



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**LUCAS MENDES FERREIRA**

**DENSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *ANOPHELES* (DIP-  
TERA: CULICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MA-  
LÁRIA EM SISTEMAS DE MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO ESPÍRITO  
SANTO, BRASIL**

Vitória  
2021

Lucas Mendes Ferreira

**DENSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *ANOPHELES* (DIP-  
TERA: CULICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MA-  
LÁRIA EM SISTEMAS DE MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO ESPÍRITO  
SANTO, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infeciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infeciosas.

Orientador: Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Blima Fux

**Vitória  
2021**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

F383d Ferreira, Lucas Mendes, 1995-  
Densidade e distribuição das espécies do gênero Anopheles  
(Diptera: Culicidae) e identificação dos agentes etiológicos da  
malária em sistemas de Mata Atlântica no estado do Espírito  
Santo, Brasil / Lucas Mendes Ferreira. - 2021.  
76 f. : il.

Orientador: Crispim Cerutti Junior.  
Coorientadora: Blima Fux.  
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Malária. 2. Bromélia. 3. Mosquitos. I. Cerutti Junior,  
Crispim. II. Fux, Blima. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Doenças Infeciosas**

**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**MESTRADO**

O(a) mestrando(a) Lucas Mendes Ferreira apresentou a Dissertação intitulada “DENSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO ANOPHELES (DIPTERA: CULICIDAE) E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MALÁRIA EM SISTEMAS DE MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infeciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infeciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (  ) aprovar (  ) reprovar a dissertação habilitando Lucas Mendes Ferreira a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infeciosas.

Vitória, 10 de agosto de 2021

Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Prof. Dr. Gabriel Zorello Laporta  
Centro Universitário Saúde ABC – Titular Externo

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira  
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Profª. Dra. Blima Fux  
Universidade Federal do Espírito Santo – Coorientadora

Lucas Mendes Ferreira  
Discente



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7504 |  
[www.doencasinfecciosas.ufes.br](http://www.doencasinfecciosas.ufes.br) | [ppgdi.ufes@gmail.com](mailto:ppgdi.ufes@gmail.com)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior pela dedicação, competência, paciência, pelas valiosas sugestões e estímulos dados e orientação inegavelmente eficiente e segura. Obrigado por acreditar em mim.

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Blima Fux, pela valiosa troca de conhecimento e colaboração.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa, em especial à Dra. Julyana Cerqueira Bury com quem sempre pude discutir sobre os assuntos que envolviam a dissertação. Suas sugestões e críticas possibilitaram aprimoramentos valiosos na execução deste trabalho.

À toda equipe do Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo (NEMES), em especial, Helder, Isaías e Marcelo pelo apoio técnico na captura e identificação dos anofelinos.

Ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/USP), em especial, à Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte e suas estudantes Thaysa e Aline, por me abrirem as portas, pela acolhida e pelo aprendizado em biologia molecular que tanto contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas pelo enriquecimento científico nas aulas ministradas durante o curso.

Ao amigo Jomar Júnior, pelos trabalhos e disciplinas que realizamos em conjunto. Obrigado pelo convívio, troca de conhecimento e vivências durante as horas intermináveis de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por ter financiado minha bolsa de estudos durante este período.

Ao Instituto Nacional da Mata Atlântica – INMA que nos forneceu hospedagem durante todos os meses de trabalho no campo.

Ao Instituto Nacional de Meteorologia – INMET por disponibilizar as informações climáticas das áreas de estudo.

Aos moradores das áreas de estudo que sempre nos acolheram tão bem. Em especial, à senhora Lúcia (sítio Recanto da Preguiça) em Santa Teresa e ao senhor Gilmar, morador da localidade de Alto Caparaó, em Itaguaçu.

À minha querida mãe, pelo incentivo e carinho de sempre.

À minha namorada Juliana, pelo apoio incondicional durante esses dois intensos anos de mestrado. Obrigado pela compreensão, pelo cuidado e pelo carinho.

A todos os meus familiares que estiveram sempre presentes na minha vida e que acreditaram em mim.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho e para a minha formação científica, minha gratidão.

*Voltei-me, e vi debaixo do sol que não é dos ligeiros a carreira, nem dos fortes a batalha, nem tampouco dos sábios o pão, nem tampouco dos prudentes as riquezas, nem tampouco dos entendidos o favor, mas que o tempo e a oportunidade ocorrem a todos.*

**Eclesiastes 9:11**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a abundância, a riqueza e a diversidade de anofelinos e detectar a infecção natural por *Plasmodium* spp. em espécimes do subgênero *Kerteszia* de duas áreas remotas de Mata Atlântica, localizadas no estado do Espírito Santo, para possibilitar uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão da malária na região. As coletas entomológicas foram realizadas uma vez por mês em cada localidade, no período de maio de 2019 a abril de 2020. Os mosquitos foram capturados por armadilhas de Shannon e armadilhas do tipo CDC. Os espécimes capturados foram identificados morfológicamente em nível de espécie por meio de chaves entomológicas. Após identificação, contagem e armazenamento, os anofelinos pertencentes ao subgênero *Kerteszia* foram agrupados em *pools* de até 10 indivíduos, segundo espécie, data, tipo de armadilha e local de coleta, e encaminhados ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para a detecção molecular da presença de DNA de *Plasmodium* spp. O Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ), o Índice de Dominância de Simpson ( $C$ ) e o Índice de Equabilidade de Pielou ( $J$ ) foram as medidas utilizadas para caracterizar e comparar a fauna anofélica das duas áreas exploradas. Foi capturado um total de 1.471 anofelinos pertencentes a três subgêneros e 13 espécies. A espécie mais abundante foi *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (87%), seguido por *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* (6%) e *Anopheles (Nyssorhynchus) evansae* (4,21%). A região de Valsugana Velha – onde casos de malária são notificados esporadicamente - foi responsável por maior abundância (1.438 espécimes) e maior riqueza (10 espécies). Pelas técnicas moleculares, foi confirmada a infecção natural de *A. (K.) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* por *Plasmodium* spp. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, por sua abundância, dispersão e registro de infecção natural, foi confirmado como a principal espécie envolvida na transmissão da malária em áreas de Mata Atlântica brasileira.

**Palavras-chave:** Malária; *Plasmodium*; Bromélia; *Anopheles*.



## ABSTRACT

The present study aimed to investigate the abundance, richness, and diversity of anophelines and detect the natural infection by *Plasmodium* spp. in specimens of the subgenus *Kerteszia* from two remote areas of the Atlantic Forest, located in the state of Espírito Santo, to better understand the transmission dynamics of the malaria in the region. The entomological collections were performed once a month, from May 2019 to April 2020. Mosquitoes were captured using two types of light traps, Shannon and CDC automatic. The specimens captured were morphologically identified at the species level using entomological keys. After identification, counting, and storage, anophelines belonging to the subgenus *Kerteszia* were pooled in groups of up to 10 specimens by species, date, trap type, and place of collection and sent to the Laboratory of Protozoology of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo for the molecular detection of the presence of *Plasmodium* spp. The Shannon-Wiener Diversity Index (H'), Simpson Dominance Index (C), and Pielou Equability Index (J) were the tools used to characterize and compare the anopheline fauna of the two explored areas. A total of 1,471 anophelines belonging to three subgenera and 13 species were captured. The most abundant species was *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (87%), followed by *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* (6%) and *Anopheles (Nyssorhynchus) evansae* (4.21%). The area of Valsugana Velha – where cases of malaria are reported sporadically – recorded greater abundance (1,438 specimens) and greater richness (10 species). Molecular techniques confirmed the natural infection of *A. (K.) cruzii* and *Anopheles (Kerteszia) homunculus* by *Plasmodium* spp. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, due to its abundance, dispersion, and record of natural infection confirmed that it is the main species involved in the transmission of malaria in areas of the Brazilian Atlantic Forest.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium*; Bromelia; *Anopheles*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado (homem) e invertebrado (inseto).

**Figura 2** – Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual, 2018.

**Figura 3** – Vista panorâmica da Serra de Cubatão (Santos), onde Lutz descobriu a malária silvestre.

**Figura 4** – Esquema de transmissão do ciclo hipotético da malária-bromélia no bioma de Mata Atlântica.

**Figura 5** – Localização geográfica das duas áreas de estudo no estado do Espírito Santo, Brasil.

**Figura 6** – Armadilhas instaladas no interior da floresta para captura de anofelinos. A- Armadilha luminosa do tipo “CDC” (Center for Disease Control); B- Armadilha de Shannon.

**Figura 7** – Diagrama de Venn representando espécies de anofelinos capturados em Valsugana Velha, Alto Caparaó e ambas as localidades. A: *Anopheles*; K: *Kerteszia*; N: *Nyssorhynchus*.

**Figura 8** – Distribuição de anofelinos por espécie, armadilha e local de coleta. (A) Valsugana Velha; (B) Alto Caparaó. A: *Anopheles*; K: *Kerteszia*; N: *Nyssorhynchus*

**Figura 9** – Variação sazonal das espécies de anofelinos capturadas na localidade de Valsugana Velha, ES, no período de maio de 2019 a abril de 2020.

**Figura 10** – Variação sazonal das espécies de anofelinos capturadas na localidade de Alto Caparaó, ES, no período de maio de 2019 a abril de 2020.

**Figura 11** – Detecção de infecção natural por *Plasmodium* spp. nos anofelinos de acordo com o mês de coleta entomológica.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Abundância de anofelinos de acordo com espécie, local de coleta e tipo de armadilha. *A.*: *Anopheles*; *K.*: *Kerteszia*; *N.*: *Nyssorhynchus*.

**Tabela 2** – Detecção de infecção natural de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) homunuculus (pools)* de acordo com localidade, armadilha, espécie de *Plasmodium* e data.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** – Sequência de *primers* utilizados para amplificar o gene 18S ssRNA de *Plasmodium* em *pools* de anofelinos no sistema PCR em Tempo Real (TaqMan).

**Quadro 2** – Correlação entre abundância e variáveis climáticas por espécie e localidade. *K: Kerteszia; N: Nyssorhynchus*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Aspectos gerais da malária .....	3
2.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp .....	3
2.2.1 Hospedeiro vertebrado.....	4
2.2.2 Hospedeiro invertebrado.....	6
2.3 Breve histórico epidemiológico da malária no Brasil .....	7
2.4 A Malária no estado do Espírito Santo .....	11
2.5 A Malária Residual de Sistemas de Mata Atlântica (Malária-Bromélia) .....	12
2.5.1 Malária Residual de Sistema de Mata Atlântica (Malária-Bromélia) e sua relação com a malária de primatas não-humanos. Uma zoonose?.....	15
2.6 <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> , o vetor primário da malária-Bromélia.....	19
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Objetivo geral .....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
<b>5 MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
5.1 Delineamento do estudo.....	24
5.2 Estratégias de captura.....	25
5.3 Armazenamento e identificação .....	26
5.4 Análise laboratorial .....	26
5.4.1 Extração de DNA de “pools” de anofelinos do subgênero <i>Kerteszia</i> .....	26
5.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) .....	27
5.5 Análise estatística.....	28
5.5.1 Índices ecológicos.....	29
5.5.2 Sazonalidade .....	29
5.5.3 Taxa Mínima de Infecção (TMI) .....	29
<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
7.1 Composição, abundância, riqueza e diversidade de espécies de anofelinos ....	32
7.2 Distribuição temporal e sazonalidade de anofelinos .....	35
7.3 Resultado da análise molecular para detecção de <i>Plasmodium</i> nos espécimes pertencentes ao subgênero <i>Kerteszia</i> .....	37
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>

<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>10 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Vetores (DTV) ainda hoje constituem um grave problema de saúde pública mundial. Responsáveis por 700.000 mortes anuais, as DTV juntas representam aproximadamente 17% de todas as doenças infecciosas no mundo (PAHO, 2018). A malária, doença parasitária de transmissão vetorial, é tida como uma das mais importantes, pois denota índices elevados de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (WHO, 2018). Segundo o relatório mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2019 foram notificados 229 milhões de casos de malária em todo mundo. Na região das Américas, nesse mesmo ano, foram registrados 723.025 casos da doença, sendo o Brasil responsável por 22% dos casos (WHO, 2020).

No Brasil, atualmente os casos autóctones de malária estão concentrados na região Amazônica, responsável por 99% das ocorrências de infecções. No entanto, na região extra-Amazônica – área considerada não endêmica - ainda há transmissão esporádica da doença em focos residuais, localizados ao longo da Mata Atlântica, em alguns estados do sul e sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Embora o país tenha alcançado um bom resultado na redução dos casos de malária nos últimos anos, a presença contínua de vetores e a infecção por *Plasmodium* spp., sobretudo nessas áreas florestais remotas, colocam em iminência o ressurgimento da doença em ambientes já controlados, podendo vir a ser consideradas ameaças ao plano de eliminação da doença no país (MULTINI et al., 2019).

Nesses pontos residuais, estudos epidemiológicos registram a infecção natural por *Plasmodium* spp. em humanos, macacos do gênero *Alouatta* e mosquitos do gênero *Anopheles* (CERUTTI JUNIOR, 2007; LAPORTA et al., 2015; DEMARI-SILVA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2020). Neste cenário de transmissão da malária na Mata Atlântica, a participação de primatas não-humanos (PNHs) no ciclo da doença tem sido estabelecida como hipótese. Ao contrário da situação observada na região Amazônica, na Mata Atlântica, o agente etiológico da malária parece circular naturalmente entre PNHs e humanos, com anofelinos infectados transmitindo ocasionalmente o protozoário ao homem. Este último, na maioria das vezes, apresenta um espectro clínico que varia de infecções assintomáticas a quadros leves (BUERY et al., 2021).

Neste sentido, sabendo da importância dos anofelinos como vetores da malária humana e símia nessas regiões florestais remotas, este estudo tem como objetivo

explorar a fauna anofélica de duas comunidades rurais localizadas na região centro serrana do estado do Espírito Santo para esclarecer incertezas epidemiológicas e melhor elucidar a dinâmica de transmissão em que ocorre a Malária Residual de Sistemas de Mata Atlântica (Malária-bromélia).



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Aspectos gerais da malária**

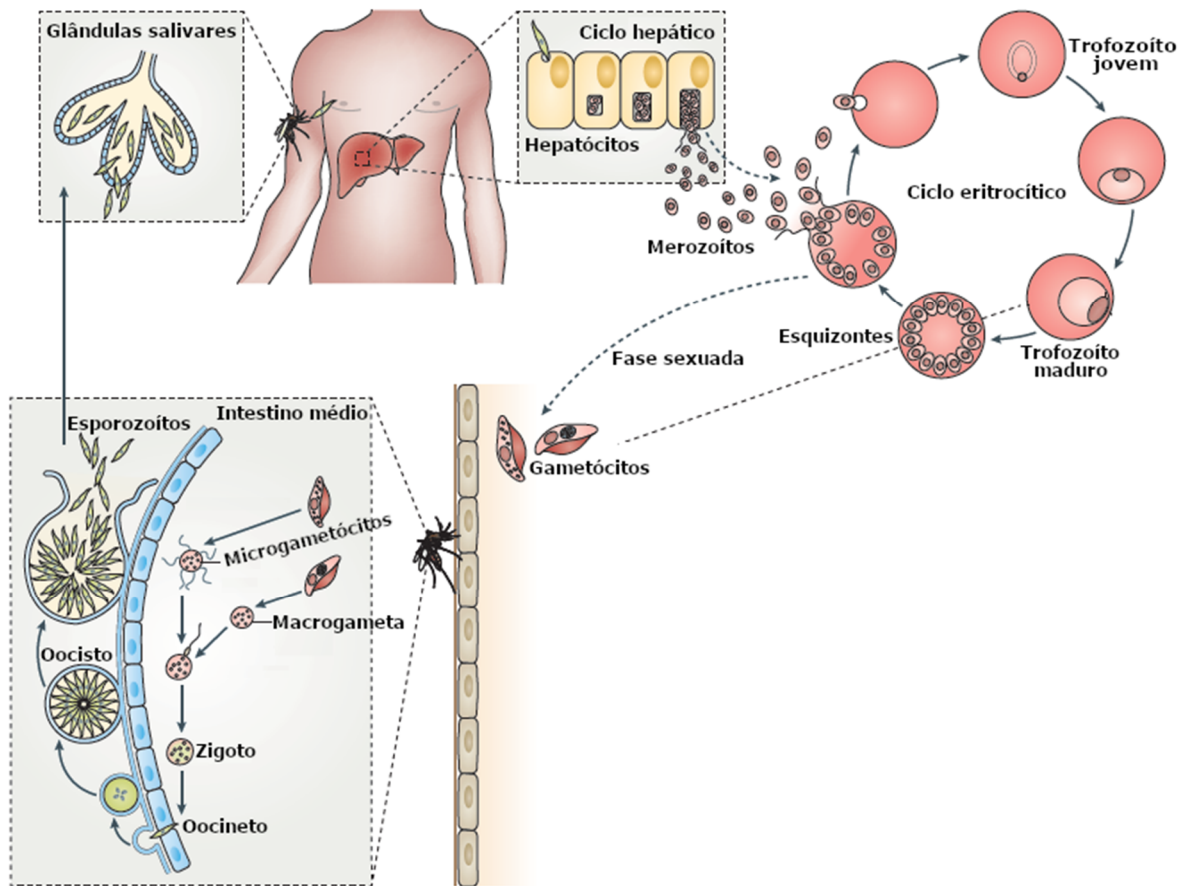
Considerada uma doença infecciosa de transmissão vetorial, a malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp., pertencentes ao filo Apicomplexa e à família Plasmodiidae. Estima-se que, no mundo, atualmente, haja mais de 120 espécies de *Plasmodium* com capacidade para parasitar uma grande variedade de hospedeiros, com destaque para aves, répteis, uma pluralidade de mamíferos (incluindo primatas não-humanos) e o homem (ASHLEY; PHYO; WOODROW, 2018).

Embora seja observada essa grande quantidade de espécies, somente seis apresentam relevância nas infecções em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri* (SUTHERLAND et al., 2010) e *Plasmodium knowlesi*, que tradicionalmente era relacionado à malária em PNH, sendo sua transmissão ao homem evidenciada a partir de 2004, o que fez com que passasse a ser considerada uma zoonose na região asiática (SINGH et al., 2004).

Das espécies mencionadas acima, duas têm importância particular. Considera-se *P. falciparum* o mais virulento e principal responsável pela maioria das mortes no mundo, sobretudo no continente africano, local de maior prevalência (WHO, 2015). Por sua vez, *P. vivax* é a espécie com maior amplitude geográfica e a principal responsável pelos casos de malária notificados no continente americano (75%) (WHO, 2019).

### **2.2 Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.**

Via de regra, o ciclo biológico do *Plasmodium* transcorre em duas etapas: uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado, e uma fase sexuada, que acontece no hospedeiro invertebrado, neste caso, exclusivamente, em fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (COWMAN; CRABB, 2006).



**Figura 1** – Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado (homem) e invertebrado (inseto).

Fonte: Adaptado Koning-Ward et al. (2016).

### 2.2.1 Hospedeiro vertebrado

A malária é transmitida ao hospedeiro vertebrado pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, previamente infectadas. Na ocasião, durante a hematofagia, esporozoítos armazenados nas glândulas salivares do mosquito são injetados na derme do hospedeiro (PONNUDURAI et al., 1991; MATSUOKA et al., 2002; VANDERBERG; FREVERT, 2004). Estima-se que, uma hora após a inoculação, aproximadamente 50% dos esporozoítos deixem a derme em direção à circulação sanguínea (~70%) e à circulação linfática (~30%). Grande parte dos esporozoítos é inativada na circulação linfática por células dendríticas, presentes nos linfonodos (AMINO et al., 2006).

Por sua vez, os esporozoítos da circulação sanguínea são conduzidos para o fígado, onde migram dos sinusóides hepáticos para os hepatócitos transpondo células endoteliais fenestradas e células de *Kupffer* (FREVERT et al., 2005; BAER et al., 2007; TAVARES et al., 2013). Algumas organelas secretoras e proteínas foram evidenciadas como extremamente necessárias para a conclusão desse processo migratório,

com destaque para proteínas de micronema, perforina e proteína circunsporozoíta, (ISHINO et al., 2004; USYNIN; KLOTZ; FREVERT, 2007; RISCO-CASTILLO et al., 2015). A entrada dos esporozoítos nos hepatócitos resulta na formação de vacúolos parasitóforos.

Situados no interior desses vacúolos parasitóforos previamente formados, esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, que logo multiplicam-se em esquizontes. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos podem originar hipnozoítos. No fígado, os hipnozoítos podem permanecer em latência por um período prolongado, provocando casos de recaída da malária nos pacientes (KROTOSKI, 1985). Os esquizontes maduros formam os merozoítos, que então provocam a morte dos hepatócitos e migram para os sinusóides hepáticos dentro de vesículas denominadas merossomos. Por não expressar em sua membrana externa resíduos de fosfatidilserina (sinalizador para fagocitose), os merossomos não são reconhecidos pelas células fagocitárias e, portanto, conduzem os merozoítos em segurança até a circulação sanguínea (STURM et al., 2006; BAER et al., 2007).

Na circulação sanguínea, os merozoítos saem dos merossomos para então invadir os eritrócitos circulantes. Uma variedade de receptores e ligantes está relacionada nesse processo. A invasão inicia-se com uma forte adesão do merozoíto à membrana plasmática do eritrócito. Logo após, observa-se uma reorientação dos merozoítos, de maneira que o seu complexo apical passa a interagir com a membrana eritrocítica de forma irreversível (DVORAK et al., 1975; GILSON; CRABB, 2009). Roptrias e micronemas – organelas encontradas na extremidade apical – viabilizam a formação do vacúolo parasitóforo e a internalização do protozoário.

No interior dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem por esquizogonia, formando novos merozoítos, que invadirão novamente outros eritrócitos. A sintomatologia e a fisiopatologia da malária decorrem principalmente dos consecutivos ciclos de replicação parasitária que acontecem no interior dos eritrócitos.

Após sucessivos ciclos eritrocíticos, uma pequena fração de merozoítos se diferencia em gametócitos, considerada a forma infectante para fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os mecanismos e processos que conduzem a transição do ciclo assexuado para o ciclo sexuado ainda são pouco compreendidos (BANNISTER; MITCHELL, 2003; TALMAN et al., 2004; BAKER, 2010; JOSLING; LLINÁS, 2015; NILSSON et al., 2015).

## 2.2.2 Hospedeiro invertebrado

O ciclo sexuado, que acontece no hospedeiro invertebrado, tem início após fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* realizarem repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado. Neste caso, gametócitos são ingeridos pelo inseto, infectando-o (BUSULA et al., 2017).

Ainda na primeira hora após a hematofagia, no lúmen do intestino médio do mosquito, os gametócitos recentemente ingeridos emergem do interior dos eritrócitos e passam pelo processo de formação dos gametas, conhecido como gametogênese. Nessa fase, gametas masculinos são submetidos a três sucessivos ciclos de replicação do DNA, originando oito microgametas móveis, também conhecidos como flagelos (JANSEN et al., 1988). A essa etapa, dá-se o nome de exflagelação, desencadeada por estímulos, como queda da temperatura (variação de 5°C), aumento do pH (variação entre 7,4-8,2), presença de ácido xanturênico (NIJHOUT; CARTER, 1978; BILLKER et al., 1998; BILLKER; MILLER; SINDEN, 2000; BHATTACHARYYA; KUMAR, 2001) e sinalização intracelular (proteína quinase dependente de monofostato cíclico de guanosina) (MCROBERT et al., 2008). Por sua vez, o gameta feminino converte-se em uma única célula, denominada macrogameta.

A união do microgameta ao macrogameta resulta na fecundação, seguida pela formação do zigoto. Um complexo de proteínas de adesão, expresso na superfície celular, pode corroborar o processo de fusão dos gametas (PRADEL et al., 2004; SIMON et al., 2009; SIMON et al., 2016). Em um curto intervalo de tempo (10-24h), o zigoto recém-formado se transforma em uma nova célula, conhecida como oocineto. Nesse estágio de remodelação celular, nota-se um processo de rearranjo citoplasmático, cuja finalidade é gerar estruturas e componentes que conferem ao oocineto a capacidade de se movimentar e penetrar em células e tecidos do hospedeiro (CANNING; SINDEN; 1973; DEARNLEY et al., 2012).

As formas evolutivas do protozoário têm o direcionamento para alcançar as glândulas salivares do mosquito, de forma a dar continuidade ao seu ciclo em um hospedeiro vertebrado. Por esse motivo, um processo de migração é iniciado. No lúmen do intestino médio, o oocineto gerado transpõe a matriz peritrófica com auxílio de quitinases (enzimas que catalisam a quebra da quitina) (VINETZ et al., 2000; LANGER et al., 2000). Logo em seguida, com a ajuda de organelas secretoras (microne-mas) e perfurinas (KADOTA et al., 2004; ECKER et al., 2007; DELIGIANNI et al.,

2018), o oocineto rompe a membrana celular das células intestinais, migra pelo seu citoplasma e alcança a lâmina basal, desenvolvendo-se em oocisto. As proteínas P25 e P28, encontradas na superfície celular do protozoário, interagem com lamininas (glicoproteínas), presentes na lâmina basal. Essa interação proteica parece estar envolvida no processo de formação e desenvolvimento do oocisto (TOMAS et al., 2001; SAXENA; WU; GARBOCZI, 2007).

Logo após a sua formação, o oocisto passa por algumas divisões mitóticas e subsequentes alterações morfológicas, que culminam na origem de milhares de esporozoítos. Estes esporozoítos são conduzidos pela hemolinfa até as glândulas salivares do mosquito. A proteína circunsporozoíta demonstrou ser essencial para formação, desenvolvimento (MÉNARD et al., 1997; THATHY et al., 2002) e invasão dos esporozoítos às glândulas salivares do inseto (KOJIN et al., 2016). Depois da invasão, em uma próxima hematofagia, os esporozoítos deverão ser inoculados pelo mosquito em um hospedeiro vertebrado.

### **2.3 Breve histórico epidemiológico da malária no Brasil**

Acredita-se que a malária foi introduzida na América do Sul após a colonização europeia e o tráfico de escravos, trazidos da África (FERREIRA PINTO, 1961; HUME; LYONS; DAY, 2003; YALCINDAG et al., 2012; RODRIGUES et al., 2018).

No Brasil, a primeira alusão à malária foi feita em referência ao ano de 1587, nos registros do livro “Tratado Descritivo do Brasil”, escrito pelo português Gabriel Soares de Sousa (DEANE, 1986). Tal obra abordara a situação em que viviam povos indígenas tupinambás, suscetíveis a algumas doenças, dentre elas, “febre terçã e quartã” (SOUSA, 1879), termo utilizado no passado, cuja aplicação clínica atual se refere à doença infecciosa febril aguda causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp., agente etiológico da malária.

No início do século XX (1900), estima-se que o Brasil registrava aproximadamente seis milhões de casos de malária por ano, afetando cerca de 50% da população do país naquele tempo (COURA; SUÁREZ-MUTIS; LADEIA-ANDRADE, 2006). Apesar disso, a situação ainda era estável.

Ocupações desordenadas da Região Amazônica favoreceram o aumento da transmissão da malária no Brasil. O primeiro grande surto da doença aconteceu entre os anos de 1840 e 1912. Devido aos impactos ocasionados pela Revolução Industrial,

iniciada na Inglaterra no século XVIII, a borracha tornou-se um produto natural de alto valor, principalmente para a indústria automobilística. Por esse motivo, a Região Amazônica (principal local de extração) passou por muitas mudanças territoriais e populacionais, resultando em elevação do número de casos de malária (CAMARGO, 2003).

A construção de estradas e ferrovias também ocasionou surtos da doença. Um exemplo foi a construção da famosa ferrovia Madeira-Mamoré. Com aproximadamente 366 km, a ferrovia foi utilizada como rota de escoamento da borracha. Durante o período de construção (1872-1912), muitos trabalhadores foram acometidos por malária e morreram. Nordestinos, imigrantes de outros estados brasileiros e estrangeiros, principalmente caribenhos, foram vítimas da enfermidade. Devido ao grande número de óbitos, a ferrovia Madeira-Mamoré ficou conhecida como a “ferrovia do diabo” (DEANE, 1986; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 1989).

No ano de 1930, a malária escreveu mais um capítulo na história brasileira. O *Anopheles gambiae*, espécie oriunda do continente africano, havia sido introduzido na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. A sua entrada no Brasil muito possivelmente foi facilitada por navios comerciais, que realizavam uma rota marítima entre Dakar (Senegal) e Natal (Rio Grande do Norte). Por ser considerado o principal transmissor da malária no continente africano, a presença deste terrível vetor rapidamente chamou a atenção das autoridades de saúde brasileiras (PINTO, 1939). Os esforços para combatê-lo não foram suficientes para impedir sua expansão. No estado do Ceará, o *Anopheles gambiae* desencadeou uma das maiores epidemias de malária já notificadas no continente (TAUIL et al., 1985). Neste tempo, a incidência da malária crescia exponencialmente no Brasil. Por causa disso, o governo federal efetivou um acordo de cooperação com a Fundação Rockefeller, investindo recursos financeiros em um programa de serviço de malária no Nordeste. Com o trabalho de aproximadamente quatro mil funcionários, em apenas dois anos (1940), o *Anopheles gambiae* foi completamente erradicado do Brasil (PINTO, 1939; SILVEIRA; REZENDE, 2001; CAMARGO, 2003).

Na década de 1940, o Brasil registrava cerca de cinco milhões de casos de malária por ano, em uma população de aproximadamente 55 milhões de habitantes (DEANE, 1986). Todos os estados brasileiros eram receptivos para a doença, com exceção do Rio Grande do Sul e da área que hoje corresponde ao Distrito Federal (PINOTTI, 1951). Devido à alta prevalência e à dispersão da malária no Brasil, criou-

se, ainda no início de 1940, três instituições que atuavam em diferentes regiões, buscando o controle e o combate da doença. Na região Amazônica, foi criado o Serviço Especial de Saúde Pública (SESP). Em São Paulo, foi o Serviço Estadual de Malária (SEM). Nas demais regiões, a responsabilidade pelo controle ficou para o Serviço Nacional de Malária (SNM) (SILVEIRA; REZENDE, 2001).

Em 1939, as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) foram descobertas. Devido à sua potente atividade e ao seu baixo custo, o DDT rapidamente tornou-se o inseticida mais utilizado no mundo, com aplicações na agropecuária e na saúde pública. O produto chegou ao Brasil no ano de 1945. A primeira utilização do inseticida como método de controle e erradicação vetorial teve como alvo o *Anopheles darlingi*. A ação aconteceu mais especificamente no estado do Pará. Com um desfecho positivo no controle da malária após seu uso, outros estados do Brasil também aplicaram o método, observando-se uma considerável diminuição na incidência da doença (DEANE et al., 1948; PINOTTI, 1951; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 1989).

Devido ao grande sucesso da aplicação do DDT no controle da malária em diversas regiões do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS), com apoio da Organização Panamericana de Saúde (OPS), lançou, no início da década de 60, o Programa de Erradicação da Malária, visando a combater o mosquito vetor, melhorar as condições sanitárias da população e tratar intensivamente os doentes. No Brasil, a Campanha de Erradicação da Malária (CEM) foi liderada pelo médico sanitário Mário Pinotti, que direcionou as atividades do programa para a priorização de duas medidas (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002; CAMARGO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006):

- controle dos anofelinos transmissores da malária pela aplicação do DDT no ambiente intradomiciliar;
- tratamento dos pacientes infectados por *Plasmodium* spp., buscando anular possíveis fontes de infecção.

Com a atividade da CEM, o Brasil logrou êxito em controlar a doença, mas falhou na missão de eliminá-la. A transmissão da malária, embora não extinta, havia sido interrompida em algumas regiões do Brasil (Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul). Em contrapartida, tal transmissão ficou confinada à Região Amazônica, tornando-a, ainda nos dias atuais, a principal área endêmica do país, responsável por mais de 99% dos casos (Figura 2). Os esforços empreendidos por intermédio da CEM tiveram, como efeito, o menor número de casos registrados, saindo-se dos quatro a

seis milhões, na década de 1940, para 52.469 casos em 1970 (DEANE, 1986; BARATA, 1995; SILVEIRA; REZENDE, 2001).

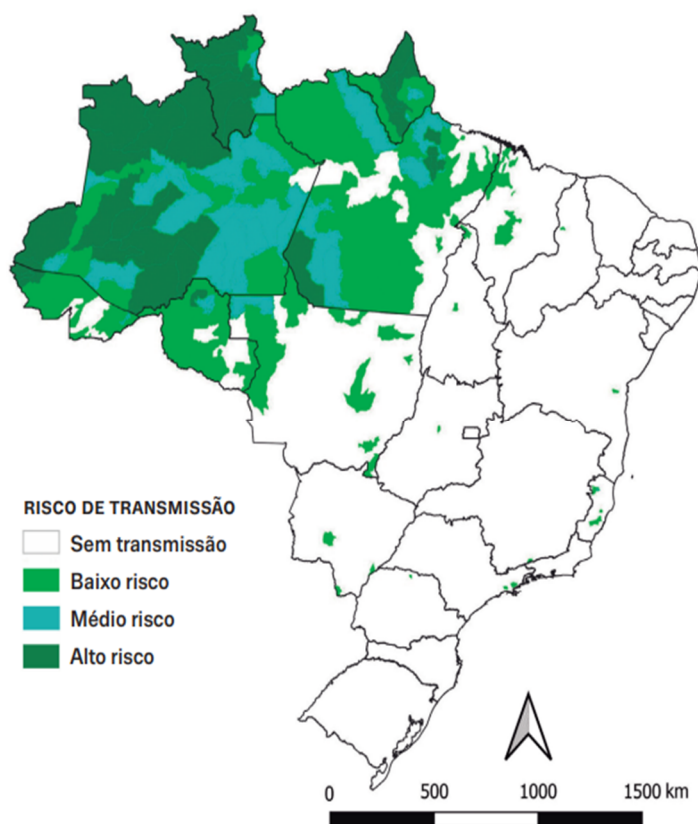
Os índices de malária cresceram novamente quando, ainda na década de 1970, o governo brasileiro criou o Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA). O INCRA tinha por finalidade abrir novos espaços produtivos, incentivando a colonização da Amazônia. Muitas famílias, de diferentes regiões do Brasil, migraram na tentativa de ganhar a vida por meio da agricultura de pequena escala. Acontece que, além da agricultura, os imigrantes viram a possibilidade de também trabalharem na construção de barragens e estradas e na abertura de minas e garimpos. Estimase que, nesse período, a Amazônia recebeu cerca de um milhão de imigrantes e, como consequência, sofreu um aumento exponencial no número de casos de malária, saindo de 52.479 para aproximadamente 570.000 em 1989 (DEANE, 1986; MARQUES, 1987; BARATA, 1995; TAUIL; DANIEL-RIBEIRO, 1998).

Em 1999, foram registrados 637.472 casos, o maior número desde que políticas de saúde passaram a ser aplicadas com maior intensidade. Devido à condição socioeconômica da região, à imigração em massa e ao ambiente propício para permanência e proliferação do vetor (*Anopheles*), os estados que compõem a região Amazônica se tornaram maioria na notificação dos casos (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002; LADISLAU; LEAL; TAUIL, 2006).

Em 2001, foram registrados 389.762 casos, uma redução de 39% em comparação ao ano de 1999. Seguramente, a expansão e a melhoria do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) resultaram na diminuição do número de novos casos (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002). Entre os anos de 2003 e 2005, observou-se novamente um aumento considerável na transmissão da malária na região Amazônica, chegando-se ao número de 607.782 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Há algumas razões que justificam o rápido aumento no número de registros, como: alterações climáticas que podem ter favorecido o aumento da população vetorial, expansão da agropecuária e da agricultura e, conseqüentemente, o aumento do desmatamento, além do fluxo migratório constante (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; GRIFFING et al., 2015; LAPOUBLE; SANTELLI; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2015). De 2008 até os dias atuais, o número de casos de malária tem apresentado certa estabilidade. Nesses anos, o Brasil registrou a maior frequência em 2010 (334.686 casos notificados) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) e a menor em 2016 (129.246)



(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). No ano de 2019, foram registrados 157.068 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).



**Figura 2** – Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual, 2018.  
Fontes: Ministério da Saúde, 2020.

## 2.4 A malária no estado do Espírito Santo

Localizado na região Sudeste do Brasil e com uma área territorial de 46.074,444 km<sup>2</sup> (IBGE, 2019), o Espírito Santo está entre os estados da região extra-Amazônica com maior número de casos de malária. Entre os anos de 2007 e 2018, foram notificados 473 casos autóctones da doença no estado, dos quais 68,7% foram ocasionados por *P. vivax* e 30,3% por *P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Ressalta-se que a transmissão do *P. falciparum* no Espírito Santo decorre de surtos que acontecem no norte do estado. Por critérios epidemiológicos, esses casos são classificados como autóctones, porém, sua origem é principalmente da região Amazônica, onde a espécie circula com maior frequência.

O dois perfis de transmissão da malária observados no Espírito Santo se associam aos dois diferentes aspectos geográficos do estado. Ao norte do leito do Rio Doce, as áreas preservadas de Mata Atlântica são menores, o clima é mais quente e

os relevos mais suaves. Nessas regiões, notificam-se os casos de malária importada, geralmente trazidos por indivíduos da região Amazônica ou por imigrantes, especialmente africanos (SESA, 2018). *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* e *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* são os principais vetores da malária no norte do estado e nas áreas próximas à costa litorânea, respectivamente (MENEGUZZI et al., 2009).

Ao sul do leito do Rio Doce, nota-se uma maior preservação da Mata Atlântica, o clima é mais frio e os relevos são mais acidentados. Nas áreas montanhosas que guardam proximidade com a floresta, encontram-se os casos autóctones da malária-bromélia, identificada no estado desde 1976 (SESA, 2018) e comumente registrada nos municípios de Alfredo Chaves, Domingos Martins, Marechal Floriano, Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa, Vargem Alta e Venda Nova do Imigrante. De acordo com Cerutti Junior et al. (2007), nesses locais, a malária manifesta-se com notável distanciamento espacial e intervalo temporal entre os casos, que são por vezes assintomáticos. Entre os afetados, a maioria são jovens do sexo masculino com atividades ligadas ao ambiente rural. *Plasmodium vivax* e *P. malariae* são as espécies predominantes.

Com relação ao vetor, o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar e Knab, 1908, identificado pela primeira vez no Espírito Santo em 1947 (ANDRADE; BRANDÃO, 1957), está adaptado ao bioma de Mata Atlântica e é o transmissor da malária-bromélia, sendo encontrado naturalmente infectado por *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* em diferentes ocasiões (REZENDE et al., 2009; REZENDE et al., 2013; BUERY et al., 2018). Sua distribuição no estado parece ser restrita à região serrana, que tem altitude de aproximadamente 800 metros e temperatura média de 17°C (REZENDE; CERUTTI JUNIOR; SANTOS, 2005).

## **2.5 A Malária Residual de Sistemas de Mata Atlântica (Malária-Bromélia)**

A malária residual de sistemas de Mata Atlântica, que a princípio foi denominada malária silvestre (LUTZ *apud* PITTENDRIGH, 1948; BENCHIMOL; SÁ, 2005), ficou também conhecida como complexo malária-bromélia (DOWNS; PITTENDRIGH, 1946). Isso ocorreu porque mosquitos vetores do gênero *Anopheles*, subgênero *Kerteszia*, utilizam água retida nos verticilos das bromélias para sua reprodução.

Descrita pela primeira vez em 1898 por Adolfo Lutz, a malária-bromélia foi descoberta na região serrana de São Paulo (Figura 3) durante a construção de uma ferrovia (FONSECA; CORRÊA, 1941; RACHOU, 1966). Os casos de malária ali observados manifestavam-se com diferenças clínicas e epidemiológicas quando comparados ao padrão da doença até então conhecido. A malária na Serra de Cubatão clinicamente apresentava-se sem maiores complicações, de caráter benigno, diferindo do habitual para a doença, em que os acometidos apresentavam sintomatologia mais acentuada. Do ponto de vista epidemiológico, por via de regra, a malária ocorria em região de planície e vale. Porém, desta vez, observava-se a manifestação da doença em uma região serrana, recoberta por um bioma de Mata Atlântica (LUTZ *apud* BENCHIMOL; SÁ, 2005).



**Figura 3** – Vista panorâmica da Serra de Cubatão (Santos), onde Lutz descobriu a malária silvestre.

Fonte: Adolpho Lutz adaptado Benchimol; Sá, (2005).

Tendo em vista os aspectos intrigantes daquela epidemia, em ambiente distinto do comum, Adolfo Lutz passou algumas noites na região promovendo observações e, como resultado, o pesquisador registrou em seu relatório:

Logo na primeira noite, que sucedeu a um dia muito quente, surgiram, enquanto estávamos sentados junto a um lampião, numerosos insetos picadores. Incluíam o *Simulium pertinax* Kollar, alguns culicídeos, mais ou menos banais e meus conhecidos, e uma espécie que ainda não vira, caracterizada pelas asas maculadas e pela posição perpendicular esquisita que tomava ao sugar. Apesar da sua delicadeza e tamanho diminuto, deu provas de ser um sugador de sangue voraz, pousando sem hesitação alguma nas pessoas presentes e num cãozinho que também ali se achava, sem fazer zumbido prévio. As picadas desse mosquito são menos dolorosas que as de algumas outras espécies. Devido a estas circunstâncias, deixam de ser sentidas por certas pessoas de modo que a espécie, que voa principalmente durante o crepúsculo, passa facilmente desapercibida. Tive imediatamente a certeza de ter

encontrado o mosquito que procurava, muito embora naquela época ainda não fossem conhecidos os característicos dos transmissores da malária. Ao ser descoberto, pouco depois, que estes deveriam ser procurados entre as espécies do gênero *Anopheles*, vi com satisfação que a nova espécie era, de fato, um *Anopheles* (LUTZ apud BENCHIMOL; SÁ, 2005).

A nova espécie descrita era um anofelino, com hábito desconhecido, em um ambiente inabitual a casos de malária. Portanto, tornou-se um desafio estabelecer o local em que ele possivelmente se reproduzia. Adolfo Lutz conhecia estudos, como o do pesquisador Friendenreich, que descreveram a presença de coleópteros em bromélias brasileiras (FRIENDENREICH, 1883). As bromélias estavam presentes na região da Serra de Cubatão. Por isso, Adolfo Lutz se dispôs a examiná-las. Larvas da nova espécie de *Anopheles* foram encontradas (LUTZ apud BENCHIMOL; SÁ, 2005). Em 1908, algumas alterações taxonômicas foram propostas e o *Anopheles*, encontrado por Adolfo Lutz foi denominado *A. (K.) cruzii* (DYAR; KNAB, 1908).

Apesar de ter sido uma importante descoberta para a época, as observações registradas na Serra de Cubatão (São Paulo) foram consideradas limitadas e restritas à região.

Como na época em que Lutz fizera tal verificação ( \* ) nada era conhecido no tocante ao mecanismo transmissor da infecção palúdica, pois os estudos de Ross e da Escola Italiana só em 1899 fixara a importância do papel dos anofelinos, conclui-se que Lutz foi o primeiro a determinar que a malária era transmitida por um anofelino (FONSECA; CORRÊA, 1941).

Knab não acreditava na transmissão da malária por mosquitos silvestres e achava que a epidemia estudada por Lutz na Serra de Cubatão não passava de uma simples “epidemia de recaídas” desencadeadas pelo excesso de trabalho dos operários já portadores da infecção malária (RACHOU, 1966).

Somente alguns anos depois é que mais investigações entomológicas foram realizadas. Os resultados obtidos das novas pesquisas validaram as observações de Adolfo Lutz, confirmando a capacidade e a potencialidade de alguns anofelinos (subgênero *Kerteszia*) em transmitir a malária em regiões de Mata Atlântica (DAVIS, 1926; FONSECA; CORREA, 1941; ANDRADE; BRANDÃO, 1957; DEANE; DEANE; FERREIRA NETO, 1966; RACHOU, 1966; DEANE et al., 1968).

Em 1951, a malária-bromélia era incidente na região costeira dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, colocando, em zona de risco, aproximadamente 1.000.000 de pessoas (PINOTTI, 1951; RACHOU, 1958). A cidade de Florianópolis registrava casos recorrentes da doença, veiculada por anofelinos do subgênero *Kerteszia*. Para combater os insetos vetores, um esquema de destruição das bromélias foi adotado. Estimou-se a remoção de aproximadamente 20 milhões de bromélias. Com o esgotamento dos criadouros do mosquito, a malária foi eliminada

da capital do estado de Santa Catarina (RACHOU, 1952). Apesar do resultado positivo, não foi possível reproduzir o método de destruição das bromélias em todas as regiões de Mata Atlântica. Acidentes geográficos e o difícil acesso ao interior da floresta foram alguns dos fatores que inviabilizaram a replicação da técnica (PINOTTI, 1951; RACHOU; FERREIRA, 1966).

Nas últimas décadas, os casos autóctones observados em regiões de Mata Atlântica têm sido caracterizados por distância espacial e temporal entre si (CERUTTI JUNIOR, 2007), com baixa incidência, leve parasitemia ao exame microscópico e comportamento assintomático ou oligossintomático (CURADO et al., 1997; CERUTTI et al., 2007). Atualmente, a malária-bromélia é responsável por 0,05% dos casos no Brasil, ocorrendo em regiões recobertas por Mata Atlântica, localizadas ao longo do sul e do sudeste da costa litorânea (Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo). *Plasmodium vivax*, *P. malariae* (PINA-COSTA et al., 2014) e *P. falciparum* (MASELLI et al., 2014) são os agentes etiológicos encontrados nessas regiões. Em relação aos anofelinos, atribui-se principalmente às fêmeas de *A. (K.) cruzii* a função vetorial (RACHOU, 1966; DEANE, 1986; DUARTE et al., 2013; DEMARI-SILVA et al., 2020).

### **2.5.1 Malária Residual de Sistema de Mata Atlântica (Malária-Bromélia) e sua relação com a malária de primatas não-humanos. Uma zoonose?**

Como já mencionado, a malária-bromélia dispõe de características particulares, que não correspondem às do ciclo de transmissão tradicional da doença, fundamentado na relação hospedeiro-vetor-hospedeiro. Com poucas notificações ao longo dos últimos anos, autores discutem de que maneira o parasito ainda se mantém circulante na região de Mata Atlântica. Atualmente, acredita-se que símios infectados contribuem para a dinâmica da transmissão, presumindo-se que eles possam atuar como reservatórios do parasito, mantendo, desta forma, sua circulação nesses ambientes (ALENCAR et al., 2018; MIGUEL et al., 2019).

No Brasil, *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium* parecem ser as únicas espécies responsáveis por manter a malária em símios do Novo Mundo. O *P. brasilianum* é encontrado na Região Amazônica e na Região de Mata Atlântica do sul e sudeste, infectando pelo menos 11 gêneros de primatas neotropicais, divididos em cinco famílias (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Phiteciidae). O *P. simium*,

por sua vez, é restrito apenas às regiões Sul e Sudeste, infectando primatas dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Sapajus* e *Brachyteles* (DEANE, 1972; DEANE, 1992).

Na Mata Atlântica brasileira, primatas do gênero *Alouatta* se destacam como potenciais reservatórios para malária humana. Estudos sobre a malária símia, realizados por Deane (1972), revelaram uma maior frequência de infecção para *P. brasilianum* e *P. simium* nos primatas pertencentes a este gênero. Resultados semelhantes foram encontrados por Duarte et al. (2008), com PNH do gênero *Alouatta* identificados com maior prevalência para malária. Abreu et al. (2019) investigaram infecções por *Plasmodium* spp. em PNH distribuídos em regiões de Mata Atlântica nos estados do Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os autores observaram que, dentre as seis espécies de símios analisadas, somente *Alouatta guariba clamitans* havia sido infectado pelo parasito da malária. Recentemente, Monteiro et al. (2020) realizaram uma ampla investigação epidemiológica para detectar anticorpos contra antígenos plasmodiais em símios distribuídos em diferentes regiões do Brasil. Na Mata Atlântica, novamente, somente os primatas do gênero *Alouatta* apresentaram soropositividade.

Ainda no Brasil, *P. vivax* e *P. malariae* são responsáveis por causar a malária humana nas regiões de Mata Atlântica do sul e sudeste, onde verifica-se a ocorrência da malária-bromélia (PINA-COSTA et al., 2014). Estes parasitos possuem alta semelhança morfológica, imunológica e genética com *P. brasilianum* e *P. simium* (COCHRANE et al., 1985; BARNWELL, 1986; ESCALANTE; BARRIO; AYALA, 1995; LIM; TAZI; AYALA, 2005), sendo consideradas, por muitos autores, como espécies idênticas em hospedeiros diferentes.

Deane, Deane e Ferreira Neto (1966), pesquisando a malária símia no Horto Florestal da Cantareira (São Paulo), foram alguns dos primeiros a conjecturar a possibilidade de zoonose, após constatar que um dos colaboradores de seu trabalho havia sido naturalmente infectado por *P. simium* enquanto realizava capturas de *A. (K.) cruzii*. De acordo com Deane (1992), há possibilidade de a malária ser uma zoonose em algumas regiões particulares do Brasil se:

- o homem for suscetível aos parasitos símios;
- os seres humanos viverem dentro ou perto de florestas habitadas por PNH infectados;
- vetores suscetíveis tiverem a oportunidade de frequentemente se alimentarem de ambos, macacos e homem.

A literatura relata numerosos casos de indivíduos que foram infectados experimentalmente, naturalmente ou acidentalmente, desde 1960, por diferentes espécies de *Plasmodium* spp. que acometem tradicionalmente símios, a citar: *Plasmodium cynomolgi* (COATNEY et al., 1961), *P. brasilianum* (CONTACOS et al., 1963), *Plasmodium knowlesi* (CHIN et al., 1965), *Plasmodium inui* (COATNEY et al., 1966) e *Plasmodium schwetzi* (CONTACOS et al., 1970).

Recentemente, Brasil et al. (2017) conduziram um estudo epidemiológico na região de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, onde foram notificados, entre os anos de 2015 e 2016, 49 casos de malária autóctone. As análises moleculares apontaram *P. simium* como principal agente causador da malária em humanos e símios naquela região. Sequenciou-se o genoma mitocondrial do parasito, isolado das amostras obtidas durante o estudo. O resultado sugeriu a identificação de *P. simium* com base em sequências depositadas no *GenBank*. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) identificados nas posições 3535 (T -> C) e 3869 (A -> G) foram utilizados como argumento, pelos autores, para propor uma diferenciação entre *P. simium* e *P. vivax*.

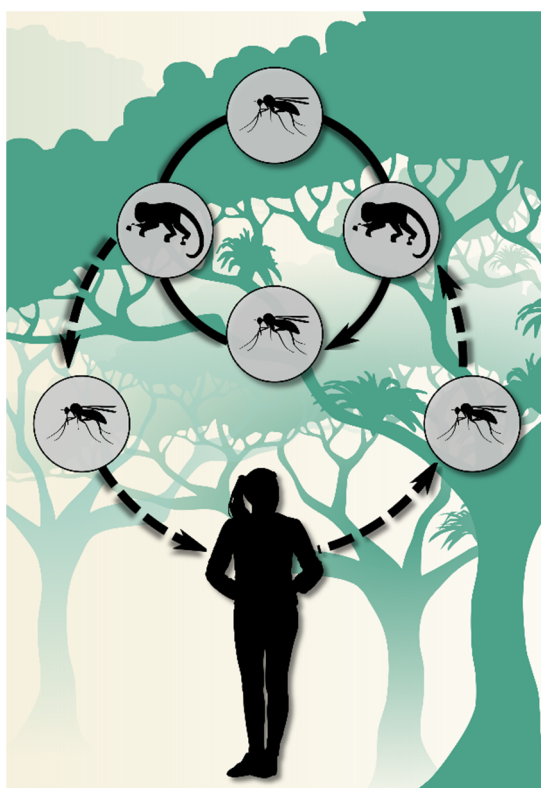
Buery et al. (2017) analisou o genoma mitocondrial completo de *Plasmodium vivax/simum*. Duas redes de haplótipos foram construídas. Uma das redes possuía 29 amostras (22 de humanos, uma de um símio do gênero *Alouatta* e seis de mosquitos vetores do gênero *Anopheles* spp.), exclusivas do ambiente de Mata Atlântica do Espírito Santo. Com as amostras obtidas dos 22 humanos, constatou-se a formação de sete diferentes haplótipos. Dois desses haplótipos de origem humana eram compatíveis com amostras de símios, indicando uma possível transferência dos parasitos entre ambos os hospedeiros. Apesar disso, os SNPs propostos por Brasil et al. (2017) não foram suficientes para diferenciar *P. vivax* de *P. simium*, pois não se mostraram estáveis nos diversos haplótipos, havendo mistura nas sequências.

A identidade genética entre plasmódios humanos e simianos vem sendo reforçada ao longo dos anos. A análise dos genes *Csp* (Proteína Circunsporozoíta) (GOLDMAN et al., 1993; ESCALANTE et al., 1995; LIM; TAZI; AYALA, 2005), *Cytb* (Citocromo B) (ESCALANTE et al., 1998), *MSP-1* (Proteína 1 da superfície de merozoíto) (TAZI; AYALA, 2011), além de polimorfismos de microssatélite (LECLERC et al., 2004), evidenciaram uma alta relação de similaridade entre *P. vivax* e *P. simium*. O mesmo acontece com *P. malariae* e *P. brasilianum*. Neste caso, a similaridade observada entre as espécies ocorre em função do gene *Csp* (LAL et al., 1988), SSU rRNA

(FANDEUR et al., 2000), 18S DNAr (FUENTES-RAMÍREZ et al., 2017), além da genotipagem de microssatélites (GUIMARÃES et al., 2012).

A malária símia e a malária-bromélia, além de compartilharem a semelhança entre seus respectivos agentes etiológicos, compartilham também um mesmo vetor, (DEANE; DEANE; FERREIRA NETO, 1966; DEANE et al., 1971), o que viabiliza, ainda, mais um possível cenário de transferência do parasito entre os hospedeiros.

Variações no comportamento do *A. (K.) cruzii* foram observadas em zonas de transmissão das malárias símia e humana no Brasil (DEANE et al., 1971). Nas regiões onde este inseto é definitivamente acrodendrofílico, ou seja, onde sua presença ocorre majoritariamente na copa das árvores, constatam-se taxas significativas de macacos infectados e ausência ou casos raros de malária humana. Ao contrário, nas regiões onde comporta-se de maneira mais versátil, circulando tanto na copa das árvores quanto no solo, é possível que se tenha um número maior de casos humanos. Essa movimentação vertical possibilita à espécie se alimentar tanto de PNH como de humanos, possivelmente favorecendo o compartilhamento de plasmódios entre ambos (DEANE; FERREIRA NETO; LIMA, 1984) (Figura 4).



**Figura 4** – Esquema de transmissão do ciclo hipotético da malária-bromélia no bioma de Mata Atlântica.

Fonte: Buery et al., 2021.



## 2.6. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, o vetor primário da malária-bromélia

Mosquitos do gênero *Anopheles* compreendem hoje cerca de 465 espécies. Dessas, somente 70 são reconhecidas como importantes na transmissão da malária (SINKA et al., 2012). No Brasil, várias espécies de *Anopheles* são conhecidas. Os principais transmissores da malária no país pertencem ao subgênero *Nyssorhyncus* e ao subgênero *Kerteszia*.

*Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1908 é considerado o principal vetor da malária símia e da malária-bromélia no Brasil. Sua distribuição geográfica abrange o litoral brasileiro, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (COUTINHO; RACHOU; FERREIRA, 1944; DEANE; DEANE; FERREIRA NETO 1965; DEANE et al., 1971).

Assim como as demais espécies do subgênero *Kerteszia* (exceto *Anopheles bambusicolus* Komp, 1937), *A. (K.) cruzii* utiliza a água retida nos verticilos das bromélias epífitas ou terrestres para sua reprodução. Por depender desse meio para o desenvolvimento de suas formas imaturas, as fêmeas desta espécie geralmente priorizam lugares úmidos e sombreados, de maneira que a evaporação da água ocorra de forma mais lenta. Sua densidade populacional está diretamente relacionada à abundância de bromélias (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em condições laboratoriais, o ciclo de vida desta espécie – do ovo até a fase adulta – durou aproximadamente 35 dias (WILKERSON; PEYTON, 1991). A longevidade natural de um adulto foi estimada entre 35 e 56 dias (FERREIRA et al., 1969).

A população de *A. (K.) cruzii* encontra-se predominantemente nas regiões de Mata Atlântica. Neste ambiente, a espécie manifesta um comportamento acrodendrofílico. O termo acrodendrofilia diz respeito à tendência que alguns mosquitos silvestres possuem de desempenhar suas atividades (reprodução, alimentação/hematofagia) próximas à copa das árvores (GARNHAM; HARPER; HIGHTON, 1946). Diferentes estudos obtiveram resultados que atestaram esse comportamento no *A. (K.) cruzii*, confirmando sua preferência em viver na copa das árvores, se reproduzir nos verticilos de bromélias epífitas (preferível) e se alimentar em símios e pássaros (FORATTINI; LOPES; RABELLO, 1968; DEANE et al., 1971; GUIMARÃES; ARLÉ; MACHADO, 1987; UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007; REZENDE et al., 2009; BUERY et al., 2018). No entanto, variações comportamentais podem ocorrer. Eventualmente, *A. (K.) cruzii* pode ser encontrado circulando no solo (DEANE et al., 1971) ou no ambiente domiciliar, próximo de áreas florestais, em busca de fontes sanguíneas (FORATTINI

et al., 1990; GUIMARÃES et al., 2000). Sua permanência no ambiente antrópico condiciona-se apenas ao tempo de hematofagia, ratificando seu comportamento assinantrópico e sua forte relação com o meio silvestre (FORATTINI et al., 1993; GUIMARAES et al., 2003).

As variações comportamentais de *A. (K.) cruzii*, observadas em diferentes regiões do Brasil podem, em parte, ser explicadas por fatores ambientais. Estudos recentes mostram que alterações ambientais antrópicas podem exercer impacto sobre a população dessa espécie, ocasionando a diminuição da sua densidade vetorial e provocando alterações fenotípicas (MULTINI; WILKE; MARRELLI, 2019) e comportamentais (dispersão vertical e acrodendrofilia) (CHAVES et al., 2016; MEDEIROS-SOUSA et al., 2019). Além disso, *A. (K.) cruzii* pode compor um complexo de espécies crípticas, com subgrupos ocorrendo em diferentes regiões de Mata Atlântica do Brasil (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2010; RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO 2013; DIAS et al., 2018; KIRCHGATTER et al., 2020). Entende-se, como espécies crípticas, duas ou mais espécies diferentes em termos genéticos, mas morfologicamente iguais, tradicionalmente classificadas como uma única espécie (PFENNINGER; SCHWENK, 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

A transmissão residual da malária na região extra-Amazônica foi considerada interrompida nas regiões Sul e Sudeste do Brasil na década de 1960, após intensa campanha de combate vetorial. Todavia, casos humanos autóctones ainda são notificados esporadicamente todos os anos nessas regiões, sobretudo nas áreas de Mata Atlântica. Neste bioma, um conjunto de fatores ecológicos como, clima e vegetação, propiciam a formação de criadouros permanentes para anofelinos, o que favorece a transmissão residual da doença e dificulta, por exemplo, a implementação de procedimentos padronizados de controle.

Questões sobre a dinâmica de transmissão da malária-bromélia (residual) ainda precisam ser esclarecidas. As características epidemiológicas observadas nas regiões de ocorrência diferem suficientemente daquelas observadas na região Amazônica. A existência de uma cadeia de transmissão tradicional, fundamentada na relação hospedeiro-vetor-hospedeiro tem sido questionada. A presença de um possível reservatório não humano do parasito na Mata Atlântica é considerada. Atualmente, acredita-se que PNH possam cumprir este papel. Esta hipótese, apesar de ser factível, ainda não é bem esclarecida.

Recentemente, um surto de febre amarela silvestre reemergiu nas áreas de Mata Atlântica do sul e sudeste do país e foi responsável por inúmeras epizootias, principalmente nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Os primatas não-humanos do gênero *Alouatta* sp. – apontados como principais reservatórios da malária humana e símia na Mata Atlântica – são os mais suscetíveis ao vírus da febre amarela (VASCONCELOS, 2003; MARES-GUIA et al., 2018) e, por ocasião do surto, estiveram entre os mais afetados, com registro de elevada mortalidade. Nesse contexto, assumindo a hipótese da participação de PNH no ciclo de transmissão da malária-bromélia, a sua redução populacional deveria esgotar a fonte de infecção, principalmente para os anofelinos do subgênero *Kerteszia* e, em decorrência disso, exercer impacto na cadeia de transmissão da doença.

Em virtude dos fatos mencionados, os anofelinos tornam-se importantes indicadores biológicos da malária na Mata Atlântica. Analisar sua diversidade, distribuição, abundância e infectividade nesse momento, em que a população de PNH do gênero *Alouatta* – apontados como potenciais reservatórios – encontra-se reduzida, poderá definir melhor a atuação e a influência dos possíveis hospedeiros/reservatórios

e, com isso, esclarecer incertezas epidemiológicas e melhor elucidar a dinâmica de transmissão da malária-bromélia.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a dinâmica de transmissão da Malária Residual de Sistemas de Mata Atlântica em áreas rurais do estado do Espírito Santo a partir da população de culicídeos do gênero *Anopheles*.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar a composição da fauna anofélica nas áreas exploradas;
2. Comparar abundância, riqueza e distribuição de espécies de anofelinos entre as áreas consideradas de alto e baixo risco para malária residual;
3. Verificar a infecção natural por protozoários do gênero *Plasmodium* nas fêmeas de mosquitos do subgênero *Kerteszia* coletadas;
4. Identificar as diferentes espécies de *Plasmodium* circulantes nas fêmeas de anofelinos pertencentes ao subgênero *Kerteszia*.

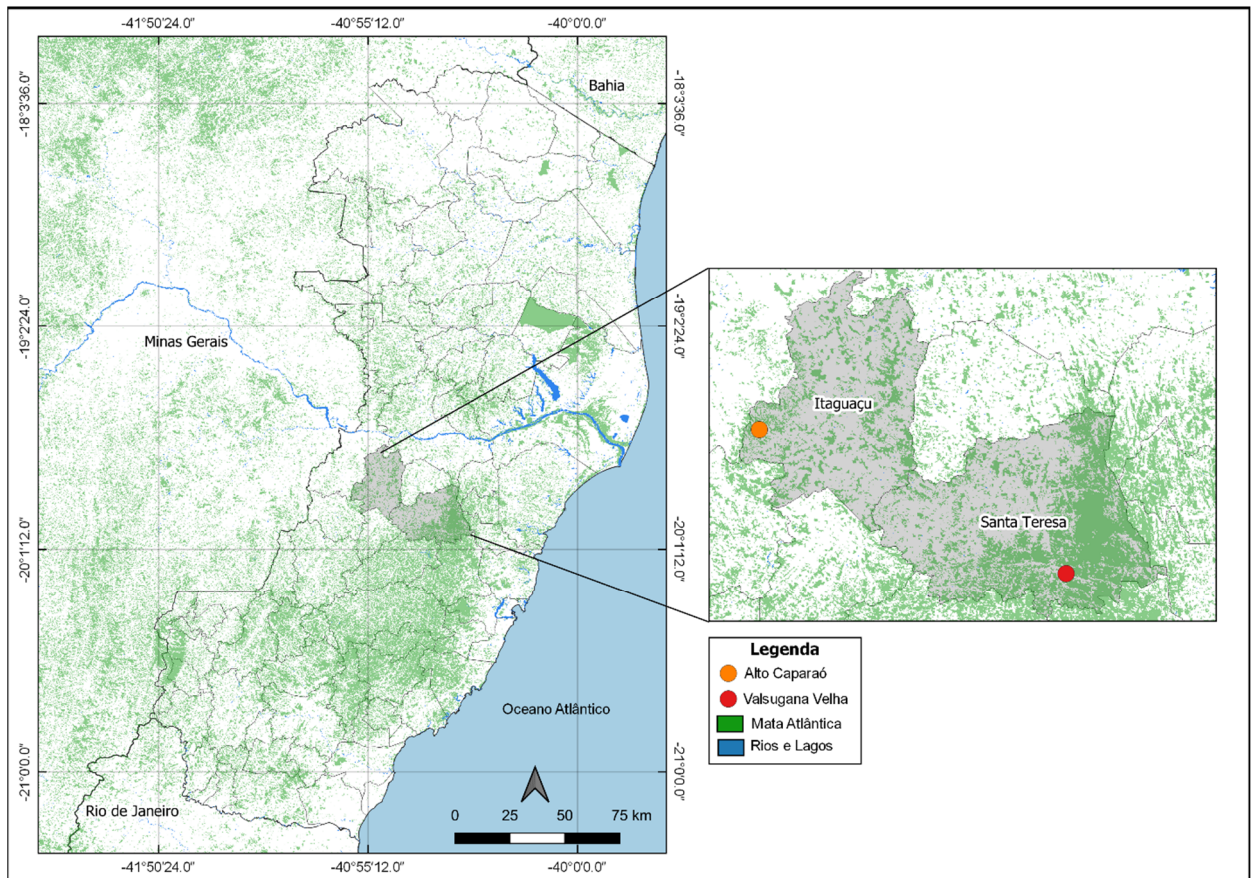
## 5 MÉTODOS

### 5.1 Delineamento do estudo

O estudo foi conduzido nas regiões rurais dos municípios de Santa Teresa – Valsugana Velha (19°58'05,2"S 40°34'40,8"W) e Itaguaçu – Alto Caparaó (9°44'12,7"S 40°58'33,1"W), localizadas na região montanhosa do estado do Espírito Santo (Figura 5). A cidade de Santa Teresa possui uma área de 683.032 km<sup>2</sup> com 32,1% de cobertura de Mata Atlântica. Por sua vez, a cidade de Itaguaçu, distante 53 km de Santa Teresa, possui 535.021 km<sup>2</sup>, dos quais 17,7% estão cobertos pela Mata Atlântica (SE-AMA, 2018; IBGE, 2019).

Os dois pontos de coleta foram selecionados com base nas características geográficas (altitude e proximidade com fragmentos de Mata Atlântica) e epidemiológicas (alto e baixo risco para malária). A localidade de Valsugana Velha tornou-se ponto de coleta fixa após registros de casos autóctones de malária e de infecção natural por *Plasmodium* spp. em mosquitos do gênero *Anopheles*, evidenciados nos estudos de Cerutti Junior et al. (2007), Rezende et al. (2009) e Buery et al. (2018), respectivamente. A localidade de Alto Caparaó dispõe de um aspecto geográfico similar ao de Valsugana Velha (ambos com aproximadamente 900m de altitude), porém, até o momento, não há registros de transmissão da malária na região.

Segundo o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), a região de Valsugana Velha e Alto Caparaó apresentam clima frio e úmido (INCAPER, 2020). As temperaturas mínimas médias e máximas médias dos meses mais frios e mais quentes variam entre 7,3 - 9,4 °C e entre 25,3 - 27,8 °C, respectivamente. Essas áreas recebem uma precipitação anual de aproximadamente 1.332 mm (Valsugana Velha) e 1.066 mm (Alto Caparaó) (INCAPER 2020). O período chuvoso se concentra entre os meses de janeiro e abril e entre outubro e dezembro. Os meses de maio a setembro são marcados por um período de estiagem e seca.



**Figura 5** – Localização geográfica das duas áreas de estudo no estado do Espírito Santo, Brasil.  
Fonte: Arquivo pessoal.

## 5.2 Estratégias de captura

As capturas foram realizadas uma vez por mês, no período compreendido entre maio de 2019 e abril de 2020, totalizando 12 meses de coleta.

Os métodos de captura utilizados foram: (1) armadilhas luminosas do tipo CDC com iscas de CO<sub>2</sub>, instaladas no interior da floresta (copa e solo); (2) armadilhas de Shannon, instaladas no interior da floresta.

As armadilhas do tipo CDC foram instaladas simultaneamente (copa e solo). A equipe de campo utilizou duas armadilhas deste tipo, posicionando-as em pontos estratégicos para captura. A primeira armadilha do tipo CDC foi erguida a aproximadamente 15 metros de altura, na copa das árvores (no interior da floresta). A segunda armadilha do tipo CDC foi posicionada a aproximadamente um metro do solo, também no interior da floresta. Por esse método, as capturas tiveram um tempo de duração equivalente a 12h, sendo instaladas à noite (18:00h) e retiradas pela manhã (06:00h).

Armadilhas de Shannon também foram utilizadas para captura de anofelinos no interior da floresta. As capturas realizadas por essa metodologia tiveram a duração de quatro horas, tendo a instalação das armadilhas ocorrido às 18:00h e sua retirada às 22:00h.



**Figura 6** – Armadilhas instaladas no interior da floresta para captura de anofelinos. A- Armadilha luminosa do tipo “CDC” (Center for Disease Control); B- Armadilha de Shannon.  
Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.3 Armazenamento e identificação

Os exemplares coletados foram transportados até o Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo – NEMES, onde as identificações foram conduzidas pelas chaves propostas por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). As fêmeas de *A. (K.) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp, 1937 identificadas foram armazenadas em microtubos contendo álcool isopropílico. Os espécimes foram agrupados em *pools* (máximo de 10 amostras/*pool*). Os *pools* foram formados segundo localidade, data da coleta e tipo de armadilha.

### 5.4 Análise laboratorial

#### 5.4.1 Extração de DNA de “*pools*” de anofelinos do subgênero *Kerteszia*

A etapa de análise molecular aconteceu no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT/USP.



A extração do DNA ocorreu por *pools* (máximo 10 espécimes/*pool*) e foi realizada por meio do kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Os *pools* foram agrupados segundo localidade, data da coleta e tipo de armadilha.

Em microtubos de 1,5ml, os espécimes/*pool* foram macerados em 180 µl da solução PBS (Phosphate buffered saline). Adicionou-se, então, 20 µl de proteinase K para digestão enzimática e 200 µl de tampão AL (Lysis Buffer). A mistura foi homogeneizada em agitador (vórtex) e imediatamente incubada em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol (96-100%) para precipitação do DNA. Novamente, a amostra foi homogeneizada em agitador (vórtex).

A solução final foi transferida para um dispositivo de coluna com filtro (DNeasy Mini spin column), associado a um tubo seco de 2 ml. Os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. A coluna (DNeasy Mini spin column) foi removida e então transferida para um novo tubo de 2 ml. Foram adicionados 500 µl de tampão AW1 (Wash Buffer 1) à coluna, que, mais uma vez, foi centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento da atividade anterior foi repetido mais uma vez, com a adição de 500 µl de tampão AW2 (Wash Buffer 2) e centrifugação de 14.000 rpm por três minutos.

Finalmente, foram acrescentados 100 µl de tampão AE (Buffer AE) para eluição. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e então centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O processo de eluição foi repetido uma vez para obter a concentração máxima possível de DNA. Ao término, as colunas foram descartadas e o DNA extraído submetido a análise.

#### **5.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)**

As amostras foram processadas mediante a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (TaqMan), com o protocolo descrito por Bickersmith et al. (2015). Os *primers* e sondas utilizados tiveram como alvo o gene 18S *ssrRNA* de *Plasmodium* para as seguintes espécies: *Plasmodium falciparum* (BICKERSMITH et al., 2015), *P. malariae* (ROUGEMONT et al., 2004) e *P. vivax* (BICKERSMITH et al., 2015) (Quadro 1). As reações para determinação de cada espécie de *Plasmodium* foram realizadas separadamente.

As reações da qPCR foram realizadas com volume final de 15 µl, sendo: 2,0 µl de DNA, 7,5 µl de TaqMan Universal Master Mix II, com UNG (Applied Biosystems), 0,45 µl de cada *primer* espécie-específico, 0,15 µl de sonda espécie-específico (Probe). Foram utilizados 4,45 µl de água de injeção (estéril) para ajustar o volume final.

**Quadro 1** – Sequência de primers utilizados para amplificar o gene 18S ssRNA de *Plasmodium* em *pools* de anofelinos no sistema qPCR.

<b>Alvo</b>	<b>Primers/ sondas</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>
<i>P. falciparum</i>	Falc-F	GACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAAA
	Falciprobe	VIC-TGAAGGAAGCAATCTAAAAGTCAC- CTCGAAAGA-QSY
<i>P. vivax</i>	Vivax-F	GACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTAA
	Vivaxprobe	NED-ATAAACTCCGAAGAGAAAA–MGBNFQ
<i>P. malariae</i>	Mal-F	CCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAA
	Malaprobe	FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-MGBNFQ

Fonte: Rougemont et al. 2004; Bickersmith et al. 2015.

A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C por dois minutos (etapa de ativação da enzima Uracil-N-glicosilase TaqMan®), 95°C por 10 minutos e 50 ciclos a 95°C por 15 segundos (etapa de desnaturação) e 60°C por um minuto (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do DNA alvo).

Controles positivo e negativo foram utilizados em todas as reações. Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de *pool* de *A. (K.) cruzii* infectado por *P. vivax*, sangue de macaco *Rhesus* infectado por *P. brasilianum* e sangue de pacientes infectados por *P. falciparum*. Como controle negativo, foi utilizada água de injeção (estéril).

## 5.5 Análise estatística

Após o término da coleta e identificação morfológica das espécies de anofelinos, os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel 2016 e organizados de acordo com: localidade, data da coleta, espécie e tipo de armadilha.

Para análise dos dados, foram utilizados o programa R (versão 1.3.1093), com complemento do pacote *vegan*, e o programa PAST (versão 4.03). Em todas as análises estatísticas, utilizou-se o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

### **5.5.1 Índices ecológicos**

Os dados sobre distribuição e densidade dos anofelinos foram expressos na forma de frequência absoluta e relativa. Foram calculados o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ), o Índice de Dominância de Simpson ( $C$ ) e o Índice de Equabilidade de Pielou ( $J$ ) para diversidade, dominância e riqueza de espécies, respectivamente. O índice de Sorensen ( $IS$ ) permitiu avaliar a similaridade da composição de espécies entre as áreas amostradas. Os valores do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e do Índice de Dominância de Simpson ( $C$ ) foram comparados entre as duas áreas estudadas (Valsugana Velha e Alto Caparaó) por meio do teste  $t$  de Hutcheson.

### **5.5.2 Sazonalidade**

Dados meteorológicos como temperatura ( $^{\circ}C$ ) e precipitação (mm) foram obtidos da estação automática de Santa Teresa, administrada pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Para a análise da distribuição sazonal, foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman (quando os dados amostrais violaram a premissa de normalidade) e o coeficiente de correlação de Pearson (quando os dados amostrais respeitaram a premissa de normalidade). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Os dados de temperatura utilizados no cálculo referem-se a média do dia do evento (coleta) e os de precipitação correspondem à chuva acumulada nos sete dias anteriores ao dia da coleta.

### **5.5.3 Taxa Mínima de Infecção (TMI)**

Para estimar o percentual de anofelinos infectados, foi calculada a taxa mínima de infecção, em que o número total de *pools* positivos foi dividido pelo número total de espécimes testados e multiplicado por 100, como descrito por Paiva et al. (2006).

A taxa mínima de infecção foi estimada assumindo-se que um *pool* positivo contém pelo menos um espécime infectado.

$$\text{TMI} = \frac{\text{Número total de } \textit{pools} \text{ positivos} \times 100}{\text{Total de espécimes analisados}}$$

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este trabalho foi conduzido em parceria com o Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo – NEMES, órgão vinculado à Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo que realiza investigações entomológicas rotineiramente como parte de suas atribuições nas ações de saúde pública em âmbito estadual.

No processo de captura entomológica, nenhum dano foi infligido ao meio-ambiente. Os membros da equipe usaram equipamentos de proteção, evitando acidentes por animais peçonhentos e picadas por insetos.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Composição, abundância, riqueza e diversidade de espécies de anofelinos

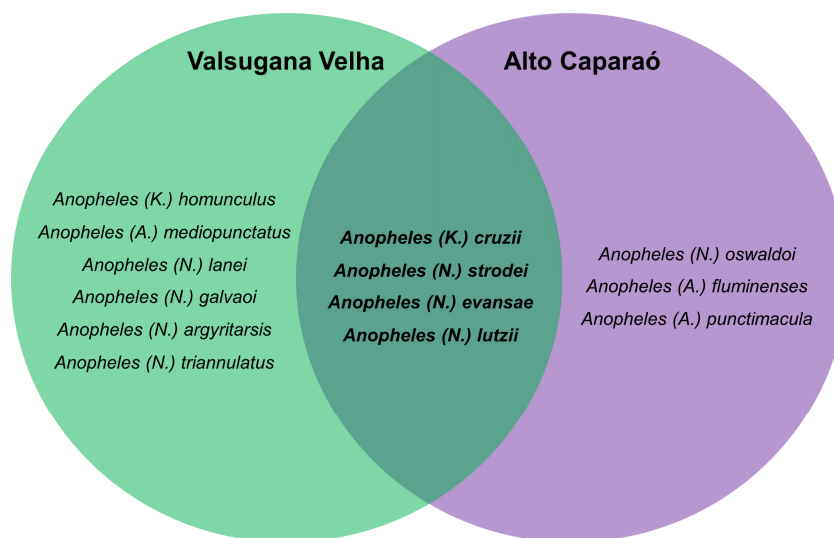
Entre maio de 2019 e abril de 2020, foram realizados 12 eventos de coleta, resultando na captura de 1.471 espécimes de anofelinos, distribuídos em três subgêneros e 13 espécies (Tabela 1). Em relação às espécies coletadas, *A. (K.) cruzii* foi a que apresentou maior frequência (87%), seguida por *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, 1926 (6%) e *Anopheles (Nyssorhynchus) evansae* Brethes, 1926 (4,21%).

Tabela 1: Abundância de anofelinos de acordo com espécie, local de coleta e tipo de armadilha. A.: *Anopheles*; K.: *Kerteszia*; N.: *Nyssorhynchus*.

Espécies	Total (%)	Valsugana Velha			Alto Caparaó		
		Shannon	CDC solo	CDC copa	Shannon	CDC solo	CDC copa
<i>Anopheles (K.) cruzii</i>	1.280 (87)	13	10	1.236	0	1	20
<i>Anopheles (N.) strodei</i>	89 (6)	80	7	0	2	0	0
<i>Anopheles (N.) evansae</i>	62 (4,21)	43	15	1	2	1	0
<i>Anopheles (K.) homunculus</i>	14 (0,95)	0	0	14	0	0	0
<i>Anopheles (N.) galvaoi</i>	7 (0,47)	6	1	0	0	0	0
<i>Anopheles (A.) mediopunctatus</i>	4 (0,27)	3	0	1	0	0	0
<i>Anopheles (N.) lutzii</i>	3 (0,2)	1	1	0	1	0	0
<i>Anopheles (N.) triannulatus</i>	3 (0,2)	2	1	0	0	0	0
<i>Anopheles (N.) lanei</i>	2 (0,13)	1	1	0	0	0	0
<i>Anopheles (N.) oswaldoi</i>	2 (0,13)	0	0	0	2	0	0
<i>Anopheles (A.) fluminensis</i>	2 (0,13)	0	0	0	1	1	0
<i>Anopheles (A.) punctimacula</i>	2 (0,13)	0	0	0	1	1	0
<i>Anopheles (N.) argyritarsis</i>	1 (0,06)	1	0	0	0	0	0
Total	1.471	150	36	1.252	9	4	20

Dentre as áreas exploradas, a localidade de Valsugana Velha exibiu maior abundância e riqueza, com 1.438 (97,7%) exemplares distribuídos em 10 espécies.

Em contrapartida, na localidade de Alto Caparaó, foram obtidos apenas 33 (2,24%) anofelinos, pertencentes a sete espécies. Somente quatro espécies de anofelinos foram semelhantes entre as duas áreas (Figura 7). O Índice de Sorensen (IS 0,47) revelou uma baixa similaridade entre as áreas quanto ao número de espécies compartilhadas.

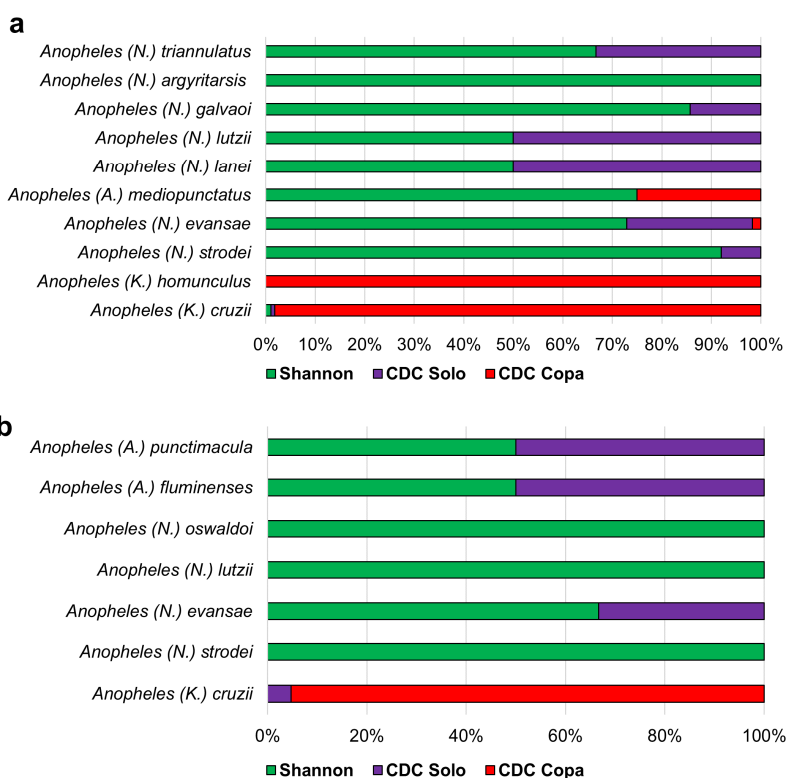


**Figura 7** – Diagrama de Venn representando espécies de anofelinos capturados em Valsugana Velha, Alto Caparaó e ambas as localidades. A: *Anopheles*; K: *Kerteszia*; N: *Nyssorhynchus*  
Fonte: Arquivo pessoal.

*Anopheles (K.) cruzii*, vetor primário da malária humana e símia na Mata Atlântica, foi a espécie dominante e mais abundante no estudo, constituindo 87% de toda a amostra. Analisando sua variação populacional entre as áreas exploradas, observou-se uma predominância desta espécie, com um número aproximadamente 60 vezes maior, na localidade de Valsugana Velha (endêmica para malária) quando comparada à localidade de Alto Caparaó (área não endêmica).

A distribuição de anofelinos por armadilhas de acordo com a localidade encontra-se representada na Figura 8. Do total de mosquitos coletados e analisados, 86,47% foram capturados em armadilhas luminosas tipo CDC posicionadas na copa das árvores, seguidas de armadilhas Shannon (10,81%) e armadilhas luminosas tipo CDC posicionadas no solo (2,72%). Analisando as três espécies mais abundantes isoladamente para cada área e tipo de armadilha, obteve-se os seguintes resultados: *Anopheles (N.) strodei* foi inexistente na copa das árvores nas duas áreas, pouco frequente nas armadilhas luminosas tipo CDC posicionadas no solo e predominante na armadilha de Shannon em Valsugana Velha (91,95%) e Alto Caparaó (100%); *Anopheles (N.) evansae* foi praticamente inexistente na copa das árvores, sendo sua

frequência no solo maior na armadilha de Shannon, sobretudo em Valsugana Velha (72,88%); a espécie considerada vetor primário da malária na Mata Atlântica, o *A. (K.) cruzii*, foi encontrado em todos os estratos em Valsugana Velha, apresentando uma menor abundância na armadilha luminosa tipo CDC posicionada no solo (0,79%) e na armadilha de Shannon (1,03%). A frequência desta última espécie aumentou expressivamente na copa das árvores (98,17%). Na área considerada não endêmica para malária, *A. (K.) cruzii* também foi predominante na copa das árvores (95,24%), mas sua abundância total foi consideravelmente menor, como já observado.



**Figura 8** – Distribuição de anofelinos por espécie, armadilha e local de coleta. (A) Valsugana Velha; (B) Alto Caparaó. A: *Anopheles*; K: *Kerteszia*; N: *Nyssorhynchus*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando os índices ecológicos, quanto a Diversidade de Shannon-Wiener, Dominância de Simpson e Equabilidade de Pielou, observou-se significativa diferença do índice de diversidade de Shannon-Wiener entre as duas áreas ( $p < 0,05$ ). Embora tenha-se amostrado um menor número de espécies e espécimes, a localidade de Alto Caparaó apresentou uma maior diversidade ( $H' = 1,2912$ ) em relação à localidade de Valsugana Velha ( $H' = 0,5351$ ). O índice de dominância de Simpson mostrou-se diferente, com significância estatística, entre as localidades ( $p < 0,05$ ), com o maior valor ocorrendo em Valsugana Velha ( $C = 0,77508$ ) e o menor valor em Alto Caparaó ( $C = 0,42883$ ).



Os valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener e do índice de dominância de Simpson sofreram forte influência da evidente abundância e dominância do *A. (K.) cruzii*, que representou 87,5% e 63,3% da fauna anofélica de Valsugana Velha e de Alto Caparaó, respectivamente. Os valores do índice de Equabilidade de Pielou reforçam está ideia. A localidade de Alto Caparaó apresentou menor riqueza ( $S= 7$ ) e menor número de espécimes capturados ( $n= 33$ ). Contudo, exibiu maior índice de Equabilidade ( $J= 0,6635$ ), revelando uma distribuição mais igualitária das abundâncias entre as espécies.

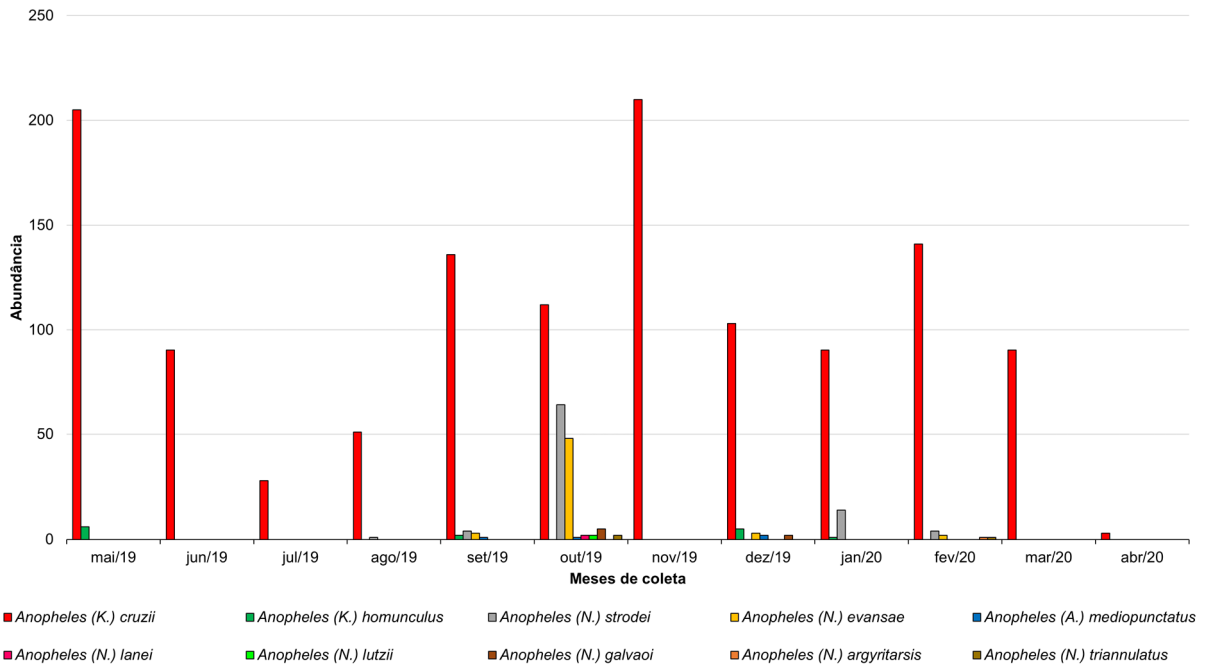
## 7.2 Distribuição temporal e sazonalidade de anofelinos

As Figuras 9 e 10 apresentam a riqueza de espécies e a abundância de espécimes capturados mensalmente nas localidades de Valsugana Velha e Alto Caparaó, respectivamente.

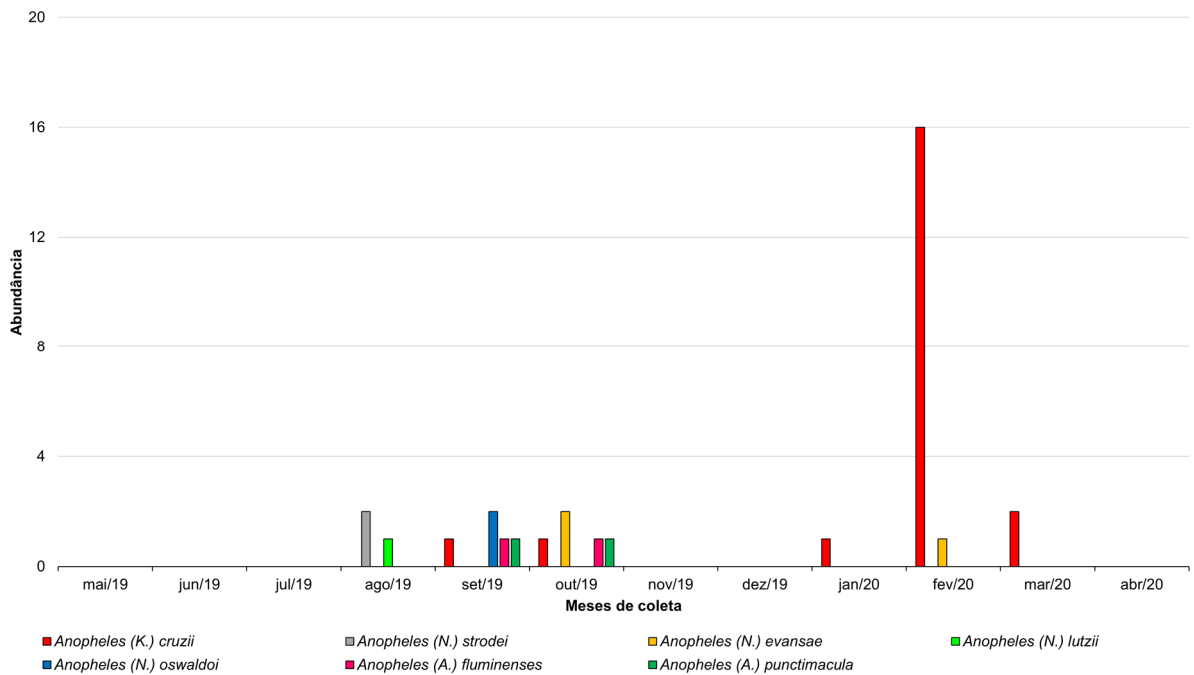
Em Valsugana Velha (Figura 9), a maior abundância foi registrada no mês de outubro de 2019, com 236 espécimes distribuídos em oito espécies. O mês com menor abundância de todas as espécies foi abril de 2020, com apenas três espécimes. A única espécie capturada em todos os meses foi *A. (K.) cruzii*, com as maiores frequências ocorrendo em maio de 2019 e novembro de 2019 e a menor frequência em abril de 2020.

Em Alto Caparaó (Figura 10), a maior abundância foi registrada no mês de fevereiro de 2020, com 17 espécimes distribuídos em duas espécies. Nenhum anofelino foi capturado nos meses de maio de 2019, junho de 2019, julho de 2019, novembro de 2019, dezembro de 2019 e abril de 2020.

Os resultados das correlações entre a abundância das espécies de *Anopheles* e as variáveis climáticas (Temperatura média do dia e Precipitação média acumulada de sete dias que antecederam a coleta) estão disponíveis no quadro 2. Somente as três espécies mais abundantes de Valsugana Velha e a espécie mais abundante de Alto Caparaó foram testadas. Não houve correlação significativa entre quaisquer das variáveis analisadas.



**Figura 9** – Variação sazonal das espécies de anofelinos capturadas na localidade de Valsugana Velha, ES, no período de maio de 2019 a abril de 2020.  
Fonte: Arquivo pessoal.



**Figura 10** – Variação sazonal das espécies de anofelinos capturadas na localidade de Alto Caparaó, ES, no período de maio de 2019 a abril de 2020.  
Fonte: Arquivo pessoal.

**Quadro 2** – Correlação entre abundância e variáveis climáticas por espécie e localidade.

K: *Kerteszia*; N: *Nyssorhynchus*.

Localidade	Espécie	Variáveis climáticas	
		Temperatura média	Precipitação
Valsugana Velha	<i>Anopheles (K.) cruzii</i>	r= 0,12 p= 0,70	r= 0,14 p= 0,64
Valsugana Velha	<i>Anopheles (N.) strodei</i>	r= 0,30 p= 0,33	r= -0,14 p= 0,65
Valsugana Velha	<i>Anopheles (N.) evansae</i>	r= 0,22 p= 0,48	r= -0,62 p= 0,07
Alto Caparaó	<i>Anopheles (K.) cruzii</i>	r= 0,33 p= 0,29	r= 0,14 p= 0,65

Fonte: Arquivo pessoal.

### 7.3 Resultado da análise molecular para detecção de *Plasmodium* nos espécimes pertencentes ao subgênero *Kerteszia*

A infecção natural por *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* foi investigada em um total de 768 espécimes, divididos em 80 *pools*. Do total de espécimes analisados, 760 (76 *pools*) pertenciam à espécie *A. (K.) cruzii* e oito espécimes (quatro *pools*) pertenciam à espécie *A. (K.) homunculus*. O resultado molecular revelou oito *pools* positivos, sendo sete (87,5%) pertencentes a *A. (K.) cruzii* e um (12,5%) pertencente a *A. (K.) homunculus*. Com relação as espécies de *Plasmodium* identificadas, cinco (62,5%) *pools* foram positivos para *P. vivax* e três (37,5%) *pools* foram positivos para *P. malariae*. Não foram identificados *pools* positivos para *P. falciparum*. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* foi encontrado naturalmente infectado por *P. vivax* (quatro *pools*) e *P. malariae* (três *pools*). Por sua vez, *A. (K.) homunculus* foi encontrado naturalmente infectado apenas por *P. vivax* (um *pool*).

Foi calculada a Taxa Mínima de Infecção para *A. (K.) cruzii* admitindo-se que pelo menos um exemplar estava infectado em cada *pool*. A Taxa Mínima de Infecção total foi igual a 0,92% (7:760). A Taxa Mínima de Infecção por espécie de *Plasmodium* foi de 0,53% e 0,39% para *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente.

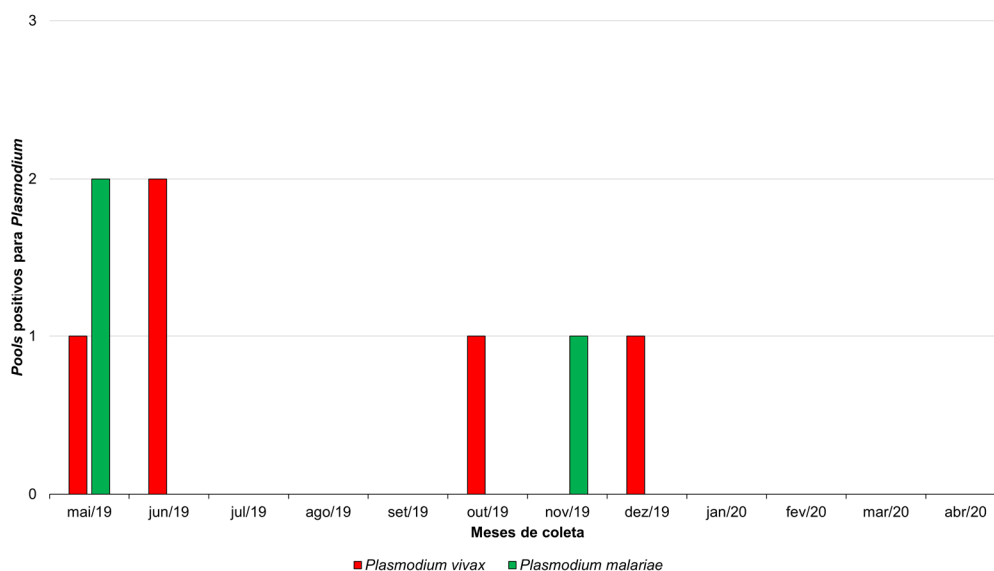
Como evidenciado na Tabela 2, todos os *pools* positivos para *Plasmodium* spp. foram provenientes da localidade de Valsugana Velha e foram capturados em armadilhas do tipo CDC, posicionadas na copa das árvores.

**Tabela 2:** Detecção de infecção natural de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus (pools)* de acordo com localidade, armadilha, espécie de *Plasmodium* e data.

Amostra/ Pools	Localidade	Armadilha	Espécie de <i>Plasmodium</i>	Data
04	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. malariae</i>	Maio 2019
06	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. malariae</i>	Maio 2019
18	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. vivax</i>	Maio 2019
25	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. vivax</i>	Junho 2019
26	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. vivax</i>	Junho 2019
45	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. vivax</i>	Outubro 2019
49	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. malariae</i>	Novembro 2019
61*	Valsugana Velha	CDC COPA	<i>P. vivax</i>	Dezembro 2019

\* *Anopheles (Kerteszia) homunculus*

A Figura 11 exhibe a distribuição mensal das infecções naturais por *P. vivax* ou *P. malariae* nos pools analisados.



**Figura 11** - Detecção de infecção natural por *Plasmodium* spp. nos anofelinos de acordo com o mês de coleta entomológica.  
Fonte: Arquivo pessoal.

## 8 DISCUSSÃO

Um total de 13 espécies de anofelinos pertencentes a três subgêneros foram identificados nas duas áreas amostradas. Das 13 espécies de anofelinos capturados, 11 já foram descritas em outros trabalhos realizados no Espírito Santo (ANDRADE; BRANDÃO, 1957; REZENDE et al., 2009; MENEGUZZI et al., 2009; REZENDE et al., 2013; BUERY et al., 2018). *Anopheles (Anopheles) fluminenses* Root, 1927 e *Anopheles (Anopheles) punctimacula* Dyar e Knab, 1906 representam as duas espécies possivelmente ainda não registradas no estado. Esses novos registros de distribuição são o resultado de esforços intensivos de coleta de curto prazo em áreas remotas onde espécies anteriormente não registradas são capturadas e as distribuições de espécies existentes são expandidas.

No presente estudo, os resultados sobre a fauna anofélica nas duas distintas áreas de Mata Atlântica mostraram variações na composição e na abundância das espécies, evidenciando uma relação entre o perfil entomológico e a situação epidemiológica específica de cada local. A área de Valsugana Velha - onde casos autóctones de malária são notificados – apresentou maior riqueza de espécies, abundância de espécimes e dominância da espécie *A. (K.) cruzii*. Rezende et al. (2013), de modo similar, compararam o perfil entomológico de duas áreas de Mata Atlântica e constataram a influência exercida pela fauna anofélica na dinâmica de transmissão da malária. Para os autores, a riqueza de espécies associada à dominância de *A. (K.) cruzii* são fatores que favorecem a transmissão da malária-bromélia.

Como mencionado, *A. (K.) cruzii* foi coletado em maior abundância nas duas áreas exploradas. Ainda que encontrada em quantidades distintas, essa espécie representou 63,6% e 87,5% da fauna anofélica de Alto Caparaó e Valsugana Velha, respectivamente. A dominância da espécie *A. (K.) cruzii* evidenciada neste trabalho é consistente com os resultados descritos por outros estudos entomológicos conduzidos em fragmentos de Mata Atlântica de diferentes regiões do Brasil (GUIMARAES et al., 1987; REIS et al., 2010; GUEDES; NAVARRO-SILVA, 2014; CERETTI-JUNIOR et al., 2020). Na Mata Atlântica, *A. (K.) cruzii* representa a espécie do gênero *Anopheles* mais importante do ponto de vista epidemiológico, sendo apontada como vetor primário da malária símia e humana (REZENDE et al., 2009; BUERY et al., 2018 DUARTE et al., 2013; LAPORTA et al., 2015; DEMARI-SILVA et al., 2020).

A composição de espécies e a abundância de espécimes, sobretudo da espécie *A. (K.) cruzii*, diferiram entre as áreas exploradas. As diferenças observadas podem ser decorrentes do grau de preservação dos fragmentos florestais estudados, bem como das suas respectivas características locais, como a disponibilidade de habitat larval no interior da floresta. A abundância e o domínio absoluto da espécie *A. (K.) cruzii* em Valsugana Velha e o pequeno número de espécimes dessa espécie obtido em Alto Caparaó parece indicar um maior grau de preservação do fragmento florestal de Valsugana Velha, onde casos autóctones de malária são ocasionalmente identificados. *Anopheles (K.) cruzii* é uma espécie silvestre, fortemente associada à presença de bromélias, habitat larval de preferência. Consequentemente, pode-se esperar uma maior abundância desse anofelino em fragmentos de Mata Atlântica preservados, onde há uma maior disponibilidade de bromélias. Segundo Dorvillé (1996), anofelinos do subgênero *Kerteszia* são excelentes bioindicadores de alterações ambientais, incluindo aquelas de ação antrópica. Diferentes estudos relataram diferença na abundância da espécie *A. (K.) cruzii* em ambientes de Mata Atlântica preservados e antropizados, corroborando esse aspecto indicativo de preservação (RIBEIRO et al., 2012; CHAVES et al., 2016; MEDEIROS-SOUSA et al., 2019).

A dinâmica populacional de anofelinos está intrinsicamente relacionada com as variáveis ambientais, que exercem um importante papel na formação e manutenção de criadouros naturais, utilizados para o desenvolvimento das formas imaturas em ambientes silvestres. Estudando áreas de Mata Atlântica, Guimarães et al. (2000; 2001) observaram que variações de temperatura e precipitação influenciavam na abundância de algumas espécies do gênero *Anopheles*, a destacar *A. (K.) cruzii*, mosquito de grande importância epidemiológica. Ao contrário do observado pelos trabalhos acima citados, neste estudo, não foram encontradas correlações significativas entre a abundância das espécies e as variáveis ambientais analisadas. A ausência de correlação observada neste trabalho pode estar relacionada com a baixa abundância das espécies *A. (N.) strodei* e *A. (N.) evansae*, que foram capturadas em Valsugana Velha, e com a baixa abundância da espécie *A. (K.) cruzii* capturada na localidade de Alto Caparaó. Além disso, a indisponibilidade de dados climáticos oficiais para o município de Itaguaçu (Alto Caparaó) deve ser considerada uma limitação desse estudo. Os dados climáticos obtidos da estação meteorológica de Santa Teresa foram extrapolados para a área de Alto Caparaó.

Ademais, a complexa topografia da Mata Atlântica cria condições ambientais e microclimáticas específicas que podem influenciar a abundância de alguns anofelinos (MARQUES et al., 2012). Por exemplo, mosquitos do subgênero *Kerteszia*, principalmente *A. (K.) cruzii*, se reproduzem nas águas que se acumulam nos verticilos de bromélias, localizadas na sombra da copa das árvores, protegidas dos raios solares (ConCONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Essa condição específica de reprodução dentro das bromélias pode gerar condições microclimáticas particulares que são imperceptíveis às análises que consideram apenas dados do macroclima.

O Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ), o Índice de Dominância de Simpson ( $C$ ) e o Índice de Equabilidade de Pielou ( $J$ ) foram usados para estimar a diversidade de espécies, dominância de espécies e equabilidade das áreas amostradas. Embora a área de Valsugana Velha tenha apresentado maior riqueza, foi também onde se verificou a maior dominância de espécies. Na região de Alto Caparaó, o Índice de Diversidade Shannon-Wiener (1,2912), o Índice de Equabilidade de Pielou (0,6635) e o Índice de Dominância de Simpson (0,42883) indicaram maior diversidade e equabilidade e menor dominância em comparação à área de Valsugana Velha. Nesse sentido, nota-se que a maior riqueza observada nem sempre reflete a maior diversidade existente na área, uma vez que a diversidade pode ser determinada pela convergência da riqueza e da equabilidade (MELO, 2008). O Índice de Equabilidade de Pielou ( $J$ ) se refere à distribuição do número de espécimes entre as espécies. É proporcional à diversidade e inversamente proporcional à dominância (PIELOU, 1975). Portanto, a abundância expressiva da espécie *A. (K.) cruzii* em Valsugana Velha conferiu maior dominância e menor equabilidade à área em relação a Alto Caparaó, que apresentou maior diversidade provavelmente devido à maior equabilidade do número de espécimes entre as espécies.

De acordo com Guimarães et al. (1985), mosquitos que apresentam comportamento acrodendrofílico devem ser frequentemente monitorados, uma vez que, muitos patógenos que causam doenças ao homem surgem de ciclos enzoóticos, dos quais participam como hospedeiros algumas espécies de vertebrados, a citar, PNH, que habitam essencialmente a copa das árvores. *Anopheles (K.) cruzii*, vetor primário da malária humana e símia na Mata Atlântica, é uma espécie acrodendrófila. Inúmeros trabalhos já demonstraram a preferência dessa espécie pela copa das árvores (FORATTINI et al., 1968, DEANE et al., 1971; REZENDE et al., 2009). No presente estudo, *A. (K.) cruzii* foi capturado majoritariamente na copa das árvores, corroborando

os resultados anteriormente citados. Contudo, na localidade de Valsugana Velha - onde casos autóctones de malária ocorrem esporadicamente - alguns espécimes também foram capturados no solo. Nessa mesma localidade, Rezende et al. (2009) e Buery et al. (2018) identificaram a infecção natural por *Plasmodium vivax* em um *pool* da espécie *A. (K.) cruzii*, capturado por armadilhas do tipo CDC posicionadas a um metro de altura. A versatilidade dessa espécie em se movimentar entre a copa da árvore e o solo foi sinalizada por Deane et al. (1971) como um fator de risco para transmissão e compartilhamento de protozoários do gênero *Plasmodium* entre símios e humanos. Mais recentemente, um estudo realizado em áreas de Mata Atlântica de São Paulo reafirmou essa ideia, demonstrando que *A. (K.) cruzii* pode atuar como ponte para que patógenos de importância médica circulem entre hospedeiros que habitam a copa das árvores e hospedeiros que habitam essencialmente o solo (EVANGELISTA, et al., 2021).

Na dinâmica de transmissão da malária-bromélia, vários autores consideram a possibilidade de que PNH possam ser uma fonte de novas infecções por *Plasmodium* para humanos e vice-versa, desde que haja uma espécie de mosquito competente, capaz de atuar como ponte entre essas diferentes espécies hospedeiras (DEANE et al., 1971; BUERY et al., 2018). Alguns estudos recentes relataram de fato transferências de *Plasmodium* de PNH para humanos ou de humanos para PNH (BRASIL et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018). No entanto, apenas especula-se quais são as possíveis espécies de PNH que se envolvem nesse ciclo de transmissão compartilhado. Muitos autores acreditam que o PNH da espécie *Alouatta guariba* deva ser o principal reservatório com importância epidemiológica para a malária humana, visto que os trabalhos sobre a malária símia que foram realizados ao longo dos últimos anos na Mata Atlântica encontraram nessa espécie as maiores prevalências de infecção para *P. brasilianum* e *P. simium*, espécies semelhantes aos protozoários humanos *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente (GOLDMAN et al., 1993; ESCALANTE et al., 1998; LECLERC et al., 2004; TAZI; AYALA, 2011).

A relevância epidemiológica dos PNH do gênero *Alouatta* no contexto da malária-bromélia está em prova desde que a sua população foi drasticamente reduzida em decorrência do surto de febre amarela silvestre, que se disseminou nas áreas de Mata Atlântica do sul e sudeste brasileiros. Como postulado por Abreu et al. (2019), esperava-se que a diminuição populacional do provável principal reservatório da malária na Mata Atlântica trouxesse impactos na dinâmica de transmissão, resultando, por



exemplo, na diminuição da infectividade do principal vetor, sabidamente o *A. (K.) cruzii*. Os estudos recentes que foram conduzidos em áreas de Mata Atlântica e que empregaram o diagnóstico molecular para detecção da infecção natural por *Plasmodium* em *A. (K.) cruzii* encontraram uma taxa mínima de infecção variando de 0,04% a 1% (REZENDE et al., 2009; DUARTE et al., 2013; NEVES et al., 2013; KIRCHGATTER et al., 2014; BUERY et al., 2018; DEMARI-SILVA et al., 2020). Os resultados referentes às análises moleculares apresentados no presente estudo revelaram a infecção natural por *Plasmodium* em 7 dos 76 pools da espécie *A. (K.) cruzii* que foram analisados, sendo a taxa mínima de infecção de 0,92%. Esse resultado está de acordo com as taxas encontrados por outros estudos anteriormente citados. Diante disso, é concebível a ideia de que outras espécies de PNH possam sustentar a cadeia de transmissão da malária-bromélia no cenário em que a população daqueles do gênero *Alouatta* encontra-se reduzida. No estado do Rio de Janeiro, onde casos autóctones de malária são registrados, PNH do gênero *Sapajus* foram encontrados naturalmente infectados por *P. simium* e *P. brasilianum* (ALVARENGA et al., 2015). Mais recentemente, na cidade de Santa Teresa – município de abrangência desse estudo –, pesquisadores identificaram a presença de *P. falciparum* e *P. brasilianum* nas fezes de PNH da espécie *Sapajus nigritus* (Dados ainda não publicados). A identificação de novos gêneros e espécies de PNH naturalmente infectados por *Plasmodium* reforça a hipótese de que, na Mata Atlântica, uma variedade de hospedeiros não humanos possa atuar como reservatório para malária, contribuindo, assim, para a permanência do protozoário no ambiente. Perante o exposto, estudos investigativos na Mata Atlântica utilizando potenciais reservatórios são absolutamente necessários e, portanto, devem ser encorajados. Contudo, tais estudos não devem se restringir apenas ao diagnóstico da infecção. Pelo contrário, devem principalmente buscar o entendimento do curso e do perfil de infecção nos hospedeiros silvestres estudados.

Como já mencionado, sete *pools* do mosquito *A. (K.) cruzii* provenientes da localidade de Valsugana Velha foram positivos para *P. vivax* (quatro *pools*) e *P. malariae* (três *pools*). Todos os *pools* positivos foram obtidos de armadilha CDC posicionada na copa das árvores. Esse resultado ratifica a importância primária desse vetor na transmissão da malária-bromélia. Em conjunto, esses dados sustentam a hipótese de que as condições específicas de procriação do *A. (K.) cruzii* favorecem seu predomínio na copa das árvores, onde encontram, como criadouros, bromélias epífitas e,

como principal fonte de sangue, os PNH. A distribuição desse vetor no ambiente silvestre se ajusta ao ciclo de transmissão da malária-bromélia, que parece ocorrer principalmente entre os PNH na copa das árvores, sendo os humanos hospedeiros acidentais (BUERY et al., 2021).

No presente estudo, um *pool* de *A. (K.) homunculus* oriundo da localidade de Valsugana Velha se mostrou positivo para *P. vivax*. Existem pouquíssimos relatos da infecção natural por *Plasmodium* nessa espécie de anofelino, sendo, portanto, uma constatação importante para a epidemiologia da malária-bromélia. Contudo, sabe-se que *A. (K.) cruzii* e *A. (K.) homunculus* são duas espécies com altas semelhanças morfológicas, podendo ser erroneamente identificadas quando avaliados somente caracteres taxonômicos tradicionais (SALLUM et al., 2009). Considerando a importância epidemiológica dessas espécies, bem como suas semelhanças morfológicas, métodos moleculares e genéticos têm sido regularmente utilizados para minimizar os erros de identificação, garantido assim uma distinção segura (CALADO; NAVARRO-SILVA, 2005; LORENZ et al., 2015). Portanto, a não adoção de métodos moleculares ou genéticos para identificação da espécie *A. (K.) homunculus* deve ser considerada como outro fator limitante desse estudo.

Neste estudo, outras espécies de anofelinos, incluindo *A. (N.) strodeji*, *A. (N.) evansae* e *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* Neiva e Pinto, 1922 foram encontradas em baixa frequência. No entanto, é importante documentar a ocorrência dessas espécies, pois, em situações excepcionais, elas também podem transmitir a malária. Diferentes autores relataram a suscetibilidade desses anofelinos à infecção por protozoários do gênero *Plasmodium* em áreas de Mata Atlântica (DUARTE et al., 2013; LAPORTA et al., 2015; BUERY et al. 2018). Segundo Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), essas espécies são vetores secundários e podem participar do ciclo de transmissão da malária quando presentes em altas densidades.

Finalmente, esses resultados reforçam a importância epidemiológica do *A. (K.) cruzii* na transmissão da malária-bromélia na Mata Atlântica. Boas condições ambientais associadas a uma ampla variedade de criadouros, abrigos e fontes sanguíneas são características encontradas na Mata Atlântica e que fazem desse bioma um ambiente propício à reprodução de inúmeras espécies de culicídeos, sendo algumas dessas espécies consideradas de importância médica, dada a sua capacidade em transmitir arboviroses e parasitoses para humanos (ALENCAR et al., 2016). Detentora de uma rica biodiversidade, a Mata Atlântica tem sofrido intenso processo de degradação

ambiental, resultado de urbanização, industrialização e expansão agrícola (RIBEIRO et al., 2011). As alterações antrópicas provocadas nessas áreas têm estreitado o contato entre mosquitos vetores, hospedeiros reservatórios e humanos, propiciando o surgimento e a disseminação de doenças emergentes e reemergentes, como a malária-bromélia (RIBEIRO et al., 2012; MEDEIROS-SOUSA et al., 2019). Diante desse contexto, o presente trabalho enfatiza a necessidade de implantar e implementar estudos entomológicos e epidemiológicos na Mata Atlântica, sendo essa uma estratégia essencial para o monitoramento de doenças vetoriais que acometem tradicionalmente ou acidentalmente populações que frequentam ou vivem próximas de áreas cobertas pela floresta.

## 9 CONCLUSÕES

- Foram capturadas 13 espécies de anofelinos no período de maio de 2019 a abril de 2020, distribuídas em três subgêneros;
- Houve dominância da espécie *A. (K.) cruzii*, essencialmente acrodendrofílica, em detrimento das demais espécies de anofelinos capturadas;
- A investigação da frequência de positividade para *Plasmodium* spp. demonstrou a circulação de *P. malariae* e *P. vivax*, principalmente em *A. (K.) cruzii*;
- A positividade para *P. vivax* em *A. (K.) homunculus* levanta questões importantes sobre o possível papel dessa espécie na transmissão do protozoário em regiões de Mata Atlântica. Todavia, a confirmação dessa espécie por método molecular ou genético deve ser considerada, tendo em vista a relevância epidemiológica desse achado;
- Dentre as espécies de *Plasmodium* identificadas, a mais prevalente foi o *P. vivax* (62,5%), seguido de *P. malariae* (37,5%);
- A localidade explorada que apresentou maior riqueza de espécie, abundância de espécimes e infecção natural por *Plasmodium* spp. foi Valsugana Velha, zona rural de Santa Teresa, área que possui maior casuística de malária relacionada ao bioma de Mata Atlântica;
- A riqueza e a abundância de anofelinos de interesse médico em Valsugana Velha fazem dessa área uma zona de risco para transmissão da malária-bromélia, sendo, portanto, necessária a vigilância entomológica contínua dessa área.
- Outras espécies de primatas não-humanos devem atuar como potenciais reservatórios do protozoário na Mata Atlântica, uma vez que a ausência de primatas do gênero *Alouatta* parece não ter influenciado a sua circulação na copa das árvores;
- O conhecimento da fauna anofélica e da diversidade de espécies de *Plasmodium* circulantes na Mata Atlântica é importante para a vigilância entomológica e para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doença na população.

## 10 REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. et al. Biodiversity and temporal distribution of immature culicidae in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State, Brazil. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0159240, 2016.
- ALY, A. S. I.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 195-221, 2009.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.
- ANDRADE, R. M. de; BRANDÃO, H. Contribuição para o conhecimento da fauna de anofelinos do estado do Espírito Santo: área de distribuição e incidência das espécies por cidades, vilas e povoados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 9, p. 391-403, 1957.
- ASHLEY, E. A.; PHYO, A. P.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608-1621, 2018.
- BAER, K. et al. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 397-412, 2007.
- BAER, K. et al. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1651-1668, 2007.
- BAKER, D. A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 57-65, 2010.
- BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 209-213, 2003.
- BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 128-136, 1995.
- BARNWELL, J. W. Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasites identified by monoclonal antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 59-61, 1986.
- BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. Adolpho Lutz – Febre amarela, malária e protozoologia – v.2, Livro 1. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.
- BHATTACHARYYA, M. K.; KUMAR, N. Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1129-1133, 2001.
- BICKERSMITH, S. A. et al. A sensitive, specific and reproducible real-time polymer-

ase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 573-576, 2015.

BILLKER, O. et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 289-292, 1998.

BILLKER, O.; MILLER, A. J.; SINDEN, R. E. Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. **Parasitology**, v. 120, n. 6, p. 547-551, 2000.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. 1038-1046, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/acoes\\_acoes\\_controle\\_malaria\\_manual.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/acoes_acoes_controle_malaria_manual.pdf)> Acesso em: 20 mai. 2019.

BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <<https://portal-arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/01/2018-066.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <[http://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017\\_027.pdf](http://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2018.

BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <<http://portal-arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/28/guia-tratamento-malaria-27fev20-2a-ed-preliminar.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2019.

BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária: Monitoramento dos Casos no Brasil em 2014. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-009---Mal-ria-para-publicacao.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da malária no Brasil, 2000 a 2011. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/11/BE-2013-44--1---Mal-ria.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2019.

BRASIL: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias

atuais. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <<https://portal-arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2019.

BRASIL: Ministério da Saúde. SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Ministério da Saúde, 2020.

BUERY, J. C. et al. Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 132, 2021.

BUERY, J. C. et al. Ecological characterisation and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 111-118, 2018.

BUERY, J. C. et al. Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simium* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 437, 2017.

BUSULA, A. O. et al. Mechanisms of Plasmodium-enhanced attraction of mosquito vectors. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 12, p. 961-973, 2017.

CALADO, D. C.; NAVARRO-SILVA, M. A. Identificação de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1127-1133, 2005.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

CANNING, E. U.; SINDEN, R. E. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. **Parasitology**, v. 67, n. 1, p. 29-40, 1973.

CARVALHO-PINTO, C. J. de; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 471-475, 2004.

CERETTI-JUNIOR, W. et al. Diversity analysis and an updated list of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105669, 2020.

CERUTTI JUNIOR, C. et al. Caracterização epidemiológica da malária autóctone no Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n. 1, 2004.

CERUTTI JUNIOR, C. Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espí-

rito Santo. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CERUTTI JUNIOR, C. et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, p. 33, 2007.

CHAVES, L. S. M. et al. *Kerteszia Theobald* (Diptera: Culicidae) mosquitoes and bromeliads: a landscape ecology approach regarding two species in the Atlantic rainforest. **Acta tropica**, v. 164, p. 303-313, 2016.

CHIN, W. et al. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. **Science**, v. 149, n. 3686, p. 865-865, 1965.

COATNEY, G. R. et al. *Plasmodium inui*, a quartan-type malaria parasite of Old World monkeys transmissible to man. **The Journal of Parasitology**, v.52, n. 4, p. 660-663, 1966.

COATNEY, G. R. et al. Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 5, p. 673-678, 1961.

COCHRANE, A. H. et al. Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasilianum*. **Infection and immunity**, v. 50, n. 1, p. 58-61, 1985.

CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CONTACOS, P. G. et al. Quartan-type malaria parasite of new world monkeys transmissible to man. **Science**, v. 142, n. 3593, 1963.

CONTACOS, P. G. et al. Transmission of *Plasmodium schwetzi* from the chimpanzee to man by mosquito bite. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 2, p. 190-195, 1970.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

COUTINHO, J. O.; RACHOU, R; FERREIRA, M. Considerações em torno de uma inspeção preliminar de malária em zona de alta endemicidade no Estado de Santa Catarina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 41, n. 1, p. 1-19, 1944.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

CURADO, I. et al. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n. 2, p. 235-243,



1997.

DAVIS, N. C. A field study of mountain malaria in Brazil. **American Journal of Hygiene**, v. 6, n. 1, 1926.

DE ABREU, F. V. S. et al. Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, 2019.

DE ALENCAR, F. E. C. et al. Assessment of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 113, 2018.

DE REZENDE DIAS, G. et al. Cryptic diversity in an Atlantic Forest malaria vector from the mountains of South-East Brazil. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 36, 2018.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2015.

DEANE, L. M. et al. Contrôles da malária na Amazônia pela aplicação domiciliar de DDT e sua avaliação pela determinação do índice de transmissão. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 2, p. 545-560, 1948.

DEANE, L. M. et al. Studies on malaria in the State of Espírito Santo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 28, n. 4, p. 531-536, 1968.

DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. Suppl II, p. 5-14, 1986.

DEANE, L.M. Simian malaria survey in Brasil: a brief summary of data obtained in 1964-1971. World Health Organization. 1972. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/65640>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3 p. 1-20, 1992.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; LIMA, M. M. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 461-463, 1984.

DEANE, L. M., et al. On the transmission of simian malaria in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, n. 5, p. 311-319, 1971.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; FERREIRA NETO, J. A. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 5, p. 805, 1966.

DEANE, L. M; FERREIRA NETO, J. A, SITÔNIO, J. G. Estudos sobre malária no estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicas**, v.28, n. 4, p. 531-536, 1958.

DEARNLEY, M. K. et al. Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum* gametocytes. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 8, p. 2053-2063, 2012.

DELIGIANNI, E. et al. Essential role of *Plasmodium* perforin-like protein 4 in ookinete midgut passage. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. 1-20, 2018.

DEMARI-SILVA, B. et al. *Plasmodium* infection in *Kerteszia cruzii* (Diptera: Culicidae) in the Atlantic tropical rain forest, southeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 104061, 2020.

DIAS, G. R. et al. Cryptic diversity in an Atlantic Forest malaria vector from the mountain of South-East Brazil. **Parasite & Vectors**, v. 11, n. 36, p. 1-11, 2018.

DORVILLÉ, L. F. M. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 31, n. 2, p. 68-78, 1996.

DOWNS, W. G; PITTENDRIGH, C. S. Bromeliad Malaria in Trinidad, British West Indies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 1, p.47-66, 1946.

DUARTE, A. M. R. C. et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2013.

DUARTE, A. M. R. C. et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections?. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

DVORAK, J. A. et al. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**, v. 187, n. 4178, p. 748-750, 1975.

DYAR, H. G; KNAB, F. Descriptions of some new mosquitoes from tropical America. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 35, n. 1632, p. 53-70, 1908.

ECKER, A. et al. *Plasmodium berghei*: *Plasmodium* perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 504-508, 2007.

ESCALANTE, A. A.; BARRIO, E; AYALA, F. J. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 616-626, 1995.

ESCALANTE, A. A. et al. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8124-8129, 1998.

EVANGELISTA, E. et al. Relationship between vertical stratification and feeding habits of mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages collected in conservation units in the green belt of the city of São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, p. 106009, 2021.

FANDEUR, T. et al. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 11-21, 2000.

FERREIRA PINTO, S. C. Malaria and Inhabitants of rural areas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 13, n. 3/4, p. 107-121, 1961.

FERREIRA, E. et al. Estudo da longevidade do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator* em condições naturais. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, n.4, p. 823-826, 1969.

FONSECA, F. da; CORREA, R. R. Infecção experimental de *Anopheles (Kerteszia) cruzi* pelo *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 15, p. 91-99, 1941.

FORATTINI, O. P. et al. Frequência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos *Culicidae* em área adjacente à mata atlântica primitiva da planície. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 101-107, 1990.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 398-411, 1993.

FORATTINI, O. P.; LOPES, O. S.; RABELLO, E. X. Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 111-173, 1968.

FREVERT, U. et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. **PLoS biology**, v. 3, n. 6, p. 1034-1046, 2005.

FRIEDENREICH, C. W. Pentameria bromeliarum, eine pentamere Halticidae. **Entomologische Zeitung**, v. 44, p. 140-144, 1883.

FUENTES-RAMÍREZ, A. et al. Molecular detection of *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* in non-human primates in captivity in Costa Rica. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2017.

GARNHAM, P. C. C.; HARPER, J. O.; HIGHTON, R. B. The mosquitoes of the Kaimosi Forest, Kenya colony, with special reference to yellow fever. **Bulletin of Entomological Research**, v. 36, n. 4, p. 473-496, 1946.

GUEDES, M. L. P.; NAVARRO-SILVA, M. A. Mosquito community composition in dynamic landscapes from the Atlantic Forest biome (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 1, p. 88-94, 2014.

GILSON, P. R.; CRABB, B. S. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 91-96, 2009.

GOLDMAN, I. F. et al. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 57, n. 1, p. 177-180, 1993.

GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 701-718, 2015.

GUIMARÃES, A. E. et al. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina, Brasil. I - Distribuição por habitat. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 243-250, 2000.

GUIMARÃES, A. E. et al. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguazu, Brasil: 1 Distribuição por habitat. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1107-1116, 2003.

GUIMARÃES, A. E. et al. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina: II--Frequência mensal e fatores climáticos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 392-399, 2001.

GUIMARÃES, A. E. et al. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. II. Distribuição vertical. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 171-85, 1985.

GUIMARÃES, A. E.; ARLÉ, M.; MACHADO, R. N. M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil: IV. Preferência alimentar. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 2, p. 277-285, 1987.

GUIMARÃES, L. O. et al. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. **Acta tropica**, v. 124, n. 1, p. 27-32, 2012.

HUME, J. C. C; LYONS, E. J.; DAY, K. P. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 144-149, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Área territorial brasileira. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Programa de Assistência Técnica e Extensão Rural – PROATER 2020 – 2023. Espírito Santo, 2020. Disponível em: < <https://incaper.es.gov.br/proater>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ISHINO, T. et al. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. **PLoS Biology**, v. 2, n. 1, P. 77-84, 2004.

JANSEN, C. J. et al. DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 1-7, 1988.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573-587, 2015.

KADOTA, K. et al. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 46, p. 16310-16315, 2004.

KIMURA, M. et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, p. 91-95, 1997.

KIRCHGATTER, K. et al. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomestic area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 403-409, 2014.

KIRCHGATTER, K. et al. Phylogeny of *Anopheles (Kerteszia)* (Diptera: Culicidae) using mitochondrial genes. **Insects**, v. 11, n. 5, p. 324, 2020.

KOJIN, B. B. et al. Endogenously-expressed NH 2-terminus of circumsporozoite protein interferes with sporozoite invasion of mosquito salivary glands. **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 153, 2016.

KONING-WARD, T. F. de. et al. *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 494-507, 2016.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 1-11, 1985.

LADISLAU, J. L. B; LEAL, M. C.; TAUIL, P. L. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n. 2, p. 9-20, 2006.

LAL, A. A. et al. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? **Journal of Biological Chemistry**, v.

263, n. 12, p. 5495-5498, 1988.

LANGER, R. C. et al. Micronemal transport of *Plasmodium* ookinete chitinases to the electron-dense area of the apical complex for extracellular secretion. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6461-6465, 2000.

LAPORTA, G. Z. et al. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm?. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2015.

LAPOUBLE, O. M. M.; SANTELLI, A. C. F. S; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Situação epidemiológica da malária na região Amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 38, n. 4, p. 300-306, 2015.

LECLERC, M. C. et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 40, p. 14455-14460, 2004.

LIM, C. S.; TAZI, L.; AYALA, F. J. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15523-15528, 2005.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 235-244, 2002.

LORENZ, C.; PATANÉ, J. S. L; SUESDEK, L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 144-152, 2015.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Anopheline* species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 501-514, 1989.

MARES-GUIA, M. A. M. M. et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). **Parasite & Vectors**, v. 13, n. 90, 2020.

MARQUES, A. C. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, n. 6, p. 166-170, 1987.

MARQUES, T. C. et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.

MASELLI, L. M. F. et al. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. **Malaria journal**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.

MATSUOKA, H. et al. A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. **Parasitology international**, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2002.

MCROBERT, L. et al. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. **PLoS biology**, v. 6, n. 6, p. 1243-1252, 2008.

MEDEIROS-SOUSA, A. R. et al. Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 110, 2019.

MELO, A. S. What do we win 'confounding' species richness and evenness in a diversity index? **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 0-0, 2008.

MÉNARD, R. et al. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. **Nature**, v. 385, n. 6614, p. 336-340, 1997.

MENEGUZZI, V. C. et al. Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 570-575, 2009.

MIGUEL, R. B. et al. Asymptomatic *Plasmodium* infection in a residual malaria transmission area in the Atlantic Forest region: Implications for elimination. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1-9, 2019.

MONTEIRO, E. F. et al. Naturally acquired humoral immunity against malaria parasites in non-human primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 525, 2020.

MULTINI, L. C. et al. Increasing complexity threatens the elimination of extra-Amazonian malaria in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 6, p. 383-387, 2019.

MULTINI, L. C.; WILKE, A. B. B; MARRELLI, M. T. Urbanization as a driver for temporal wing-shape variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 190, p. 30-36, 2019.

MUREB SALLUM, M. A.; DOS SANTOS, C. L.; WILKERSON, R. C. Studies on *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera: Culicidae). **WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH SILVER SPRING MD DIVISION OF ENTOMOLOGY**, 2009.

NEVES, A. et al. Malaria outside the Amazon region: natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. **Acta tropica**, v. 125, n. 1, p. 102-106, 2013.

NIJHOUT, M, M.; CARTER, R. Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. **Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 39-53,

1978.

NILSSON, S. K. et al. Targeting human transmission biology for malaria elimination. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, 2015.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.

PAIVA, B. R. de. et al. Detection and identification of Leishmania species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 121, 2007.

PIELOU, E. C. **Ecological diversity**. Nova York: John Wiley & Sons, 1975.

PINA-COSTA, A. de. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618-634, 2014.

PINOTTI, M. The biological basis for the campaign against the malaria vectors of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 663-682, 1951.

PINTO, C. Disseminação da malária pela aviação: biologia do *Anopheles gambiae* e outros anofelíneos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 34, n. 3, p. 295-323, 1939.

PITTENDRIGH, C. S. The bromeliad – Anopheles – malaria complex in Trinidad. I – The bromeliad flora. **Evolution**, v. 2, n. 1, p. 58-89, 1948.

Pan American Health Organization (PAHO), 2018. Plan of action on entomology and vector control 2018-2023. 162<sup>a</sup> Session of the Executive Committee. Washington, D.C., USA, 18-22 June 2018.

PONNUDURAI, T. et al. Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 175-180, 1991.

PRADEL, G. et al. A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission to the mosquito. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 11, p. 1533-1544, 2004.

RACHOU, R. G. Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras da malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 145- 181, 1958.

RACHOU, R. G. Sobre o combate aos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, n. 3, p. 245-



254, 1952.

RACHOU, R. G. Da infectibilidade dos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* pelos parasitos da malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 18, n. 3/4, p. 595-602, 1966.

RACHOU, R. G.; FERREIRA, M. O. As *kerteszi*as como grandes responsáveis pela malária no litoral do estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 18, n. 3/4, p. 691-698, 1966.

REIS, M.; MÜLLER, G. A.; MARCONDES, C. B. Inventário de mosquitos (Diptera: Culicidae) da Unidade de Conservação Ambiental Desterro, Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 333-337, 2010.

REZENDE, H. R.; CERUTTI JUNIOR, C.; SANTOS, C. B dos. Aspectos atuais da distribuição geográfica de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* DYAR & KNAB, 1908 no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 12, n. 1, p. 123-126, 2005.

REZENDE, H. R. et al. Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 38, n. 2, p. 272-280, 2009.

REZENDE, H. R. et al. Comparative study of distribution of anophelines vectors (Diptera: culicidae) in areas with and without malaria transmission in the highlands of an extra-Amazonian region in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 598-602, 2013.

RIBEIRO, A. F. et al. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 2, p. 316-324, 2012.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. **Biodiversity hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 405-434.

RISCO-CASTILLO, V. et al. Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 5, p. 593-603, 2015.

RODRIGUES, P. T. et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

RONA, L. D.P.; CARVALHO-PINTO, C. J.; PEIXOTO, A. A. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil. **Malaria Journal**, v. 9, n. 33, p. 1-9, 2010.

RONA, L. D.P.; CARVALHO-PINTO, C.; J PEIXOTO, A. A. Evidence for the occurrence of two sympatric sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 207, p. 1-13, 2013.

ROUGEMONT, M. et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from Human by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific Real-Time PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636-5643, 2004.

SAXENA, A. K.; WU, Y.; GARBOCZI, D. N. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1260-1265, 2007.

SEAMA - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Atlas da Mata Atlântica do estado do Espírito Santo. Espírito Santo, 2018. Disponível em: < <https://seama.es.gov.br/atlas-da-mata-atlantica-es>>. Acesso em: 25 nov. 2020.

SESA. Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo. Núcleo Especial de Vigilância Epidemiológica. Atualizar as informações da Nota técnica de Malária decorrente do surto de casos no norte do estado, para todos os profissionais de saúde do Espírito Santo (ES). Disponível em: <[https://saude.es.gov.br/Mdia/sesa/Mal%C3%A1ria/NOTA%20T%C3%89CNICA%20%20MALARIA\\_1%20\(2\).pdf](https://saude.es.gov.br/Mdia/sesa/Mal%C3%A1ria/NOTA%20T%C3%89CNICA%20%20MALARIA_1%20(2).pdf)> Acesso em: 10 fev. 2020.

SILVEIRA, A. C.; DE REZENDE, D. F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001.

SIMON, N. et al. Adhesion protein complexes of malaria gametocytes assemble following parasite transmission to the mosquito. **Parasitology international**, v. 65, n. 1, p. 27-30, 2016.

SIMON, N. et al. Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 21, p. 14537-14546, 2009.

SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **The Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 69, p. 1-11, 2011.

SOUSA, G. S. de. Tratado Descritivo do Brasil em 1587. Rio de Janeiro: Typographia de João Ignacio da Silva, 1879.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SUTHERLAND, C. J. et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 10, p. 1544-1550, 2010.

TALMAN, A. M. et al. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 3, n. 24, p. 1-14, 2004.

TAUIL, P. et al. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 71-111, 1985.

TAUIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 58, n. 3/4, p. 163-167, 1998.

TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905-915, 2013.

TAZI, L; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 209-221, 2011.

THATHY, V. et al. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1586-1596, 2002.

TOMAS, A. M. et al. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 15, p. 3975-3983, 2001.

UENO, H. M.; FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles (Kerteszia)* in Ilha Comprida, southeastern Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 41, n. 2, p. 269-275, 2007.

USYNIN, I; KLOTZ, C.; FREVERT, U. Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2610-2628, 2007.

VANDERBERG, J. P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 991-996, 2004.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VINETZ, J. M. et al. Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10331-10341, 2000.

WILKERSON, R. C.; PEYTON, E. L. The Brazilian malaria vector *Anopheles (Kerteszia) cruzii*: life stages and biology (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**, v. 23, n. 2, p. 110-122, 1991.

WIN, T. T. et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 3, p. 231-239, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponível em:  
<[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158\\_eng.pdf;jsessionid=](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158_eng.pdf;jsessionid=)

ssionid=1ECC71379A726875B50C446D6950959D?sequence=1>. Acesso em: 30 mai. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>>. Acesso em: 30 mai. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158\\_eng.pdf;jsessionid=1ECC71379A726875B50C446D6950959D?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158_eng.pdf;jsessionid=1ECC71379A726875B50C446D6950959D?sequence=1)>. Acesso em: 20 abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2020. Geneva: World Health Organization, 2019. Disponível em: <[https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/9789240015791-eng.pdf?sfvrsn=d7a8ec53\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/9789240015791-eng.pdf?sfvrsn=d7a8ec53_3&download=true)>. Acesso em: 20 jan. 2021.

YALCINDAG, E. et al. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 511-516, 2012.