi, a dissecção de glândulas salivares para contagem de esporozoítos.

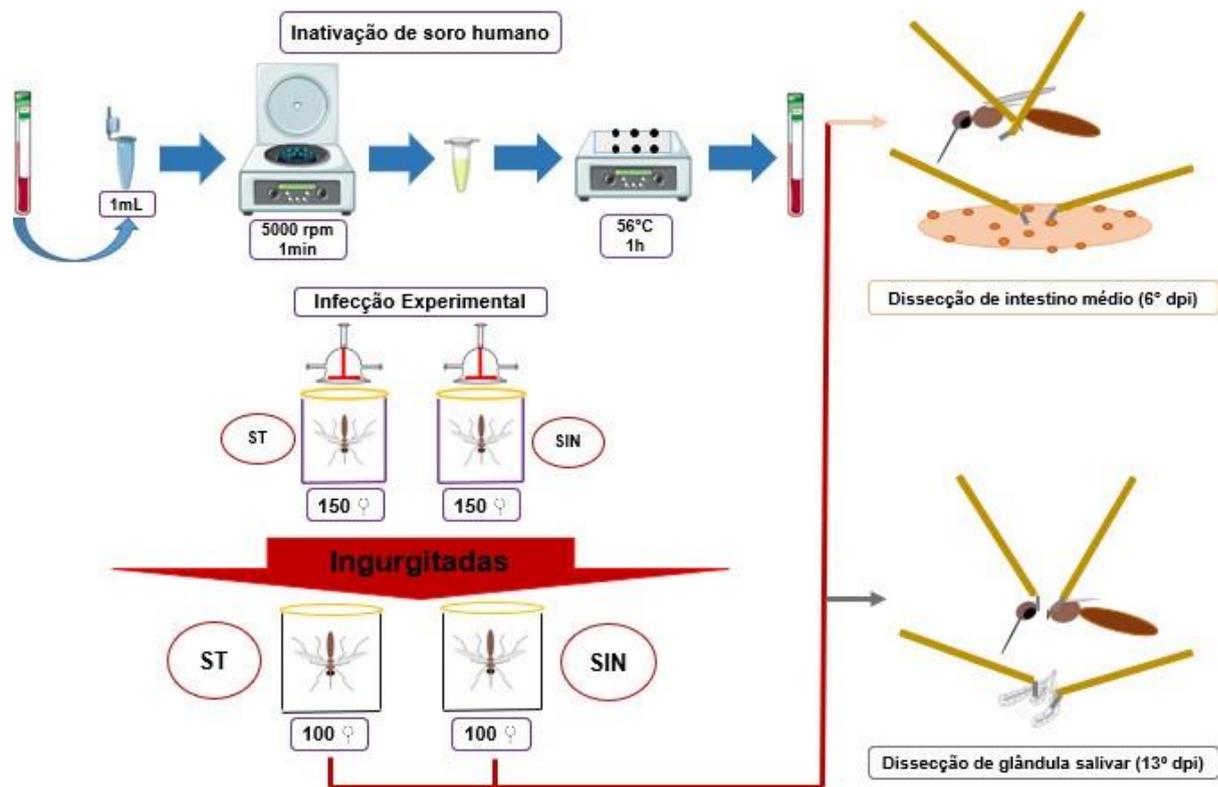


Figura 12: Desenho experimental para avaliar o efeito da inativação de soro humano na produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax*. ST= grupo alimentado com sangue total, SIN= grupo alimentado com sangue contendo soro inativado.

Para padronização do experimento, após a infecção, os grupos controle de cada um dos efeitos a serem avaliados foram reunidos em um único grupo, isto é, um grupo de fêmeas foi alimentado com Sangue Total (ST), sem antibiótico (Mic+) e mantido à temperatura ambiente do insetário (28°C). Durante a alimentação artificial, a exceção das fêmeas do grupo SIN, todas recebiam sangue total. Cada tratamento (temperatura, antibiótico, soro) foi feito em quadruplicata biológica, sendo as dissecções de pares de glândulas as replicatas técnicas.

3.5- Contagem de oocistos no intestino médio de *An. aquasalis*

Seis dias após a infecção experimental, o intestino médio de 10 fêmeas de cada tratamento foi dissecado em solução salina de fosfato (PBS), corado com mercúrio cromo 2%

e observado no microscópio óptico com aumento de 20x e 40x para contagem de oocistos. Após a contagem, foram calculadas a taxa de infecção e a taxa de oocistos.

3.6- Contagem de esporozoítos em glândula salivar de *Anopheles aquasalis*

Após 13 dias de infecção, foram dissecados 50 pares de glândulas salivares de cada grupo a ser avaliado. Para a observação dos esporozoítos do tecido glandular, as glândulas foram dissecadas em uma gota de meio RPMI 1640 de 20-30 μ L. Cortadas em vários pedaços pequenos com uso de estiletos e transferidos por pipetas para câmara de Neubauer (10 μ L) para contagem de esporozoítos sob microscopia óptica em aumento de 40x.

3.7- Análises dos dados

A taxa de infecção foi calculada pela razão entre o número de intestinos com oocistos e o total de intestinos dissecados, multiplicada por 100.

Para comparar o número de oocistos e esporozoítos entre os diferentes tratamentos foi utilizado o modelo de distribuição binomial negativa.

Foi utilizado um intervalo de confiança de 95% para todas as análises e o programa RStudio para formação dos gráficos de análise de incidência de risco e tabelas de razão de prevalência, tanto para produção de oocistos como de esporozoítos.

4. Resultados

Para avaliar o efeito da temperatura, o sistema complemento e a presença/ausência da microbiota na produção de esporozoítos de *P. vivax* em *An. aquasalis* foram realizadas quatro (4) replicatas biológicas, cada uma utilizando sangue de um paciente malárico diferente.

Durante a infecção, foi realizada a gota espessa em lâmina, a qual foi corada e lida por microscopia óptica (Tabela 1).

Tabela 1: Parasitemia e contagem de gametócitos das diferentes replicatas realizadas

| Infecções Experimentais | Parasitemia | Gametócitos por 300 campos |
|-------------------------|-------------|----------------------------|
| 1ª Replicata | ++ | 12 |
| 2ª Replicata | ++ | 8 |
| 3ª Replicata | ++ | 9 |
| 4ª Replicata | ++ | 13 |

Após seis dias da infecção dos mosquitos, os intestinos foram dissecados, corados e os oocistos contados (Figura 13).

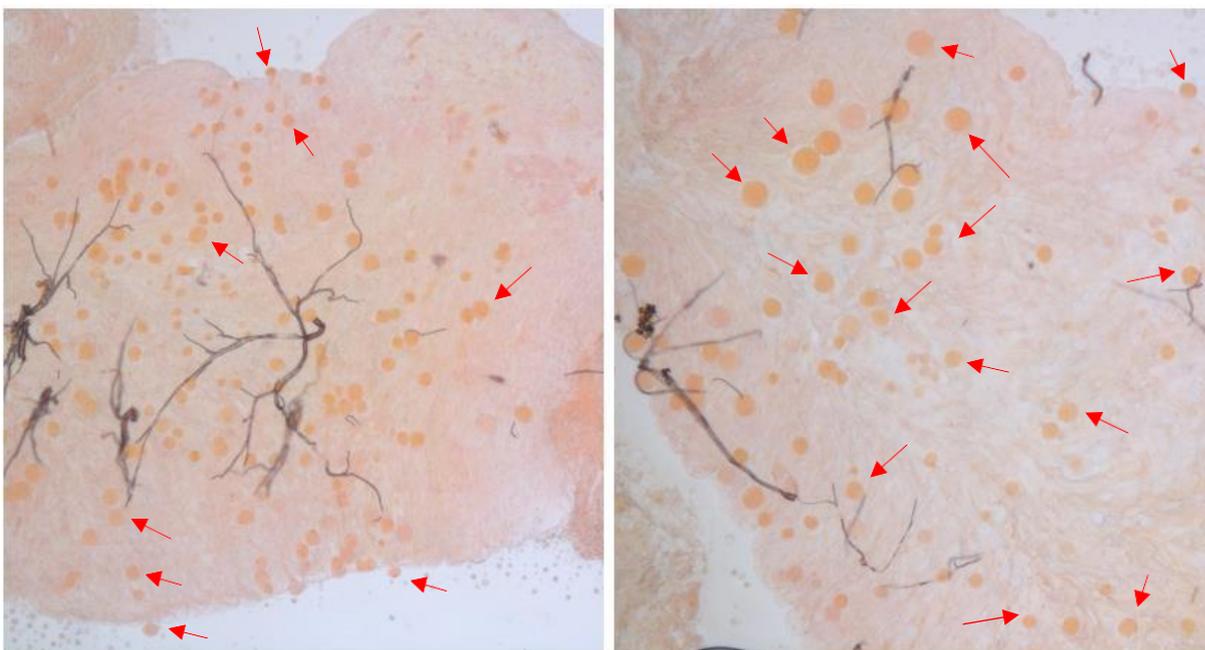


Figura 13: Oocistos de *Plasmodium vivax* (setas vermelhas) em intestino médio de *Anopheles aquasalis*, 6 dias após a infecção, visualizados em microscópio óptico, em aumento 40x.

A taxa de infecção variou entre os tratamentos sendo o menor valor observado em mosquitos mantidos a 20°C e os maiores a 28°C. O menor número de oocistos por intestino médio foi observado em mosquitos mantidos a 20°C. Em todos os tratamentos a 28°C os mosquitos apresentaram números altos de oocistos, sendo o maior número observado em mosquitos que receberam antibiótico na dieta antes da infecção experimental (Mic-) e com soro inativado (SIN). O número de oocistos foi significativamente menor em *An. aquasalis* mantidos a 20°C ($p < 0,001$) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Taxas de infecção por oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos

| Replicata | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN |
|-----------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| Biológica | TI (X, M) | TI (X, M) | TI (X, M) | TI (X, M) | TI (X, M) |
| 1 | 10% (0.2, 0) | 30% (3.6, 0) | 70% (18.7, 13) | 60% (50.8, 12) | 30% (9.5, 0) |
| 2 | 10% (0.1, 0) | 80% (17.4, 7) | 80% (20.6, 13) | 70% (23.1, 25) | 20% (7.9, 0) |
| 3 | 20% (0.8, 25.5) | 100% (24.9, 13) | 90% (21, 13) | 60% (4.5, 2) | 100% (41.5, 42.5) |
| 4 | 10% (0.1, 0) | 20% (5.3, 0) | 60% (47.9, 12) | 30% (2.2, 0) | 60% (54.9, 6) |

TI = Taxa de infecção, X = média de oocistos, M = mediana de oocistos. Temperatura (20°C, 24°C, 28°C), Presença (Mic⁺) / Ausência (Mic⁻) de microbiota e Alimentação com sangue total (ST) / soro inativado (SIN)

A análise da razão de prevalência mostrou que o número de oocistos foi significativamente menor em *An. aquasalis* mantidos a 20°C comparados a 28°C (Tabela 3). Nos tratamentos a 24°C e Mic⁻ o número de oocistos se manteve abaixo do valor de referência, embora não haja diferença significativa comparada ao valor de referência (28°C) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da razão de prevalência do número de oocistos em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax* submetidos a diferentes tratamentos Temperatura (20°C, 24°C, 28°C), Presença (Mic⁺) / Ausência (Mic⁻) da microbiota e Alimentação com sangue total (ST) / soro inativado (SIN)

| Preditores | Índices de Taxa de incidência | CI | p |
|------------------------|-------------------------------|-----------|--------|
| Referência (28°C) | - | - | - |
| Fator 20°C | 0.01 | 0.00-0.03 | <0.001 |
| Fator 24°C | 0.47 | 0.18-1.25 | 0.123 |
| Fator MIC ⁻ | 0.74 | 0.28-1.96 | 0.544 |
| Fator SIN | 1.05 | 0.40-2.77 | 0.917 |

CI = Intervalo de confiança de 95%, p = probabilidade. Temperatura (20°C, 24°C, 28°C), Presença (Mic⁺) / Ausência (Mic⁻) da microbiota e Alimentação com sangue total (ST) / soro inativado (SIN).

No gráfico de análise de incidência de risco para a produção de oocistos é observado

que os fatores 24°C e Mic- apresentaram maior risco e de forma oposta, a 24°C o risco de produção de esporozoítos é muito baixo (Figura 14).

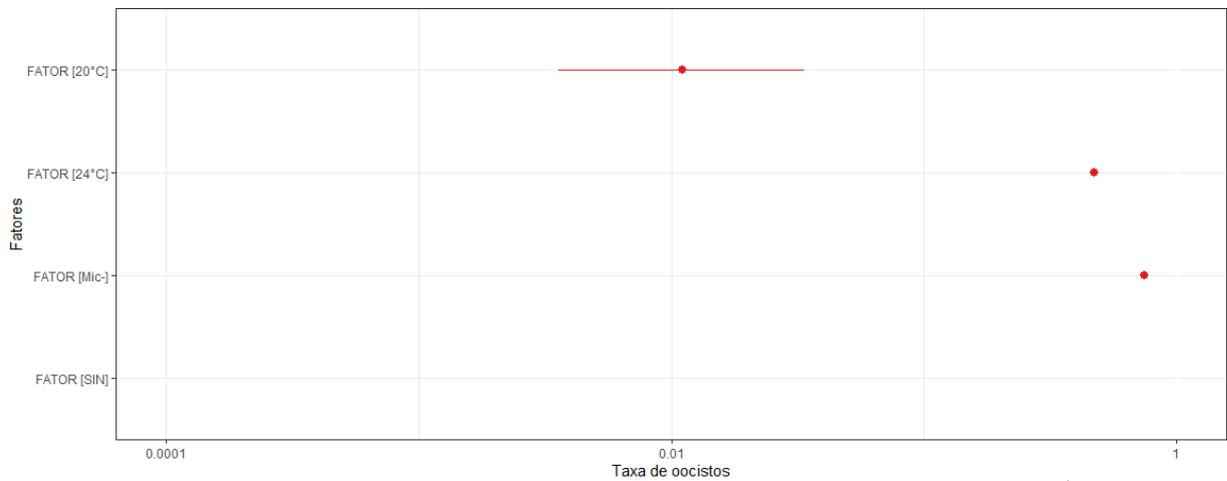


Figura 14: Gráfico de análise de incidência de riscos para produção de oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos de temperatura (20°C, 24°C e 28°C), presença (MIC+) / ausência (MIC-) de microbiota e alimentação com sangue total (ST)/soro inativado (SIN).

Após 13 dias da infecção experimental, as glândulas salivares dos mosquitos foram dissecadas e os esporozoítos contados (Figura 15). O número de esporozoítos variou de 1 a 1142 por par de glândula dissecado (Tabela 4). De modo geral, quando comparadas ao grupo controle (28°C Mic+ ST), as fêmeas alimentadas com PenStrep (Mic-) e com sangue contendo soro inativado (SIN) apresentaram maior produção de esporozoítos, enquanto aquelas mantidas a 20°C tiveram o menor número de esporozoítos (Figura 16).

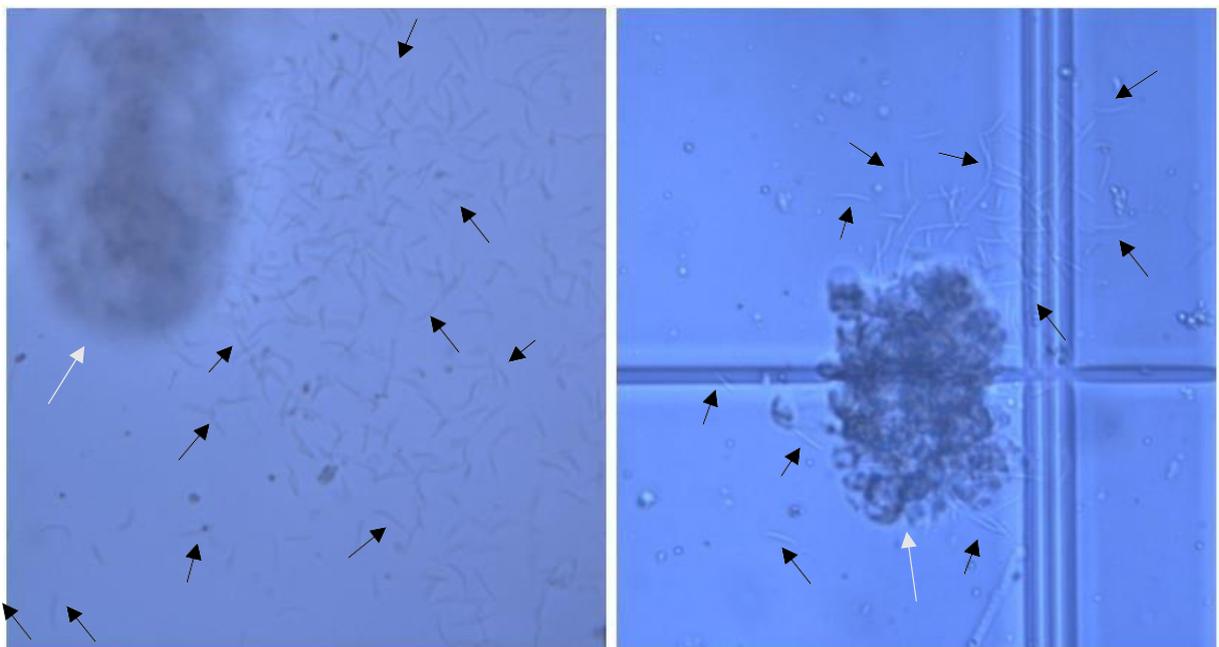


Figura 15: Esporozoítos de *Plasmodium vivax* (setas negras) em glândula salivar de *Anopheles aquasalis* (setas brancas), visualizados em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, com aumento de 40x.

Tabela 4: Número de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em glândulas salivares de *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos

| Replicata | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN |
|-----------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| Biológica | n (X, M) | n (X, M) | n (X, M) | N (X, M) | n (X, M) |
| 1 | 415 (83; 90) | 891 (178,2; 185) | 1687 (337,4; 313) | 1396 (279,2; 259) | 576 (115,2; 109) |
| 2 | 320 (106,7; 105) | 414 (138; 128) | 1346 (448,7; 367) | 1384 (461,3; 345) | 1066 (355,3; 262) |
| 3 | 299 (99,7; 101) | 289 (96,3; 84) | 1571 (523,7; 507) | 990 (330; 303) | 1304 (434,7; 257) |
| 4 | 22 (4,4; 5) | 48 (9,6; 8) | 1661 (332,2; 117) | 135 (27; 5) | 457 (91,4; 50) |

N = número de esporozoítos por fator em uma replicata, X = média de esporozoítos, M = mediana de esporozoítos. Temperatura (20°C, 24°C, 28°C), Presença (Mic⁺) / Ausência (Mic⁻) de microbiota e Alimentação com sangue total (ST) / soro inativado (SIN)

A análise de razão de prevalência mostrou que o número de esporozoítos em glândula salivar foi significativamente menor em *An. aquasalis* mantidos a 20°C e 24°C comparado com os mantidos a 28°C (Tabela 5). Nos tratamentos Mic⁻ e SIN, o número de esporozoítos se manteve abaixo do valor de referência (28°C), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da razão de prevalência do número de esporozoítos em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax* e submetidos a diferentes tratamentos

| Preditores | Índices de Taxa de incidência | CI | p |
|------------------------|-------------------------------|-----------|--------|
| Referência (28°C) | - | - | - |
| Fator 20°C | 0.17 | 0.08-0.36 | <0.001 |
| Fator 24°C | 0.26 | 0.12-0.56 | <0.001 |
| Fator MIC ⁻ | 0.62 | 0.29-1.33 | 0.215 |
| Fator SIN | 0.54 | 0.25-1.16 | 0.110 |

CI = Intervalo de confiança de 95%, p = probabilidade. Temperaturas (20°C, 24°C e 28°C), Presença (MIC⁺) / Ausência (MIC⁻) de microbiota e Alimentação com sangue total (ST)/soro inativado (SIN)

No gráfico de análise de incidência de risco para a produção de esporozoítos em glândula salivar é observado que os mosquitos submetidos aos fatores Mic- e SIN apresentam maior risco de se infectar, do que aqueles mantidos a 20°C e 24°C (Figura 16).

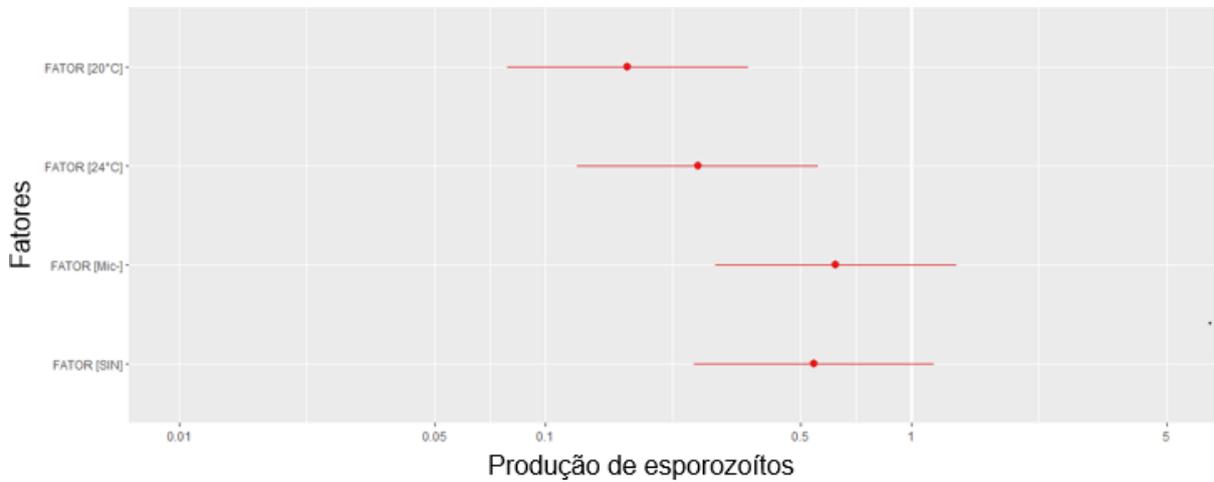


Figura 16: Gráfico de análise de incidência de riscos para produção de esporozoítos de *Plasmodium vivax* em glândula salivar de *Anopheles aquasalis* submetidos a diferentes tratamentos de temperatura (20°C, 24°C e 28°C), presença (MIC+) / ausência (MIC-) de microbiota e alimentação com sangue total (ST)/soro inativado (SIN).

5. Discussão

Nesse trabalho foram analisados alguns fatores que podem influenciar o desenvolvimento do *P. vivax* em *An. aquasalis*, afetando a carga de oocistos e esporozoítos.

Fêmeas mantidas a 28°C apresentaram maior taxa de infecção e maior carga de oocistos e esporozoítos. Esse resultado reflete a adaptação do *P. vivax* e o *An. aquasalis* à região Amazônica, onde a temperatura ambiente se mantém alta durante todo o ano, favorecendo a transmissão do parasito. De forma contrária, nas temperaturas de 20°C e 24°C foram observadas as menores cargas de oocistos e esporozoítos de *P. vivax*. Essas adaptações são espécie-específicas e provavelmente possuem relação com a distribuição dos vetores. Pathak et al. (2019) observaram um declínio na infecção de *Anopheles stephensi* com *P. falciparum* quando a temperatura aumentou para 28°C e um aumento das taxas de oocistos e esporozoítos a 24°C. Segundo Petersen et al. (2013) não há transmissão de *P. vivax* abaixo de 16°C e Rossati et al. (2016) afirma que o ciclo do *Plasmodium*, de modo geral, tem um intervalo térmico de 25-30°C.

Usando temperaturas de 20°C, 22°C 24°C e 26°C para avaliar a transmissão de *P. yoelli* em *An. stephensi*, Paaijmans et al. (2012) observaram que o desenvolvimento do *Plasmodium* até o esporozoíto era reduzido conforme aumento da temperatura (8 dias a 26°C e 15 dias a 20°C). O número de mosquitos infectivos também foi menor a 20°C. Em nossos experimentos, a mortalidade de *An. Aquasalis* foi menor a temperaturas mais baixas (20°C e 24°C) e embora a dissecação de glândula salivar tenha sido realizada no mesmo dia para todas as temperaturas (13° dpi), dificultando a análise do período de incubação do *Plasmodium* conforme o estudo acima, a avaliação da mortalidade dos mosquitos infectados bem como a contagem de esporozoítos por glândula dissecada, promovem maior quantidade de informações para compreensão da influência da temperatura na competência vetorial.

Gendrin et al. (2015) verificaram um aumento do número de oocistos em fêmeas de *An. gambiae* infectadas por *P. falciparum* com uso de Pen Strep durante infecção experimental, embora afirme que essa conexão antibiótico e suscetibilidade à infecção seja melhor observada em infecções de baixa intensidade. A redução da microbiota que poderia ter papel de competição com o *Plasmodium* no corpo do mosquito implica em maior suscetibilidade desde à infecção parasitária, resultando em aumento da longevidade do mosquito infectado.

As fêmeas alimentadas com solução açucarada contendo antibiótico e mantidas a 28°C obtiveram maior número de esporozoítos em comparação ao grupo controle. Mordecai et al.

(2019) afirma que em ambientes de temperatura elevada, condições que possibilitem maior tempo de vida ao mosquito são de extrema necessidade para o desenvolvimento do parasito no vetor, como observado por Gendrin et al. (2015), por meio da administração de PenStrep na alimentação sanguínea de *An. gambiae* infectados por *P. falciparum*. Utilizando essa metodologia como base, Moreno et al. (2018) obtiveram uma maior curva de sobrevivência de *An. darlingi* quando infectados por *P. vivax*.

Uma série de trabalhos foram realizados que demonstram aumento da carga de oocistos após alimentação artificial com soro inativado (Margos et al. 2001, Bharthi et al. 2006, Bousema et al. 2010, Simon et al. 2013). Durante a infecção, tanto a via clássica quanto alternativa (ACP) do sistema complemento são ativadas, sendo a segunda com importante papel na diminuição da carga parasitária (Grotendorst et al. 1986). Também já foi demonstrado que os estágios mais precoces do ciclo sexual do *Plasmodium* (gametócitos, gametas e zigotos) possuem maior resistência contra a ação do sistema complemento do que o oocineto, por exemplo (Smith et al. 2014). Dessa forma, o desenvolvimento de oocistos e esporozoítos no corpo gorduroso de fêmeas de *Anopheles aquasalis* pode ter uma ação reduzida do sistema complemento, ao passo que os constituintes desse sistema são inibidos e o parasito confere maior proteção.

Ao avaliar condições para a realização de alimentação artificial por membrana, Bousema et al. (2010) observaram um menor número de fêmeas infectadas quando alimentadas com sangue ressuspensionado com plasma (23,9%) comparado com aquelas alimentadas com sangue total (73%). O mesmo foi observado ao comparar experimentos com reposição do soro (68%). Para esse estudo, foi realizado o acompanhamento das fêmeas pós-infecção com contagem da mortalidade e nas 4 replicatas biológicas, os mosquitos alimentados com soro inativo (SIN) apresentaram a terceira maior mortalidade (Tabelas 5,6,7,8).

Em seu trabalho avaliando a suscetibilidade à infecção por *P. vivax* de cinco espécies de anofelinos, Ríos-Velásquez et al. (2013) observaram variação no número de oocistos contados entre as espécies estudadas, quando alimentadas com sangue contendo soro inativado. Todavia, apesar de *An. aquasalis* apresentar maior número de oocistos (1-200, média de 22,5) e taxa de infecção (40,8%) em comparação as outras espécies, ao analisar a espécie individualmente, não foi verificada diferença significativa no número de oocistos (p-valor = 2,44) e não houve influência na taxa de infecção (p = 0,298). Martin-Campos et al. (2018) também verificaram aumento no número de oocistos quando comparados ao grupo controle, porém também sem diferença significativa na produção de oocistos (p-valor = 0,9748)

utilizando o mesmo modelo de estudo (*An. aquasalis* infectados por *P. vivax*). No mesmo ano, Moreno et al. (2018) obtiveram elevado número de oocistos em fêmeas de *Anopheles darlingi* por meio da reposição do plasma pós-infecção experimental.

Embora a ativação do sistema complemento tenha importante papel na defesa do vetor contra infecção, a inibição desse fator no sangue não demonstrou diferença significativa no desenvolvimento de *P. vivax* em *An. aquasalis* nos dois estudos anteriores e se sobressaiu em par de glândulas dissecados.

Ainda que por meio desse estudo tenha sido possível estabelecer alguns fatores que intensifiquem a produção de esporozoítos, como a manutenção a 28°C, uso de antibiótico (PenStrep) e inativação do soro, mais estudos são necessários em que sejam adicionados novos fatores de modo a permitir um número maior de trabalhos sobre a biologia de esporozoítos, que permitam testar estratégias de bloqueio de transmissão.

Por outro lado, esses resultados mostram que a temperatura ambiente na região Amazônica é suficiente para manter as taxas de infecção em espécies de *Anopheles* vetoras e altas cargas de oocistos e esporozoítos, o que implica em grande risco à população em contato com essa região e maior dificuldade no controle da doença.

Não realizamos testes com temperatura superiores a 28°C, de modo a simular o efeito da aquecimento global. Todavia, pode-se sugerir que a princípio, como observado em condições laboratoriais, temperaturas acima de 28°C causam aumento na mortalidade dos mosquitos e diminuem sua longevidade, logo, poderíamos assumir duas situações: a) o aumento da temperatura em decorrência do aquecimento global pode resultar na morte de populações de mosquitos assim como na redução de incidência da doença; ou b) os mosquitos consigam se adaptar às condições climáticas mais drásticas continuando a transmitir o parasito. Portanto, mais pesquisas sobre fatores de influência na infecção por *Plasmodium* em *Anopheles* devem ser realizados para melhor compreender como as mudanças climáticas poderão mudar a transmissão da malária na região Amazônica.

6. Conclusão

Por meio desse estudo foi possível avaliar a influência de três fatores no ciclo de vida de *Plasmodium vivax* (espécie de maior predominância nas Américas) em *Anopheles aquasalis* (vetor de regiões litorâneas com colônia bem estabelecida no Brasil), sob condições laboratoriais, com foco na produção de oocistos e principalmente, de esporozoítos. Ainda que mais testes sejam necessários que envolvam maior número ou até outros fatores relacionados ao desenvolvimento do *Plasmodium* no vetor, até mesmo com outros modelos, as variáveis nas quais os fatores aqui avaliados se destacaram possibilitam novos estudos de interação parasito-vetor e parasito-hospedeiro.

Além do aspecto de pesquisa aplicada, poucas são as informações sobre a biologia básica do ciclo do parasito no mosquito, como exemplo, o mecanismo de invasão na glândula salivar e a resposta imune. O desenvolvimento de técnicas e aprimoramento das mesmas, de infecção experimental e manutenção até os esporozoítos em glândula salivar são de fundamental importância.

7. Referências

- Akaki M e Dvorak JA. A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *J Exp Biol.* 2005; 208(16):3211–8.
- Alencar Filho AC, Lacerda MVG, Okoshi K e Okoshi MP. Malaria and Vascular Endothelium. *Arq Bras Cardiol.* 2014; 103(2): 165-169.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1611–4.
- Ali M, Al-Olayan EM, Lewis S et al. Naturally occurring triggers that induce apoptosis-like programmed cell death in *Plasmodium berghei* ookinetes. *PLoS ONE.* 2010; 5: e12634.
- Antinori S, Galimberti L, Milazzo L e Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012; 4(1): e2012013.
- Araújo MS, Andrade AO, Santos NAC et al. Brazil's first free-mating laboratory colony of *Nyssorhynchus darlingi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52:e20190159.

- Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ et al. Anopheles aquasalis infected by Plasmodium vivax displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and Plasmodia. PLoS One. 2010; 5(3):1-11.
- Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ et al. The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection. PLoS Neg Trop Dis. 2011; 5(11): e1317.
- Bahia A C, Oliveira J H M, Kubota M S et al. The role of reactive oxygen species in Anopheles aquasalis response to Plasmodium vivax infection. PLoS One. 2013; 8(2): e57014.
- Bahia AC, Dong Y, Blumberg BJ et al. Exploring Anopheles gut bacteria for Plasmodium blocking activity. Environ. Microbiol. 2014; 16(9): 2980-94.
- Bahia AC, Kubota MS, Jayme ASN et al. An Anopheles aquasalis GATA factor Serpent is required for immunity against Plasmodium and bacteria. PLoS Neg Trop Dis. 2018; 12(9): e0006785.
- Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million-murdering death metamorphoses of malaria in the mosquito. Trends Parasitol. 2005; 21(12): 573–80.
- Behet MC, Kurtovic L, Gemert GJ et al. The complement system contributes to functional antibody mediated responses induced by immunization with Plasmodium falciparum malaria sporozoites. Infect Immun. 2018; 86(7): e00920-17.
- Bharti A, Chuquiyauri R, Brower KC et al. Experimental infection of the neotropical malaria vector Anopheles darlingi by human patient-derived Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75: 610-616.
- Bousema JT, Drakeley CJ, Kihond J et al. A longitudinal study of immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens in Tanzanian adults. Parasite Immunol. 2007; 29: 309-317.

- Bousema T, Roeffen W, Meijerink H et al. The dynamics of naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a low endemic area in Tanzania. *PLoS ONE*. 2010; 5: e14114.
- Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42821.
- Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*. 2017; 5(10): e1038–46.
- Cappelli A, Valzano M, Cecarini V et al. Killer yeasts exerts anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. *Parasite Vector*. 2019; 12: 329.
- Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F e Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33: 489-492.
- Chu VM, Sallum MAM, Moore TE et al. Evidence for family-level variation of phenotypic traits in response to temperature of brazilian *Nyssorhynchus darlingi*. *Parasite Vector*. 2020; 13: 55.
- Cirimotich CM, Dong Y, Claiton AM et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2011; 332 (6031): 855-8.
- Clyde DF, Mccarthy VC, Miller RM et al. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced *Falciparum* malaria. *Am J Med Sci*. 1973; 266: 398-403. doi: 10.1097/00000441-197312000-00001
- Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994. 225 p.

- Costa-da-Silva AL, Marinotti O, Ribeiro JM et al. Transcriptome sequencing and developmental regulation of gene expression in *Anopheles aquasalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(7): e3005.
- Devenport M, Alvarenga PH, Shao L et al. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCi as a heme-binding protein. *Biochemistry*. 2006; 45: 9540-9549.
- Dieme C, Rotureau B, Mitri C. Microbial pre-exposure and vectorial competence of *Anopheles* mosquitoes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 508.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2009; 5(5): e1000423.
- Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ et al. Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol*. 2006; 61: 991-998.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016; 15(1): 284.
- Gendrin M, Rodgers FH, Yerbanga RS et al. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat Commun*. 2015; 6(1).
- Gendrin M, Yerbanga R S, Ouedraogo JB et al. Differential effects of azithromycin, doxycycline, and cotrimoxazole in ingested blood on the vectorial capacity of malaria mosquitoes. *Open Forum Infect. Dis*. 2016; 3(2): ofw074.
- Goh YS, McGuire D, Rénia L. Vaccination with sporozoites: models and correlates of protection. *Front Immunol*. 2019; 10: 1227. doi: 10.3389/fimmu.2019.01227
- Gouagna LC, Mulder B, Noubissi E et al. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health*. 1998; 3: 21-28.

- Graves PM et al. Antibodies to Plasmodium falciparum gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol.* 1988; 10: 209-218.
- Grotendorst CA, Carter R, Rosenberg R et al. Complement effects on the infectivity of Plasmodium gallinaceum to Aedes aegypti mosquitoes. I. Resistance of zygotes to the alternative pathway of complement. *J Immunol.* 1986; 136: 4270-4274.
- H Ta T, Hisam S, Lanza M et al. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malar J.* 2014; 13: 68.
- Harbach RE. Anopheles classification. *Mosquito Taxonomic Inventory.* 2019.
- Healer J, McGuinness D, Hopcroft P et al. Complement-mediated lysis of Plasmodium falciparum gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun.* 1997; 65: 3017-3023.
- Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito hemocoel. *Int J Parasitol.* 2007; 37(6): 673-81.
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1155-64. doi: 10.1086/339409
- Hurd H, Carter V, Nacer A. Interactions between malaria and mosquitoes: the role of apoptosis in parasite establishment and vector response to infection. *CTMI.* 2005; 289: 185-218.
- James AA. Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *J Exp Biol.* 2003; 206(21): 3817-21.
- Karunaweera ND, Carter R, Grau GE et al. Tumour necrosis factor-dependent parasite killing effects during paroxysms in non-immune Plasmodium vivax malaria patients. *Clin Exp Immunol.* 1992; 88: 499-505.
- Kramer LD e Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol.* 2015; 15: 112-118.

- Lensen AHW, Bolmer-Van de Vegte M, Van Gemert GJ et al. Leukocytes in a *Plasmodium falciparum* uninfected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes. *Infect Immun*. 1997; 65: 3834-3837.
- Margos G, Navarette S, Butcher G et al. Interaction between host complement and mosquito-midgut-stage *Plasmodium berghei*. *Infect Immun*. 2001; 69: 5064-5071.
- Martinez-Villegas L, Assis-Geraldo L, Koerich LB et al. Characterization of the complete mitogenome of *Anopheles aquasalis*, and phylogenetic divergences among *Anopheles* from diverse geographic zones. *PLoS One*. 2019; 14(9): e0219523.
- Martins-Campos K M, Kuehn A, Almeida A et al. Infection of *Anopheles aquasalis* from symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections in Manaus, western Brazilian Amazon. *Parasite Vector*. 2018; 11: 288.
- Mendis KN, Munasinghe YD, de Silva YN et al. Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infect Immun*. 1987; 55(2): 369-372.
- Milner DA Jr. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018; 8(1). pii: a025569.
- Mordecai EA, Caldwell JM, Grossman MK, et al. Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecology Letters*. 2019; 22: 1690-1708.
- Moreno M, Tong-Rios C, Orjuela-Sanchez P et al. Continuous Supply of *Plasmodium vivax* Sporozoites from Colonized *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon. *ACS Infect Dis*. 2018; 4(4): 541-8.
- Motard A, Landau I, Nussler A et al. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol*. 1993; 15: 21-26.
- Mueller AK, Kohlhepp F, Hammerschmidt C e Michel K. Invasion of mosquito salivary glands by malaria parasites: Prerequisites and defense strategies. *Int J Parasitol*. 2010; 40(11): 1229-35.

- Murdock CC, Blanford S, Luckhart S e Thomas MB. Ambient temperature and dietary supplementation interact to shape mosquito vector competence for malaria. *J Insect Physiol.* 2014; 67: 37–44.
- Naotunne TS, Karunaweera ND, Del Giudice G, et al. Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. *J Exp Med.* 1991; 173: 523-529.
- Naotunne TS, Karunaweera ND, Mendis KN et al. Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology.* 1993; 78: 555-562.
- Noden BH, Kent MD, Beier JC. The impact of variations in temperature on early *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles stephensi*. *Parasitology.* 1995; 111(5): 539-45.
- Oketch BA, Gouagna LC, Walczak E et al. The development of *Plasmodium falciparum* in experimentally infected *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under ambient microhabitat temperature in western Kenya. *Acta Trop.* 2004; 92(2): 99-108.
- Ohm JR, Baldini F, Barreaux P et al. Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasite Vector.* 2018; 11(1).
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda M V, Brasil P, et al. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 2010; 9: 115.
- Orjuela-Sanchez P, Villa ZH, Moreno M, et al. Developing *Plasmodium vivax* Resources for Liver Stage Study in the Peruvian Amazon Region. *ACS Infect Dis.* 2018; 4(4): 531–40.
- Paaijmans KP, Blanford S, Chan BHK, Thomas MB. Warmer temperatures reduce the vectorial capacity of malaria mosquitoes. *Biol. Lett.* 2012; 8: 465-468.
- Parthak KA, Shiau JC, Thomas MB et al. Field relevant variation in ambient temperature modifies density-dependent establishment of *Plasmodium falciparum* gametocytes in mosquitoes. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2651.

- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR et al. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002; 32: 517-523.
- Petersen E, Severini C, Picot S. *Plasmodium vivax* malaria: a re-emerging threat for temperature climate zones? *Travel Med Infect Di.* 2013; 11: 51-59.
- Peterson TM, Gow AJ, Luckhart S. Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42: 132-142.
- Pewkliang Y, Rungin S, Lerdpanyangam K et al. A novel immortalized hepatocyte-like cell line (imHC) supports in vitro liver stage development of the human malarial parasite *Plasmodium vivax*. *Malar J.* 2018; 17: 50.
- Ramiro RS, Alpedrinha J, Carter L et al. Sex and death: the effects of innate immune factors on the sexual reproduction of malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1001309.
- Reiss T, Rosa TFA, Blaesius K et al. Cutting Edge: FHR-1 binding impairs factor h-mediated complement evasion by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Immunol.* 2020; 201: 3497-3502.
- Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL et al. Letter: sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1974; 68: 258-9. doi: 10.1016/0035-9203(74)90129-1
- Ríos-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Pessoa FA, et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2013; 12(1): 460.
- Romoli O, Gendrin M. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasite Vector.* 2018; 11(1): 200.
- Roth A, Adapa SR, Zhang M et al. Unraveling the *Plasmodium vivax* sporozoite transcriptional journey from mosquito vector to human host. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 12183.

- Roth A, Maher SP, Conway AJ et al. A comprehensive model for assessment of liver stage therapies targeting *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*. 2018; 9: 1837.
- Saeed M, Roeffen W, Alexander N et al. *Plasmodium falciparum* antigens on the surface of the gametocyte-infected erythrocyte. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2280.
- Sampaio VS, Beltrán TP, Kobylinski KC et al. Filling gaps on ivermectin knowledge: effects on the survival and reproduction of *Anopheles aquasalis*, a Latin American vector. *Malar J*. 2016; 15: 491.
- Schrum M, Canezin A, Chakravarthy S et al. An efficient production process for extracting salivary glands from mosquitoes. *CoRR*. 2019.
- Silva A N M, Santos C C B, Lacerda R N, Machado R L D, Póvoa M M. Suscetibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(5): 547-550.
- Simon N, Lasonder E, Scheuermayer M et al. Malaria parasites co-opt human factors H to prevent complement-mediated lysis in the mosquito midgut. *Cell Host Microbe*. 2013; 13: 29-41.
- Sinden RE, Alavi Y, Raine JD. Mosquito - malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34: 625-629.
- Sinden RE, Smalley ME. Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by leucocytes in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976; 70: 344-345.
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(2): 165-84.
- Sinka E M, Rubio-Palis Y, Manguin S et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasite Vector*. 2010; 3: 117.

- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasite Vector*. 2012; 5: 69.
- Sivep/MS – Sistema de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde.. Casos de malaria notificados na região Amazônica entre 2016 e 2018. 2019. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2019_01_16/casos_notificados_2018_regio_Amaznica.
- Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena. The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(5): 644-661.
- Soulard V, Bosson-Vanga H, Lorthiois A, et al. Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. *Nat Commun*. 2015; 6:7690.
- Sreenivasamurphy SK, Dey G, Ramu M et al. A compendium of molecules involved in vector-pathogen interactions pertaining to malaria. *Malar J*. 2013; 12: 216.
- Stone W, Bousema T, Sauerwein R e Drakeley C. Two-faced immunity? The evidence for antibody-enhancement of malaria transmission. *Trends Parasitol*. 2019; 35(2): 140-153.
- Sutherland C J, Tanomsing N, Nolder D et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally. *J Infect Dis*. 2010; 201(10): 1544-50.
- Swanchaichinda C, Paskewitz SM. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) to melanize sephadex beads. *J Med Entomol*. 1998; 35(2): 157- 61.
- Tchioffo MT, Boissière MA, Churcher TS et al. Modulation of malaria infection in Anopheles gambiae mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS One*. 2013; 8(12): e81663.

- Van der Kolk M, de Vlas SJ, Sauerwein RW. Reduction and enhancement of *Plasmodium falciparum* transmission by endemic human sera. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 1091-1095.
- Van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell.* 2001; 104: 152-164.
- Van Dijk MR, van Schaijk BC, Khan SM et al. Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000853.
- Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E et al. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(4): 384–91.
- WHO – World Health Organization. 2019. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization 2019. 210 pp.
- Wilke AB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasite Vector.* 2015; 24(8): 342.

8. Anexo

8.1 - Dados de mortalidade de *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax* submetidos aos diferentes tratamentos

Tabela 6: 1ª Replicata (Infecção experimental – 11/10/19)

| Data | DPI | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN ST |
|-------|-----|------|------|--------------------------|-----------------------------|---------------|
| 12/10 | 1° | 1 | 1 | 7 | 0 | 1 |
| 13/10 | 2° | 2 | 0 | 5 | 1 | 5 |
| 14/10 | 3° | 4 | 1 | 6 | 0 | 2 |
| 15/10 | 4° | 4 | 1 | 4 | 5 | 2 |
| 16/10 | 5° | 4 | 1 | 5 | 11 | 6 |
| 17/10 | 6° | 3 | 0 | 3 | 6 | 0 |
| 18/10 | 7° | 6 | 3 | 4 | 4 | 0 |
| 19/10 | 8° | 7 | 0 | 3 | 6 | 0 |
| 20/10 | 9° | 2 | 0 | 7 | 9 | 3 |
| 21/10 | 10° | 0 | 1 | 7 | 5 | 1 |

| | | | | | | |
|-------|-------|----|----|----|----|----|
| 22/10 | 11° | 2 | 1 | 13 | 4 | 1 |
| 23/10 | 12° | 1 | 3 | 6 | 7 | 5 |
| 24/10 | 13° | 1 | 8 | 8 | 1 | 5 |
| 25/10 | 14° | 0 | 4 | 6 | 2 | 1 |
| | Total | 37 | 24 | 84 | 61 | 32 |

Tabela 7: 2ª Replicata (Infecção experimental – 21/10/19)

| Data | DPI | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN ST |
|-------|-------|------|------|--------------------------|-----------------------------|---------------|
| 22/10 | 1° | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23/10 | 2° | 0 | 3 | 4 | 2 | 3 |
| 24/10 | 3° | 2 | 11 | 16 | 1 | 6 |
| 25/10 | 4° | 1 | 14 | 17 | 9 | 0 |
| 26/10 | 5° | 6 | 8 | 10 | 5 | 1 |
| 27/10 | 6° | 3 | 6 | 19 | 10 | 10 |
| 28/10 | 7° | 4 | 4 | 10 | 6 | 3 |
| 29/10 | 8° | 0 | 4 | 6 | 4 | 6 |
| 30/10 | 9° | 1 | 2 | 10 | 1 | 6 |
| 31/10 | 10° | 1 | 1 | 7 | 2 | 10 |
| 01/11 | 11° | 0 | 0 | 8 | 6 | 12 |
| 02/11 | 12° | 1 | 1 | 5 | 4 | 8 |
| 03/11 | 13° | 0 | 0 | 6 | 4 | 9 |
| 04/11 | 14° | 1 | 2 | 5 | 3 | 7 |
| | Total | 21 | 56 | 123 | 57 | 81 |

Tabela 8: 3ª Replicata (Infecção experimental – 31/10/19)

| Data | DPI | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN |
|-------|-----|------|------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| 01/11 | 1° | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 02/11 | 2° | 2 | 2 | 6 | 1 | 2 |
| 03/11 | 3° | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 04/11 | 4° | 0 | 15 | 11 | 5 | 6 |
| 05/11 | 5° | 8 | 18 | 7 | 9 | 6 |
| 06/11 | 6° | 8 | 6 | 9 | 1 | 5 |
| 07/11 | 7° | 4 | 6 | 2 | 3 | 6 |
| 08/11 | 8° | 0 | 1 | 8 | 1 | 9 |
| 09/11 | 9° | 4 | 2 | 10 | 9 | 17 |
| 10/11 | 10° | 8 | 1 | 15 | 7 | 9 |
| 11/11 | 11° | 1 | 4 | 10 | 5 | 16 |
| 12/11 | 12° | 1 | 0 | 10 | 8 | 24 |
| 13/11 | 13° | 2 | 3 | 10 | 7 | 11 |
| 14/11 | 14° | 3 | 1 | 0 | 6 | 16 |
| total | | 43 | 61 | 98 | 64 | 128 |

Tabela 9: 4ª Replicata (Infecção experimental – 12/10/19)

| Data | DPI | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN |
|-------|-----|------|------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| 13/11 | 1° | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| 14/11 | 2° | 2 | 4 | 1 | 7 | 1 |
| 15/11 | 3° | 2 | 3 | 1 | 7 | 1 |
| 16/11 | 4° | 0 | 2 | 11 | 32 | 5 |
| 17/11 | 5° | 2 | 5 | 11 | 12 | 8 |
| 18/11 | 6° | 5 | 7 | 5 | 10 | 1 |
| 19/11 | 7° | 5 | 4 | 5 | 7 | 3 |
| 20/11 | 8° | 2 | 2 | 8 | 2 | 4 |
| 21/11 | 9° | 4 | 2 | 17 | 14 | 11 |
| 22/11 | 10° | 3 | 0 | 17 | 12 | 8 |
| 23/11 | 11° | 0 | 1 | 15 | 14 | 11 |
| 24/11 | 12° | 5 | 2 | 14 | 9 | 11 |
| 25/11 | 13° | 1 | 1 | 16 | 6 | 15 |
| 26/11 | 14° | 0 | 1 | 4 | 4 | 9 |
| Total | | 31 | 34 | 127 | 139 | 89 |

Tabela 10: Total (1^a, 2^a, 3^a e 4^a Replicata)

| Data | 20°C | 24°C | 28°C Mic ⁺ ST | 28°C Mic ⁻ ST | 28° SIN |
|-----------------------------|------|------|--------------------------|--------------------------|---------|
| 1 ^a Replicata | 37 | 24 | 84 | 61 | 32 |
| 2 ^a Replicata | 21 | 56 | 123 | 57 | 81 |
| 3 ^a Replicata | 43 | 61 | 98 | 64 | 128 |
| 4 ^a Replicata | 31 | 34 | 127 | 139 | 89 |
| Total | 132 | 175 | 432 | 321 | 330 |