

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

JULYANA CERQUEIRA BUERY

**TRANSMISSÃO DA MALÁRIA RESIDUAL DE SISTEMAS DE MATA ATLÂNTICA
NO ESPÍRITO SANTO: COMPORTAMENTO VETORIAL E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *PLASMODIUM* CIRCULANTES**

VITÓRIA

2018

JULYANA CERQUEIRA BUERY

**TRANSMISSÃO DA MALÁRIA RESIDUAL DE SISTEMAS DE MATA ATLÂNTICA
NO ESPÍRITO SANTO: COMPORTAMENTO VETORIAL E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *PLASMODIUM* CIRCULANTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior

Coorientadora: Prof^a. Dra. Blima Fux

VITÓRIA

2018

DEDICATÓRIA

À minha avó Léa Rodrigues Buery, que no decorrer dessa trajetória foi para perto de Deus pedir por essa neta, a qual ela nunca deixou de incentivar aqui na Terra.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Crispim Cerutti Junior, meu orientador, que me acolheu ainda em 2011 com muita paciência e dedicação, quando eu era absolutamente imatura dentro da academia. Sua competência, eficiência e determinação me inspiraram durante todos estes anos a ser uma profissional melhor. Um exemplo de médico e, principalmente, de educador. Obrigada!

À Professora Dra. Blima Fux, minha coorientadora, pelos conhecimentos transmitidos e apoio constante. Agradeço por desde antes do mestrado acreditar em mim, e vislumbrar o que nem eu acreditava que poderia ser realizado nesta jornada.

À toda a equipe de coleta em campo: Helder Ricas, Marcelo, Agenor (Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo) e Leonardo Santana (aluno de Iniciação Científica - UFES).

À Dra. Rosely dos Santos Malafronte e ao Dr. Marcelo Urbano Ferreira, por terem aberto as portas de seus laboratórios (Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP e Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biomédicas - USP, respectivamente) para meu aprendizado e para a realização das análises moleculares deste estudo.

Às queridas Dra. Lícia Natal, Fabiana Silva, Dra. Priscila Thihara e Lais Salla pela paciência e dedicação comigo enquanto estive em São Paulo para a realização dos experimentos, me ensinando tudo o que podiam, com muita organização e, principalmente, carinho.

Às precisosas colaborações de Dr. Aloísio Falqueto, Claudiney Biral, Dra. Ana Maria Duarte, Dra. Regiane Tironi, Dra. Rachel Vicente, Dra. Ana Carolina Loss e Dra. Filomena Alencar, que gentilmente disponibilizaram um tempo entre suas atividades habituais para ler, analisar, discutir e ampliar ainda mais a oferta de informação que este trabalho traz.

À Paula Cordeiro e família, Luísa Dettoni, Bárbara Dan, Ludimila Camporez e Kamila Rabelo pela solidariedade em me receberem em suas casas em São Paulo e pela amizade forte que sempre sobreviveu à distância.

Ao laboratório de Protozoologia e a toda equipe do setor de Parasitologia, onde cresci como pesquisadora e tive os melhores e piores momentos dentro da UFES. Steven Rios, Luciana Stanzani e a todos os servidores e alunos: obrigada!

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES, especialmente à Thamires Moura e Dr. Moisés Palacci pela disponibilidade em ajudar nos trâmites necessários para a realização do projeto e na minha formação.

À FAPES, por fornecer o aporte financeiro por meio da bolsa de Doutorado, taxa de bancada e financiamento de projeto PPSUS/MS ao longo desses quatro anos.

Aos amigos que sempre torceram por mim, dos quais eu nem ousou citar os nomes, já que, graças a Deus, são muitos. Aos amigos de infância e aos meus queridos pupilos (aos jovens e aos não tão jovens mais) que conheci no Grupo de Jovens Alabanza, deixo um agradecimento especial pelas orações e pensamentos sempre positivos direcionados a mim!

Às amigas Maria Augusta Dario e Cynara Possamai. Pela amizade inigualável, força nas dificuldades, comemoração nas vitórias e incentivo acadêmico. Viveria todos os momentos novamente ao lado de vocês, no Brasil ou no Peru.

Ao meu muito amado Rafael Borba pela torcida constante, pelos conselhos nos momentos críticos, por construir comigo as vitórias e por todo amor e cuidado dedicados a mim ao longo dos anos. Agradeço também à Maria Célia e Ruymar Borba por terem me acolhido em seu lar, sempre com respeito e admiração.

À minha família inteira, que sempre admirou e respeitou minhas escolhas. Aos meus avós Selma e Geraldo Cerqueira, Léa (*in memorian*) e Jorge Buery Sobrinho (*in memorian*) agradeço pelo exemplo de amor e por terem gerado frutos tão especiais,

que fazem o mundo se tornar um lugar mais agradável. Tios, primos e agregados, vocês são demais! Obrigada!

Aos meus pais Jorge e Cristina e à minha irmã Maria Cecília, por me ensinarem que nada funciona sem amor. E o amor que nos une sempre foi e sempre será o motivo para que eu queira me tornar uma pessoa melhor. Muito obrigada por todos os valores e carinho transmitidos a mim. Obrigada pelo exemplo de garra e determinação, que foi o que me fez chegar até aqui!

À Deus, toda honra e toda glória por todos os momentos vividos, pelas oportunidades concedidas, nas quais conheci pessoas inesquecíveis e tive experiências únicas. Agradeço pelas dificuldades enfrentadas, pois me fizeram refletir e criar novas soluções para situações que pareciam insuperáveis. Nossa Senhora Aparecida, obrigada por acolher meus pedidos e por sua intercessão ter gerado verdadeiros milagres que permitiram que este trabalho pudesse ser finalizado.

“Busquem em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça, e todas as coisas lhes serão acrescentadas.”

(Mateus 6:33)

RESUMO

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, casos de malária autóctone podem ser encontrados próximos a fragmentos de Mata Atlântica. No estado do Espírito Santo, tal doença é particularmente frequente, sendo *Plasmodium vivax* o parasito comumente reconhecido como o agente etiológico das infecções humanas. Porém, observadas as distâncias espaciais e temporais entre os casos relatados e o comportamento dos insetos vetores locais, especialmente *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, o ciclo de transmissão parece não corresponder ao ciclo tradicional da malária. Sendo assim, a hipótese da existência de uma zoonose, com símios infectados mantendo a transmissão, é estabelecida. Considerando que há pontos obscuros em relação à malária-bromélia, como é chamada, a avaliação do comportamento dos componentes dessa cadeia de transmissão se faz necessária. No presente estudo, a transmissão da malária-bromélia na região rural endêmica do Espírito Santo é investigada com base em dois pilares principais: análise comportamental dos vetores do gênero *Anopheles*, principalmente os do subgênero *Kerteszia*, e a comparação do genoma mitocondrial completo do DNA extraído de diversos isolados de *Plasmodium* spp. que infectaram humanos, um símio do gênero *Allouata* e mosquitos *Anopheles* spp. da mesma região. Armadilhas luminosas com CO₂ (CDC-CO₂) foram instaladas nas áreas abertas, na margem e no interior da floresta, e armadilhas *Shannon* foram instaladas na margem da floresta para a captura dos mosquitos. O genoma mitocondrial dos *Plasmodium* spp. encontrados nos diferentes hospedeiros foi completamente sequenciado e comparado em uma rede de haplótipos que incluiu todas as sequências de genomas mitocondriais de *P. vivax/simum* de amostras de seres humanos e símios de outras regiões do Brasil. Foram capturados 1.414 anofelinos distribuídos em 13 espécies. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar&Knab foi a espécie mais capturada na copa das árvores e foi também o vetor com maior prevalência de infecção por *Plasmodium vivax*, de acordo com técnicas moleculares de PCR. A rede de haplótipos mostrou que humanos e símios da Mata Atlântica estavam infectados pelo mesmo haplótipo, mas alguns isolados de seres humanos não eram idênticos ao isolado de símio. Além disso, o DNA de plasmódios extraído de mosquitos revelou sequências diferentes das obtidas de símios, mas semelhantes a de dois isolados de seres humanos. O estudo revelou, portanto, a maior prevalência

de infecção em *A. (K.) cruzii* entre os anofelinos e o comportamento acrodendrofílico desses vetores, principalmente dos infectados, reforçando a hipótese de que a presença de *P. vivax* nesses espécimes surja pelos repastos sanguíneos em animais que vivem na copa das árvores, como os símios. A comparação dos genomas mitocondriais dos parasitos mostra que, na Mata Atlântica e especialmente no Espírito Santo, parasitos com estruturas moleculares semelhantes são compartilhados por seres humanos e símios. A reconhecida identidade entre *P. vivax* e *P. simium* ao nível de espécie, o compartilhamento de haplótipos, e a participação do mesmo vetor na transmissão da infecção para ambas as espécies hospedeiras indica transferência interespecies dos parasitos.

Palavras-chave: *Anopheles*; *Plasmodium*; Malária; Epidemiologia; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; DNA mitocondrial; Análise de sequência, DNA; Zoonoses.

ABSTRACT

In the Southern and Southeastern regions of Brazil, autochthonous malaria cases can be found close to the Atlantic Forest fragments. In Espírito Santo state, this disease is particularly frequent, and *Plasmodium vivax* is the parasite commonly recognized as the etiological agent of human infections. However, when spatial and temporal distances between the reported cases and the behavior of local insect vectors, especially the *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, are observed the transmission cycle does not correspond to the traditional cycle of malaria. Thus, the hypothesis of the existence of a zoonosis, with infected simians maintaining the transmission, was established. Considering that there are obscure aspects regarding bromeliad-malaria, as it is called, the evaluation of the components of the transmission cycle is necessary. In the present study, the transmission of bromeliad-malaria in the rural endemic region of Espírito Santo is investigated based on two main pillars: behavioral analysis of the *Anopheles* vectors, mainly those of the subgenus *Kerteszia*, and comparison of the complete mitochondrial genome from several isolates of *Plasmodium* spp. The isolates were infecting humans, simians of the genus *Allouata* and mosquitoes *Anopheles* spp. from the same region. Light CO₂ traps (CDC-CO₂) were installed in open areas, inside the forest and at its edge, and Shannon traps were installed on the edge of the forest. The mitochondrial genome of *Plasmodium* spp. found in the different hosts was completely sequenced and compared in a haplotype network that included all sequences of *P. vivax/simian* mitochondrial genomes from samples from humans and simians from other regions of Brazil. A total of 1,414 anophelines were captured from 13 species. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar&Knab continued to be the more captured species in the forest canopy and was also the vector with the highest prevalence of *Plasmodium vivax* infection according to molecular PCR techniques. The haplotype network indicated that humans and simians of the Atlantic Forest were infected by the same haplotype, but some isolates of humans are not identical to the simian isolate. In addition, DNA of *Plasmodium* spp. extracted from mosquitoes presented sequences different from those obtained from simians, but similar to those retrieved from two isolates from humans. This study revealed that the acrodendrophilic behavior of vectors, especially those infected, reinforces the hypothesis that the presence of *P. vivax* in these specimens arises from the blood of animals that live in the top of the

trees, such as monkeys. The comparison of the mitochondrial genomes of the parasites shows that, in the Atlantic Forest, especially in Espírito Santo, parasites with similar molecular structures are shared by humans and simians. The recognized identity between *P. vivax* and *P. simium*, the shared haplotypes, and the participation of the same vector in the transmission of the infection to both host species indicates interspecies transfer of the parasites.

Keywords: *Anopheles*; *Plasmodium*; Malaria; Epidemiology; Real-time Polymerase Chain Reaction; Mitochondrial DNA; Sequence analysis, DNA; Zoonoses.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 INTRODUÇÃO	14
2.1 A malária e seu controle	14
2.2 As condições socioambientais do estado do Espírito Santo e o estabelecimento dos casos de malária	16
2.3 Anofelinos de importância médica no Brasil	19
2.4 Comportamento vetorial e sua ligação com a transmissão da malária-bromélia	21
2.5 Malária-bromélia: zoonose originada da malária símia?	22
2.6 Epidemiologia molecular aplicada a estudos sobre o gênero <i>Plasmodium</i>	25
<i>2.6.1 Detecção de DNA como recurso para diagnosticar infecções por Plasmodium spp.</i>	25
<i>2.6.2 Marcadores moleculares e aplicações práticas nos estudos epidemiológicos sobre malária</i>	27
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Descrição da área	34
5.2 Coleta de anofelinos	34
5.3 Armazenamento e identificação dos insetos	35
5.4 Determinação da infecção dos anofelinos	35
5.5 Amostras provenientes de seres humanos e símios	36

5.6 Amplificação por PCR e sequenciamento do genoma mitocondrial completo	36
5.7 Considerações éticas.....	37
5.8 Análise estatística	37
6 RESULTADOS.....	39
6.1 Artigo 01	39
6.2 Artigo 02	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8 CONCLUSÕES	80
9 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	95

1 APRESENTAÇÃO

A transmissão da malária nas regiões extra-amazônicas do Brasil, embora interrompida na década de 1960, ainda persiste em algumas áreas de florestas densas de Mata Atlântica, com relatos de casos caracterizados por ciclos de transmissão obscuros e apresentações clínicas discretas. Malária-bromélia, como é chamada, é particularmente frequente no estado do Espírito Santo e recebe este nome porque os vetores do gênero *Anopheles* se reproduzem nos verticilos das plantas da família Bromeliaceae, típicas do bioma de Mata Atlântica¹. *Plasmodium vivax* é o parasito comumente reconhecido como o agente etiológico dessas infecções humanas. A característica distância espacial e temporal entre os casos relatados na região, a presença de alguns casos autóctones em humanos, comprovadas infecções assintomáticas e a baixa parasitemia ao microscópio tornam plausível o questionamento da existência de uma cadeia de transmissão tradicional.

Uma vez que tal ciclo não corresponde ao ciclo tradicional da malária, aponta-se a existência de uma zoonose, com símios infectados participando como reservatórios do parasito dentro da floresta. Frente às reflexões sobre o tema, o presente trabalho avalia tanto o comportamento dos vetores típicos da área de transmissão endêmica, como a estrutura do genoma mitocondrial dos parasitos encontrados infectando diferentes hospedeiros de uma mesma região. A partir do material coletado, faz-se a comparação das características do genoma mitocondrial com aquelas encontradas em outros estados do Brasil. O levantamento dessas informações epidemiológicas pretende contribuir para elucidação do ciclo de transmissão na região extra-amazônica que acontece também em estados como São Paulo, Santa Catarina e Rio de Janeiro.

2 INTRODUÇÃO

2.1 A malária e seu controle

A história recente brasileira aponta a malária como uma das mais importantes doenças enfrentadas pela saúde pública². Acredita-se que a imigração africana forçada, resultante do sistema de trabalho escravo implantado pela colonização europeia no Brasil, teve papel fundamental na disseminação da doença no país. Apesar das evidências de que já havia casos entre os indígenas nativos anteriormente a este acontecimento, a presença dos africanos recém-chegados multiplicou a quantidade de reservatórios humanos dos protozoários do gênero *Plasmodium* em várias regiões do país. A disseminação da doença teria se dado, portanto, onde havia vetores aptos a transmiti-la: os mosquitos do gênero *Anopheles*²⁻⁵.

Após o período colonial e a abolição da escravatura, o crescimento da indústria da borracha e os esforços para ligar o enorme território brasileiro com estradas trouxeram à luz ainda mais casos de malária. Isso porque trabalhadores de todas as regiões adentravam os ambientes nativos ainda intocados do Brasil para cumprir suas funções laborais e, assim, tornavam-se infectados. Desta forma, entre os anos de 1892 e 1906, aproximadamente 27 de cada 10.000 pessoas morreram por consequência da doença na região Norte⁶. Segundo Griffing *et al.* (2015)², apesar de as autoridades reconhecerem a magnitude da malária no país desde o Brasil-colônia, os esforços para o controle foram prejudicados pelas limitadas condições da saúde pública e pelo desconhecimento da biologia e da ecologia que envolviam a doença.

Em meados dos anos de 1940, com o fim da Segunda Guerra Mundial, o Brasil começou a enfrentar de fato este flagelo nacional, o que foi feito a partir de múltiplos esforços regionais e nacionais, cada um com sucesso variável². Dessa forma, as propostas de estratégias de controle da malária evoluíram ao longo das últimas décadas.

Na década de 1940, o Serviço Nacional de Malária (SNM) e a Campanha Nacional de Erradicação da Malária (CEM) conseguiram controlar a doença em grande parte do país, a partir do controle dos principais vetores pela borrifação intradomiciliar com diclorodifeniltricloroetano (DDT) e do desflorestamento de áreas de floresta urbanas. A partir de 1958, a estratégia de controle passou a ser a

erradicação por métodos sistematizados em conformidade com as normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), visando à inclusão do combate à doença em áreas potencialmente endêmicas onde não havia registros de casos^{7, 8}. Com esses programas, a incidência da malária no país diminuiu, passando de quatro a cinco milhões de casos anteriores às campanhas para 52 mil casos confirmados em 1970, sendo a maioria proveniente da Região Amazônica³.

Nesse período, enquanto a malária era progressivamente “encurralada” na Região Amazônica, as áreas de floresta densa de Mata Atlântica resistiam às medidas implantadas, conservando a doença de forma residual, já que essas eram eficazes apenas para a eliminação dos vetores com comportamento endofílico, como *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* e *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, ambos pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*⁹. Embora a remoção manual das bromélias e o desflorestamento surtisse efeito nas áreas de floresta próximas das cidades, como no estado de Santa Catarina, eram ineficazes nas florestas exuberantes das áreas rurais^{3, 9}. A partir de 1970, o Programa de Erradicação da Malária no Brasil (PEMB) modificou sua estratégia, pois foi comprovado que as regiões que registravam casos não respondiam da mesma maneira, em função das distintas características geográficas, epidemiológicas e socioeconômicas. Assim, o país foi dividido em “áreas de erradicação em longo prazo”, na região Amazônica, e em “áreas de erradicação em curto prazo”, localizadas na região extra-amazônica¹⁰.

São características da malária em regiões categorizadas como de “erradicação em curto prazo”: a distância espacial e temporal entre os casos registrados, a baixa exuberância dos sinais e sintomas e a pequena quantidade de parasitos observados à microscopia¹¹⁻¹⁴. Tais características tornam difícil justificar a transmissão por meio de um mecanismo tradicional, baseado na relação hospedeiro-vetor-hospedeiro. Nesses lugares, a doença é conhecida como “malária-bromélia” ou “malária residual de sistemas de Mata Atlântica” (RSMA). Os anofelinos responsáveis pela transmissão da forma RSMA da doença pertencem ao subgênero *Kerteszia*, notadamente *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, mas também *Anopheles (Kerteszia) bellator*^{9, 15-18}. Tais vetores procriam nos verticilos das bromélias, no ambiente da floresta, não podendo ser atingidos pelas técnicas tradicionais de combate larvário^{9, 16-19}. Além disso, *A. (K.) cruzii*, embora capaz de invadir o ambiente domiciliar para a

atividade hematofágica, mantém o ambiente silvestre como seu *habitat* natural²⁰⁻²³. Desta forma, a eliminação desse vetor foi efetiva nas décadas passadas.

Em 2014, o Brasil registrou o menor número de casos de malária nos últimos 35 anos; uma redução de 76%, ou seja, 143.250 casos. Com o objetivo de eliminar a doença no país, o Ministério da Saúde relançou, em novembro de 2015, o Plano de Eliminação da Malária no Brasil. Este plano está em consonância com as preconizações da OMS, cuja meta é a redução de pelo menos 90% dos casos até 2030 e a eliminação da malária em pelo menos 35 países²⁴. No entanto, após o otimismo decorrente do decréscimo no número de casos registrados até 2016, dados recentes apontaram o aumento em 28% dos casos em 2017, até o mês de julho²⁵⁻²⁷. De acordo com o Ministério da Saúde, tal mudança deve-se a supostas alterações climáticas e ao próprio ciclo da doença. Entretanto, diversos estudiosos do tema questionam tais argumentos e sugerem que uma mudança no foco das políticas públicas relacionadas à doença, bem como a perda de membros experientes na equipe técnica envolvida nas estratégias de controle, tenham contribuído para o desfecho inesperado²⁵⁻²⁷.

Dados apontam os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão como aqueles que registram o maior número de casos autóctones do país. A maioria dos casos considerados importados, vindos de outros países amazônicos, africanos e do Paraguai, é registrada na região extra-amazônica²⁸. Sabe-se que, por ser menos comum em tal região, a doença acaba resultando na morte de mais indivíduos do que na região Amazônica, pois as redes de saúde estão menos preparadas para receber os casos²⁸. Estados como Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo também albergam casos de malária na forma RSMA, considerada autóctone, porém em proporção menor quando comparados aos casos importados²⁸.

2.2 As condições socioambientais do estado do Espírito Santo e o estabelecimento dos casos de malária

O estado do Espírito Santo caracteriza-se por duas áreas geográficas bem distintas. Ao norte da calha do Rio Doce, os relevos são mais suaves e as áreas de floresta mais escassas. Nesta região, predominam atividades pecuárias e o cultivo

do café²⁹. As propriedades rurais são maiores e, por isso, o número de trabalhadores contratados é mais volumoso. A intensa exploração da área rural e atividades que degradam os solos e águas culminaram com o esgotamento das reservas florestais e o assoreamento e poluição dos rios, o que acarreta períodos de seca prolongados com forte impacto sobre o meio-ambiente e as atividades econômicas. Neste cenário, um fluxo regular de deslocamentos para a região Amazônica se tornou comum, com trabalhadores rurais buscando melhores condições de vida e de trabalho. Ao sul do Rio Doce, o relevo é mais acidentado, com uma área montanhosa bastante extensa. Nessa região, as atividades agrícolas são baseadas em pequenas propriedades. O cultivo do café também é abundante, mas compete com os hortifrutigranjeiros e com monoculturas como a banana²⁹. A floresta, especialmente de Mata Atlântica, é mais exuberante e as condições climáticas mais favoráveis, com temperaturas amenas e chuvas frequentes devido às constantes massas de ar vindas do oceano que vão de encontro às cadeias de montanhas.

Ao norte do estado são detectados os casos de malária clássica, introduzidos por humanos infectados em regiões endêmicas, como a Amazônia. Os casos verdadeiramente autóctones – malária-bromélia –, por sua vez, estão localizados nos municípios ao sul, onde o bioma Mata Atlântica ainda é abundante na região montanhosa. Os vetores como *A. (N.) darlingi* e *A. (N.) albitarsis*, responsáveis pela transmissão da doença na Região Amazônica, e também *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, podem ser encontrados no norte do estado e nas áreas próximas à costa, respectivamente. No entanto, ao sul, exatamente onde ocorrem os casos autóctones, esses vetores são raramente encontrados^{30, 31}. A infecção nessa região parece ser favorecida pela alta densidade de anofelinos e a ampla distribuição de *A. (K.) cruzii*³¹. *Anopheles (K.) cruzii*, reconhecido vetor da malária-bromélia, tem sido encontrado em ambiente antrópico em Santa Teresa, município com maior número de casos no Espírito Santo. Sugere-se, portanto, que a transmissão desse tipo de malária possa ser um marcador de ocupação humana em áreas de Mata Atlântica anteriormente preservadas e que o ciclo da doença se mantenha por homens que adentram as florestas³⁰. Nos últimos anos, os casos de malária-bromélia no Espírito Santo variaram entre 20 e 40, ano a ano, com exceção de 2008, quando foram registrados 82 casos. Em 2017, 28 casos haviam sido diagnosticados até julho (dados não publicados). Os municípios mais atingidos no estado são Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá e

Domingos Martins¹³. Com esses números, o Espírito Santo registra as maiores frequências de malária-bromélia conhecidas no país.

Sobre os agentes etiológicos, *P. vivax*, seguido do *Plasmodium malarie*, se destaca nas infecções humanas verdadeiramente autóctones no estado do Espírito Santo, segundo estudos do grupo de pesquisa da Unidade de Medicina Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo^{14, 32}. *Plasmodium vivax* é encontrado nos tóraces de diversas espécies de anofelinos presentes no bioma Mata Atlântica, segundo Rezende *et al.* (2009)³⁰, sugerindo a importância desse parasito na cadeia de transmissão da malária no estado. Cabe ressaltar que registros de *Plasmodium falciparum* causando malária autóctone no Espírito Santo estão relacionados aos surtos na região norte do estado. Os casos detectados lá, embora também sejam chamados de autóctones por definição epidemiológica, são decorrentes de infecções trazidas de fora (especialmente da região amazônica, onde a espécie persiste), ao contrário do que é observado na Mata Atlântica. Portanto, no presente nível de conhecimento, não é plausível admitir a ocorrência de malária sintomática causada por *P. falciparum* no ambiente da Mata Atlântica, como o é para os casos causados por *P. vivax*.

Apesar de estudos em andamento, ainda pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na cadeia de transmissão da malária residual de sistemas de Mata Atlântica do Espírito Santo. A existência de um reservatório dos parasitos ainda é uma questão a ser esclarecida, já que a incidência dos casos é baixa e a distância geográfica entre os indivíduos é relativamente longa. Hipóteses referentes a tal situação são a possibilidade da existência de portadores assintomáticos entre os habitantes da região ou a possibilidade da transmissão a partir de símios locais infectados. Estudos sistemáticos da endemia ainda são escassos, o que contribui para a ausência de informações a seu respeito. Com essa finalidade, desde 2001, investigações epidemiológicas têm sido realizadas na região.

O quadro apresentado acima é preocupante, uma vez que o Espírito Santo foi considerado receptivo para transmissão da malária por Meneguzzi *et al.* (2006)³³. Portanto, há a necessidade de maiores incentivos a pesquisa, de uma vigilância epidemiológica municipal mais efetiva, de apoio técnico e financeiro do governo do estado para os municípios que possuem deficiências estruturais e de apoio científico da Universidade e da Secretaria de Estado da Saúde.

2.3 Anofelinos de importância médica no Brasil

No Brasil, há grande variedade de mosquitos do gênero *Anopheles*. Dependendo do clima, das temperaturas, do relevo e do nível de urbanização, o comportamento desses insetos muda e isso se reflete na maneira como ocorrem as doenças por eles transmitidas.

Na região Amazônica, os principais vetores da malária pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*^{34, 35}:

- *A. (N.) darlingi* ROOT, 1926, é considerado vetor primário, altamente susceptível aos plasmódios humanos, responsável pela maioria dos casos de malária na região. Adapta-se facilmente a ambientes antrópicos e está presente em todo interior do território nacional, com exceção das regiões secas do Nordeste, do extremo sul e nas áreas de elevada altitude. Utiliza as grandes coleções líquidas para o desenvolvimento de suas formas imaturas, como lagoas, açudes, represas e bolsões formados nas curvas dos rios, onde há muito pouca correnteza. Seus criadouros são de águas limpas, profundas, pouco turvas e ensolaradas ou parcialmente sombreadas. Costuma atacar o homem dentro das casas, nas horas mais altas da noite³⁶.

- O *A. (N.) aquasalis* CURRY, 1932, é considerado o principal vetor na costa brasileira devido à sua preferência por águas salobras. É considerado um mosquito zoofílico e essencialmente crepuscular, atacando animais como vacas e cavalos, com mais intensidade que o homem. Também é um inseto exofílico, já que entra nas casas para picar apenas quando sua densidade está elevada, quando, então, passa a transmitir a malária. Sua atividade hematofágica em humanos também ocorre no início da noite³⁷.

- O Complexo *albitarsis* LYNCH-ARRIBÁLZAGA, 1878, reúne os anofelinos mais comuns e amplamente distribuídos no Brasil, não ocorrendo no ocidente sul-americano. Seus criadouros preferenciais são coleções de água doce limpa, preferencialmente em campos e pastagens ensolarados ou sombreados. Em algumas áreas do Brasil, os mosquitos deste complexo podem entrar nas casas e se alimentar no homem. Contudo, na maior parte do seu território, são decididamente zoofílicos e exofílicos. Preferem atacar animais, como equinos, a homens e aves. São vetores secundários que podem passar ao papel de vetores primários de acordo com

mudanças no uso da terra pela população humana. O complexo é formado por várias espécies: *A. albitarsis sensu strictu* (s.s.); *A. oryzalimnetes* ou espécie *B*, anteriormente distinguida somente usando a técnica *Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid - Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)*, difundido no Paraguai e, provavelmente, possuidor da distribuição geográfica mais ampla no Brasil (estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo); *A. marajoara* ou *albitarsis C*, encontrada no Paraguai, na Venezuela e no Brasil (Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e São Paulo); *A. deaneorum* ou *albitarsis D*, distribuída no norte da Argentina e no Brasil (Estados do Acre, Mato Grosso, Paraná e Rondônia), *A. janconnae* ou *albitarsis E*, encontrada no norte do Brasil (Estados do Amapá, Pará e Roraima) e na Venezuela; *A. albitarsis F*, na Colômbia, Venezuela e Trinidad; *A. albitarsis G*, exclusivo do Brasil (estados do Amazonas, Bahia e Pará); *A. albitarsis H*, também restrito ao Brasil (estados de Mato Grosso e Rondônia); *A. albitarsis I*, encontrado na Colômbia e na Venezuela. As mudanças no clima e na paisagem causadas pelo aquecimento global parecem facilitar a distribuição das espécies e, conseqüentemente, tornar os componentes do Complexo Albitarsis cada vez mais importantes como vetores da malária^{37, 38}.

Apesar dos *Nyssorhynchus* também povoarem as regiões fora da Amazônia, há espécies do subgênero *Kertezia* que ganham destaque na transmissão nos estados com casos de malária-bromélia. São elas:

- *A. (K.) cruzii* DYAR & KNAB, 1908 é restrito ao litoral brasileiro e à encosta do planalto, estendendo-se do Sergipe ao Rio Grande do Sul. Deposita os ovos na água que se acumula na base das folhas de alguns tipos de bromélias epífitas e terrestres, situadas em locais protegidos de raios solares. Sua densidade populacional está diretamente relacionada com a abundância dessas plantas e de elevados índices de umidade relativa do ar provocados pelas chuvas e pela lenta evaporação. Esse anofelino ataca, indiscriminadamente, o homem e outros animais e é encontrado picando tanto de dia como à noite, com forte aumento da atividade hematofágica no crepúsculo vespertino e nas primeiras horas da noite. É considerado vetor primário e importante no Brasil nos casos conhecidos como “malária-bromélia” ou malária RSMA. É considerado um inseto assinantrópico³⁹.

- *A.(K.) bellator* DYAR & KNAB, 1906 é encontrado apenas no litoral, sendo raro dentro das matas e abundante nas áreas abertas. Seus hábitos são

semelhantes aos do *A. (K.) cruzii*; eclético quanto aos hospedeiros, exofílico e acrodendrófilo. Difere por preferir procriar em bromélias rupestres, epífitas ou terrestres, mais expostas ao sol. Ao contrário do *A. (K.) cruzii*, prefere as bromélias maiores, que permitem o acúmulo de maior quantidade de água nos verticilos de suas folhas. O volume de líquido aí acumulado permite o desenvolvimento larvário, apesar da evaporação a que é submetido em decorrência da exposição ao sol. Ataca o homem em elevado número ao pôr-do-sol e só transmite a malária quando se encontra em elevada densidade³⁹.

- *A.(K.) homunculus* KOMP, 1937 tem uma distribuição geográfica descontínua. Tem sido encontrado em áreas montanhosas de baixa altitude, nas vertentes voltadas para o mar. Destaca-se pela preferência em procriar em bromélias de médio e pequeno porte, sombreadas, terrestres ou epífitas, situadas em baixa altura. Em ambientes com elevada nebulosidade, o *A. (K.) homunculus* é o anofelino mais encontrado picando o homem dentro das casas, embora seja genericamente bem mais comum no ambiente silvestre. É considerado vetor secundário ou local de malária no sul do Brasil, tendo sido encontrado infectado com oocistos e esporozoítos nas glândulas salivares³⁹.

2.4 Comportamento vetorial e sua relação com a transmissão da malária-bromélia

Em relação aos cenários de transmissão de malária autóctone, o comportamento dos vetores pode ajudar a explicar parte da transmissão não tradicional. A presença de vetores competentes, sua distribuição no espaço e seu comportamento no ambiente parecem estar diretamente relacionados com a dispersão da malária autóctone. Frente à discussão sobre a malária-bromélia, são apresentadas nesta sessão as características vetoriais relacionadas a esta transmissão.

A acrodendrofilia, característica comportamental dos mosquitos do subgênero *Kerteszia*, em especial do *A. (K.) cruzii*, refere-se à preferência deste vetor em praticar a hematofagia na copa das árvores⁴⁰, descendo ocasionalmente ao solo, o que resulta na realização de repastos nas duas alturas da floresta. Segundo Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994)⁴⁰, essa preferência se explica pelo fato destes mosquitos se

reproduzirem dentro de bromélias localizadas sob à sombra das copas das árvores, protegendo-os dos raios solares e evitando a evaporação da água contida no interior das plantas. Rezende e colaboradores (2009)³⁰, em estudo realizado entre 2004 e 2005 na região montanhosa do Espírito Santo em que fizeram captura sistemática de anofelinos em diversos ambientes da floresta, encontraram a maior diversidade de espécies no peridomicílio. *Anopheles (K.) cruzii* foi capturado apenas no interior da floresta e se mostrou acentuadamente acrodendrofílico, uma vez que 90,8% dos espécimes foram capturados na copa das árvores. Em um segundo momento, na mesma região, os autores demonstraram novamente a acrodendrofilia do *A. (K.) cruzii*, tão mais acentuada quanto mais no interior da floresta. A razão entre espécimes capturados na copa e no solo foi de 799/4 no interior da floresta e de 142/29 em sua margem³¹.

Os representantes do subgênero *Kerteszia* também possuem comportamento assinantrópico, ou seja, são praticamente ausentes no ambiente antrópico e condicionam a sua presença no domicílio exclusivamente ao repasto sanguíneo sob condições excepcionais, geralmente ocasionadas pela invasão do homem no meio silvestre. Em estudo de Guimarães *et al.* (2000)²³, *A. (K.) cruzii*, foi encontrado nas proximidades ou dentro dos domicílios realizando a hematofagia, o que, segundo os pesquisadores, demonstrava certa atração dessa espécie pelo homem. Forattini *et al.* (1990)²⁰ descreveram a capacidade do *A. (K.) cruzii* em migrar alternadamente entre o ambiente silvestre e o peridomicílio. Ainda, segundo observações de Guimarães *et al.* (2000)²³, apesar de discreta antropofilia, *A. (K.) cruzii* se associa fundamentalmente com o meio silvestre já que não permanece nas residências após o repasto sanguíneo. O mesmo autor já havia observado estas características anteriormente⁴¹, corroborando o que havia sido estabelecido por Forattini *et al.* (1993a)²¹. Dessa forma, a presença do *A. (K.) cruzii* em domicílios estaria unicamente relacionada com a proximidade entre as habitações e o ambiente silvestre^{23, 42}.

2.5 Malária-bromélia: zoonose originada da malária símia?

Nas regiões onde a transmissão de malária-bromélia desperta interesse especial, há dúvidas sobre a existência de possíveis reservatórios do parasito. Segundo Alvarenga *et al.* (2017)⁴³, a elucidação da questão da presença de

reservatórios pode ter implicações importantes para a saúde pública, já que compromete o controle da malária e os esforços de erradicação.

Os casos humanos autóctones de malária são registrados em regiões onde macacos também são encontrados infectados. A hipótese da participação de símios que tem o bioma Mata Atlântica como *habitat* são reforçados pelo fato de que os parasitos causadores da malária nesses animais possivelmente são os mesmos causadores da malária-bromélia humana. Em circunstâncias ecológicas favoráveis, os símios se tornariam reservatórios em potencial dos *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium*, indistinguíveis geneticamente de seus representantes humanos *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente^{18, 44}.

Plasmodium simium é encontrado infectando primatas não-humanos dos gêneros *Allouata*, *Cebus*, *Sapajus* e da espécie *Brachyteles arachnoides* das regiões Sul e Sudeste do Brasil cobertas por Mata Atlântica. Já *P. brasilianum*, que é geograficamente mais distribuído, pode ser encontrado em mais de 35 espécies de símios em países das Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil⁴⁵⁻⁴⁸.

Após o primeiro relato de uma infecção natural de *P. simium* em um ser humano⁴⁵, a identidade entre *P. simium* e *P. vivax* foi estabelecida muitas vezes: 1) por estudos sobre a proteína CSP no início dos anos 1990⁴⁹; 2) por análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene do citocromo *b* do genoma mitocondrial⁵⁰; 3) por polimorfismos de microssatélites⁵¹; 4) novamente por variações da CSP⁵² e 5) pelo sequenciamento do gene *Msp-1*⁵³. Apesar das evidências, Brasil *et al.* (2017) sugeriram a utilização de dois polimorfismos de base única (SNP) para diferenciar *P. simium* de *P. vivax*, no contexto de sequências completas do genoma mitocondrial.

A similaridade genética entre *P. brasilianum* e *P. malariae* também vem sendo reforçada, inclusive por estudos recentes que sequenciaram o gene da subunidade ribossomal 18S DNAr⁴⁸ e por pesquisadores que, além do 18S DNAr, sequenciaram o gene CSP e obtiveram 100% de correspondência entre as amostras humanas e símias⁵⁴. Por microssatélites, também foi evidenciada a identidade genética entre *P. brasilianum*/*P. malariae* circulantes em diferentes hospedeiros⁵⁵. Lalremruata *et al.* (2015)⁵⁴ demonstraram que macacos infectados podem transmitir naturalmente *P. brasilianum* para humanos. Sugerem ainda que haja mudança na nomenclatura

dessas espécies, uma vez que a análise filogenética do estudo identificou um único clado monofilético, sem mutações que as diferenciasssem⁵⁶.

Além da similaridade genética entre as espécies de plasmódios citadas acima, Duarte *et al.* (2008)¹⁸ apontam outras evidências sobre o papel dos símios como reservatórios do parasito: a) presença de parasitos e anticorpos anti-plasmódios em símios em área onde ocorre malária-bromélia humana; b) a grande variedade de vetores transmissores de malária nessas regiões; c) o destaque das infecções autóctones por *P. vivax* e *P. malariae* no Espírito Santo e São Paulo; d) *A. (K.) cruzii* e *Anopheles (Nyssorhynchus) evansae* conseguem transmitir malária para símios e humanos em São Paulo e no Espírito Santo, respectivamente. Mais tarde, em 2013, o mesmo grupo de pesquisa revelou, em São Paulo, a presença de *A. (K.) cruzii* positivo para *P. malariae* em zona silvestre e *A. (N.) strodei* e *A. (N.) trianulatus* positivos para *P. malariae* nas zonas antrópicas, sugerindo que o *P. malariae* participa do ciclo de malária símia, podendo concomitantemente ser transmitido para seres humanos⁵⁷.

Evidências moleculares e sorológicas apresentadas por diferentes estudos sugerem que a malária-bromélia é altamente relacionada a atividades humanas realizadas perto do ambiente da floresta^{12, 58, 59}. Além disso, a incidência da doença é baixa e os surtos são raros¹⁴. Considerando as características apresentadas acima e o fato de que os parasitos albergados por símios locais são geneticamente indistinguíveis daqueles encontrados no sangue humano, a hipótese de um cenário zoonótico para a malária-bromélia apresenta um fundamento sólido^{18, 60-65}. A busca pela confirmação do argumento que pretende colocar a malária em um patamar de zoonose pode mudar as ações de prevenção e controle da doença, que, atualmente, é considerada uma antroponose pelos órgãos de saúde.

Mesmo com a diversidade de evidências científicas que sustentam a hipótese de zoonose, permanece o debate sobre a direção da transferência dos parasitos. Costa (2014)⁶⁶, quando comparou a variabilidade genética em estudos baseados na proteína de ligação de *Duffy* de eritrócitos coletada de símios da espécie *Alouatta guariba*, sugeriu que o parasito símio teria se originado de sua contraparte humana. Tal constatação foi reforçada por Rodrigues *et al.* (2014; 2018)^{67, 68} que encontraram variabilidade genética limitada entre *P. simium* e *P. vivax*.

2.6 Epidemiologia molecular aplicada a estudos sobre o gênero *Plasmodium*

Nos últimos anos, observou-se um fluxo de estudos de malária que aplicam abordagens de epidemiologia molecular para compreender a estrutura genética e a diversidade das populações de plasmódios no contexto do controle e da eliminação da doença⁶⁹.

Estudos de prevalência e incidência, geralmente baseados em microscopia óptica ou em testes rápidos, vem sendo complementados por abordagens moleculares. Rompendo a barreira do diagnóstico laboratorial, a biologia molecular vai além e permite a análise do material genético dos parasitos. O sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* ou DNA) isolado de dentro ou de fora do núcleo, como o mitocondrial, traz informações fundamentais sobre a história do parasito. Com as diversas ferramentas disponíveis, autores conseguiram determinar a estrutura populacional de parasitos em várias regiões do globo, conhecer a procedência de infecções e estabelecer rotas migratórias de *Plasmodium* spp.^{67, 68, 70, 71}.

Logo, percebe-se que a nova abordagem ultrapassa a função de agregar mais sensibilidade e especificidade às expectativas tradicionais dos estudos epidemiológicos. Isso porque é capaz de revelar dados evolutivos, origem de transmissão, alternância entre diferentes hospedeiros, capacidade de migração e dispersão das populações de parasitos, além de abrir caminhos para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas^{66, 72, 73}.

2.6.1 Detecção de DNA como recurso para diagnosticar infecções por *Plasmodium* spp.

O estabelecimento de um diagnóstico de malária é difícil quando se conta apenas com os aspectos clínicos, especialmente nos casos de malária-bromélia. Isso porque geralmente os sinais e sintomas são inespecíficos e podem remeter o profissional de saúde a outras doenças. Altamente difundido, o exame de gota espessa ainda se destaca como sendo o padrão-ouro segundo o Ministério da Saúde, no Brasil⁷⁴. A técnica é classificada como exame direto já que o microscopista consegue ver as formas evolutivas do parasito infectando as células sanguíneas do

indivíduo. Além de servir para diagnóstico humano da malária, pode ser utilizada também em pesquisas com símios ou outros tipos de animais de porte médio a grande dos quais seja possível coletar amostras de sangue fresco. Apesar da evolução dos métodos de diagnóstico ao longo das últimas décadas, a microscopia ainda é a técnica mais utilizada, especialmente nos trabalhos de campo, apesar da sensibilidade limitada nos casos de baixa parasitemia ou infecções mistas e da necessidade da microscopistas altamente capacitados para leitura das lâminas ^{13, 32, 75-77}.

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares, no entanto, a capacidade de detecção dos parasitos aumentou consideravelmente. A clássica gota espessa é capaz de detectar em média 100 parasitos por mL de sangue, sendo que as maiores taxas são encontradas em condições de campo, dependendo das características da população de estudo⁷⁸⁻⁸¹. Comparativamente, essa detecção vai de aproximadamente cinco a 12 parasitos por mL quando o diagnóstico é feito molecularmente⁸². Os testes moleculares conseguem detectar a presença de DNA de plasmódio mesmo em pouquíssima quantidade de material biológico, o que inclui material proveniente de insetos, como os vetores do gênero *Anopheles*, material de lâminas coradas com a técnica de gota espessa e até em saliva ou urina⁸³⁻⁸⁷.

Técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou *PCR*) são amplamente utilizadas, especialmente em laboratórios de pesquisa. Pelo alto custo de execução e, dependendo da escolha, pela demora para obtenção do resultado, a utilização para o diagnóstico em pacientes se torna restrito^{76, 88}.

Para atender às diferentes demandas científicas, desde do final dos anos 1980, a tecnologia caracterizada pela amplificação de material genético de interesse contido na amostra vem se desenvolvendo rapidamente⁸⁹. *PCRs* convencionais, *nested-PCR*, *multiplex-PCR* e *PCR* em tempo real são algumas das opções para atingir este objetivo. Por isso, são muito utilizadas para diagnosticar a presença de agentes infecciosos, como o da malária, e seu valor reside na alta sensibilidade.

Pesquisadores como Kimura *et al.* (1997)⁹⁰, Rubio *et al.* (1999; 2017)^{91, 92} e Win *et al.* (2002)⁹³, por exemplo, desenvolveram protocolos amplamente utilizados baseados na amplificação de sequências de DNA para a codificação de RNA ribossomal (DNAr) nuclear. O alvo são os genes que originam a subunidade 18S dos ribossomos (18S RNAr)⁹⁴. Os genes de RNAr são altamente conservados, enquanto os espaçadores internos tem sequências de nucleotídeos variáveis e se mostram

específicos para cada espécie⁹⁵. Devido ao seu elevado número de cópias no genoma e ao mosaico de regiões conservadas e variáveis, os genes que codificam a subunidade 18S de RNAr se tornaram um dos melhores alvos moleculares para identificação e quantificação do gênero *Plasmodium* e suas espécies⁹⁶. As funções da porção variável são pouco conhecidas. No entanto, o interesse por elas reside no fato de conterem a assinatura molecular de cada espécie e, assim, fornecem informações valiosas tanto para o diagnóstico quanto para a taxonomia⁹⁷. Além disso, uma característica do gênero é ter uma sequência diferente desses genes para cada forma evolutiva, permitindo que também este aspecto seja estudado⁹⁷.

As reações se baseiam na detecção do gênero *Plasmodium* na amostra, seguida de detecção da espécie causadora da infecção, geralmente pela técnica de *nested-PCR*. Por ser uma técnica demorada, em dois passos, é passível de uso somente com finalidade de pesquisa. Protocolos adaptados para a modalidade de *PCR* em tempo real, no entanto, trouxeram mais rapidez e praticidade ao uso desse importante marcador. Tais protocolos exigem apenas a preparação de uma solução, inserida num equipamento automatizado ligado ao computador para que, em poucas horas, o resultado possa ser verificado. Além disso, permite a quantificação do material genético do parasito contido na amostra.

Recentemente, técnicas de amplificação de genes mitocondriais também foram sugeridas. Trabalhos como os de Putaporntip *et al.* (2011)⁹⁸, Ghayour Najafabadi *et al.* (2013)⁹⁹ e Isozumi *et al.* (2015)¹⁰⁰ utilizaram genes de citocromo *b* (*cyt b*) e citocromo *c* oxidase III (*COX III*) como alvo para determinação de infecção por espécies diferentes de plasmódios em amostras de sangue e, também, em urina e saliva. Apesar de ditos mais sensíveis e específicos do que os protocolos referentes ao 18S RNAr, sendo, muitas vezes, feitos em apenas uma etapa^{75, 101}, ainda não são amplamente difundidos.

2.6.2 Marcadores moleculares e aplicações práticas nos estudos epidemiológicos sobre malária

Nos últimos anos, o estudo minucioso do material genético dos plasmódios vem revelando informações como a presença de infecções mistas, a resistência dos parasitos a drogas e a origem geográfica e temporal de certas espécies^{102, 103}.

Marcadores genéticos como os *SNP*, microssatélites, *loci* antigênicos [proteína principal de superfície de merozoíto 1 (*MSP1*), proteína de superfície de merozoíto 3-*alpha* (*MSP3a*), proteína de superfície de merozoíto 3 *beta* (*MSP3b*), proteína circunsporozoíta (*CSP*)] e sequências completas de genomas, como o mitocondrial, são amplamente utilizados^{66, 104-107}. As diferentes classes de marcadores fornecem informações populacionais e evolutivas dos parasitos em diferentes escalas de tempo e espaço, mas também informam se novos genótipos de parasitos de alta virulência e resistência a medicamentos estão emergindo e se espalhando pelo mundo^{106, 108}. Portanto, a escolha do marcador depende da pergunta-chave de um estudo epidemiológico¹⁰⁶.

Para medir o número de clones diferentes presentes em uma amostra, determinar a taxa em que novas infecções são adquiridas ou para diferenciar recaídas de novas infecções frente à eficácia de certas drogas, marcadores altamente polimórficos com alelos em frequências moderadas, como *loci* antigênicos e microssatélites extremamente diversos, são utilizados. *Loc*i menos polimórficos ou neutros, tais como microssatélites com uma alta frequências de alelos e *SNP*, são mais suscetíveis às mudanças de tamanho da população e à deriva genética e, portanto, são adequados para medir mudanças na estrutura da população estudada¹⁰⁶.

O genoma mitocondrial, por sua vez, é o marcador de escolha para reconstruir as histórias evolutivas das espécies e para estudos filogenéticos. Isso porque esse genoma extranuclear possui alta taxa de mutação, herança materna e transmissão genética direta levando a ausência de recombinação^{66, 106, 108}. Dentre as características peculiares do genoma mitocondrial dos parasitos da malária, se destacam seu tamanho pequeno (com aproximadamente 6 kilobases), o fato de ser haplóide e a presença de apenas três genes codificadores de proteína: citocromo c oxidase I (*COXI*), citocromo c oxidase III (*COXIII*) e citocromo b (*cytb*)¹⁰⁸.

A demonstração de que as sequências mitocondriais não são recombinantes as torna uma ferramenta de genotipagem protegida dos efeitos de diluição de informações pela recombinação ou seleção genética. A singularidade dessas sequências gera uma identificação altamente específica¹⁰⁹. Portanto, o genoma inteiro se comporta como um único *locus* e todos os *loci* compartilham uma genealogia

comum, tornando-o ideal para estudar variações dentro de uma mesma espécie do gênero *Plasmodium*¹⁰⁸.

Casos que geram grandes questionamentos na comunidade científica, como a similaridade entre *P. vivax* e *P. simum*, vem sendo abordados sob a ótica do genoma mitocondrial. Baseando-se em sequências completas de 6kb isoladas de símios e humanos, Jongwutiwes *et al.* (2005)¹¹⁰ e Cornejo e Escalante (2006)¹¹¹ demonstraram a identidade genética entre as duas espécies, que também são morfologicamente indistinguíveis. Recentemente, Brasil *et al.* (2017)¹¹² e Rodrigues *et al.* (2018)⁶⁷, também com amostras de primatas humanos e não humanos, sequenciaram genomas mitocondriais completos desses parasitos em busca de respostas sobre qual seria a origem das infecções na região endêmica de Mata Atlântica no Brasil. Isso porque, conforme descrito na sessão anterior, nessa região existem evidências que indicam que a malária-bromélia possa ter se estabelecido como uma zoonose. Para melhor compreensão do que de fato ocorre, os estudos acima citados propõem que dados sobre o DNA circular de mitocôndrias originadas de parasitos infectando os vetores responsáveis pela suposta transmissão homem-símio devam ser devidamente caracterizados.

A origem geográfica de *P. vivax*, a espécie do gênero *Plasmodium* mais dispersa pelo mundo, também é motivo de investigação e o genoma mitocondrial completo ou parcial, ajuda a estabelecer a história. Analisando os haplótipos gerados por Cornejo e Escalante (2006)¹¹¹ em conjunto com dados de outros estudos envolvendo amostras de todo mundo^{110, 113}, Culleton *et al.* (2011)¹¹⁴ sequenciaram mais de 40 isolados africanos e conseguiram fazer diversas inferências sobre o assunto. A partir da alta diversidade de haplótipos encontrada, concluíram que o Sudeste Asiático seria o ponto de origem da espécie. Apesar dessas evidências, também utilizando o genoma mitocondrial do *P. vivax*, Liu *et al.* (2014)¹¹⁵ sugeriram recentemente que o parasito não surgiu na Ásia, mas que, na verdade, aquele continente representou um gargalo para uma linhagem que escapou da África antes da propagação do genótipo *Duffy* negativo que tornou os seres humanos africanos resistentes a tal espécie¹¹⁵. Levando em consideração a perspectiva de Culleton *et al.* (2011)¹¹⁴, a América do Sul foi considerada o local mais recentemente colonizado por *P. vivax*, já que, neste último continente, a diversidade genética observada foi relativamente baixa quando comparada a de outras regiões. Esses dados corroboram

os achados de Taylor *et al.* (2013)¹¹⁶, que geraram redes haplotípicas e árvores filogenéticas combinando sequências mitocondriais de novas amostras americanas com outras previamente sequenciadas pelo mundo.

Acredita-se, diante do exposto, que a utilização dos marcadores moleculares tem potencial para melhorar a abordagem dos casos e reduzir o risco de epidemias. Por isso, segundo Preston *et al.* (2014)¹⁰⁹, parecem ser instrumentos valiosos para as instituições ligadas a programas de eliminação de malária e contenção de resistência a medicamentos, por exemplo, já que, numa escala global, a migração de parasitos ameaça a eliminação da doença e a eficácia dos tratamentos. Ao mapear as diferenças genômicas e disponibilizar os dados obtidos, os trabalhos que vêm surgindo introduzem novos conhecimentos sobre a extensão da interconexão entre espécies de plasmódios em todo o mundo e permitem inferências sobre as dinâmicas de transmissão, tratamento e prevenção da malária¹⁰⁹.

3 JUSTIFICATIVA

No contexto da malária, estudos entomológicos e epidemiológicos têm sido extremamente valorizados, uma vez que características pontuais dos participantes da transmissão da doença estão sendo reveladas sob novas ópticas. O tradicional trabalho de campo viabiliza o contato direto dos pesquisadores com os objetos de estudo, promovendo, assim, maior sensibilidade quanto ao entendimento da dinâmica das infecções e respeito aos componentes orgânicos extraídos do ambiente estudado. Completando essa abordagem, o conteúdo científico resultante da contínua evolução e criação de técnicas moleculares promove reflexões cada vez mais profundas e diversificadas tanto sobre as origens quanto sobre o futuro das infecções por *Plasmodium* spp.

Segundo Mann *et al.* (2015)¹¹⁷, intervenções e medidas de controle só são eficazes quando todos os fatores envolvidos na transmissão são conhecidos com precisão. Sob esse ponto de vista, estudos em lugares onde ainda há dúvidas sobre a real origem dos casos autóctones devem buscar o máximo de detalhes, tendo em vista a composição do todo. A coleta sistemática de vetores *in loco* e a análise do material genético de parasitos envolvidos nas infecções podem ter enorme utilidade para os órgãos de saúde estabelecerem a prevenção e o controle da endemia.

No Espírito Santo, tal quadro é registrado nos municípios da região montanhosa ainda coberta por floresta da Mata Atlântica. O município de Santa Teresa ganha destaque nos estudos desenvolvidos no estado já que, além de albergar o maior número de casos de malária-bromélia, é o local onde foi instalada a estação de captura permanente de anofelinos, pelo Núcleo de Malacologia e Entomologia do Espírito Santo (NEMES/SESA). A presença de plasmódios em símios, em humanos e em *A. (K.) cruzii* confere à doença evidências de zoonose, especialmente pelo dilema da improvável distinção entre *P. vivax* e *P. simium* e também devido à alta densidade de vetores sabidamente acrodendrofilicos e assinantrópicos. Neste cenário, o modelo de uma suposta zoonose exigiria um comportamento vetorial constante e estável, devendo ser avaliado repetidamente ao longo dos anos para estabelecer as características da transmissão. Sob a óptica dos genomas mitocondriais, já existem sequencias disponíveis de *P. vivax/simum* provenientes de infecções humanas e símias de outras regiões com malária-bromélia, mas não do Espírito Santo. Além

disso, tal espécie do parasito encontrada em mosquitos do gênero *Anopheles* ainda não teve seu genoma mitocondrial sequenciado no Brasil. A fim de verificar as variações genéticas entre os parasitos circulantes na região, a caracterização molecular de *P. vivax/simium* com base no sequenciamento do genoma mitocondrial de isolados de hospedeiros humanos e simios do estado, e, de forma inédita, dos vetores em uma área endêmica da Mata Atlântica brasileira parece ser altamente informativa. Além disso, a comparação desses com genomas já conhecidos de outras regiões do país possibilita a criação de redes de haplótipos e árvores filogenéticas que, conectando as sequencias idênticas e distanciando as diferentes, possibilita a visualização da distribuição do parasito desse tipo de malária no Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atual situação do cenário de transmissão da malária na região de Mata Atlântica do Espírito Santo, frente à hipótese de um modelo de zoonose, a partir da verificação do comportamento vetorial e da comparação do genoma mitocondrial completo de isolados de *Plasmodium* spp. que infectam humanos, símios do gênero *Allouata* e mosquitos do gênero *Anopheles*.

4.2 Objetivos específicos

- Reavaliar o comportamento vetorial de anofelinos em área de malária residual de sistemas de Mata Atlântica no Espírito Santo;
- Verificar a taxa de infecção por parasitos do gênero *Plasmodium* nos mosquitos fêmea coletados;
- Determinar a sequência genômica do DNA mitocondrial completo de *P. vivax/simium* encontrado nos mosquitos coletados, em humanos e em símios infectados na região rural endêmica de Mata Atlântica do Espírito Santo;
- Demonstrar a relação genética entre os DNA mitocondriais sequenciados dos parasitos originados dos diferentes hospedeiros e *habitats*, por meio de redes de haplótipos e árvore filogenética.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Descrição da área

O estudo foi realizado na área rural do município de Santa Teresa, que se localiza a aproximadamente 78 km de Vitória, no estado do Espírito Santo. A estação de captura permanente encontra-se na localidade de Valsugana Velha (19°57'58.4" S, 40°34'45.2" W), onde foram registrados casos de malária residual de sistemas de Mata Atlântica no estudo de Cerutti *et al.* (2007)¹³.

5.2 Coleta de anofelinos

Foram realizadas capturas horárias de anofelinos em uma estação permanente de captura localizada na área de transmissão da malária-bromélia. Tais capturas foram realizadas um dia por mês, durante um ano, de junho de 2014 a maio de 2015, totalizando 12 coletas. Dois métodos de captura foram utilizados:

- Armadilhas luminosas CDC com CO₂¹¹⁸ que foram instaladas nas áreas abertas, na margem da floresta (copa e solo) e no interior da floresta (copa e solo). Os insetos eram atraídos pela luz e pelo CO₂, e, de forma passiva, eram sugados para um recipiente anexo ao motor da armadilha;
- Armadilhas luminosas de *Shannon*¹¹⁹, instaladas na margem da floresta. Por meio de captura ativa, os coletadores utilizavam aspiradores de borracha e sugavam os insetos de interesse que pousavam na tenda branca iluminada.

As cinco armadilhas do tipo CDC foram instaladas simultaneamente, com duas delas sendo erguidas a 15 metros de altura na copa das árvores (na margem e no interior da floresta), duas erguidas a um metro do solo (na margem e no interior da floresta) e uma colocada no limite entre a floresta e a área próxima às habitações, no peridomicílio (PD). Por esse método, as capturas duraram 12 horas, sendo as armadilhas colocadas à noite (18:00, horário oficial brasileiro) e retiradas pela manhã (6:00, horário oficial brasileiro). Nas armadilhas de *Shannon*, os membros da equipe realizaram as capturas ao longo das quatro primeiras horas após o crepúsculo (aproximadamente de 18:00 às 22:00, horário oficial brasileiro), a cada mês.

5.3 Armazenamento e identificação dos insetos

Os espécimes foram guardados em tubos contendo isopropanol e, posteriormente, foram identificados pelas chaves propostas por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994)³⁹. A identificação inicial foi feita pela equipe do Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo (NEMES/ES) e revisada pela equipe do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/USP).

5.4 Determinação da infecção dos anofelinos

O DNA para detecção de *Plasmodium* spp. foi obtido a partir do agrupamento dos mosquitos em *pools* (máximo de 10 amostras/*pool*) de tórax, abdome ou mosquito inteiro, dependendo do subgênero dos espécimes. Foram seccionados os do subgênero *Nyssorhynchus* e processados inteiros os pertencentes ao subgênero *Kerteszia*. O mesmo kit de extração (*DNeasy Blood & Tissue Kit*, Qiagen) foi utilizado, seguindo as orientações do fabricante. Cada *pool* incluía fêmeas da mesma espécie, coletadas em um mesmo tipo de armadilha, na mesma data.

A detecção da presença de *P. vivax* ou *P. malariae* nos *pools* foi baseada no protocolo de *nested*-PCR descrito por Kimura *et al.* (1997)⁹⁰ e modificado por Win *et al.* (2002)⁹³. O alvo foi o gene que codifica a subunidade ribossomal 18S DNAr. A primeira reação foi realizada em volume final de 20 µl, contendo 0,8 µl de cada primer P1UP e P2 (10 µM) (Quadro 1), 0,25 µl de dNTP (20 mM mix), 2 µl tampão 10x PCR, 0,16 µl de *Taq* DNA polimerase (5U/ µl) e 5 µl de DNA e foi incubada em termociclador “Eppendorf” de acordo com o seguinte protocolo: um ciclo de 92° C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de 92° C por 30 segundos, 60° C por 90 segundos e um ciclo de 60° C por cinco minutos. O produto da primeira reação foi diluído à razão de 1:50 em água estéril e submetido à segunda reação com o primer P1 (gênero-específico) em combinação com um primer reverso espécie-específico (V1 e M1 – Quadro 1), testados separadamente. O volume final da reação foi de 20 µl, contendo 2 µl de cada primer (10 µM), 0,62 µl de dNTP (20 mM mix), 2 µl tampão 10x PCR, 0,16 µl de *Taq* DNA polimerase e 2 µl do produto da primeira reação. O protocolo da segunda reação foi de um ciclo de 92° C por dois minutos, seguido de 18 ciclos de 92° C por 30 segundos, 60° C por um minuto e um ciclo de 60° C por cinco minutos. Os produtos

amplificados da segunda reação corresponderam ao fragmento espécie-específico do gene 18S DNAr de *P. vivax* e *P. malariae*, com aproximadamente 100 pares de base (pb).

Em todas as reações, foi utilizado controle negativo, contendo todos os reagentes menos o DNA, e controle positivo, contendo DNA de plasmódio correspondente aos *primers* correlatos. A revelação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob luz ultravioleta. Em casos positivos, fragmentos do tamanho de 100 pb eram amplificados.

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores utilizados para detecção de DNA de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* na reação de nested-PCR⁹³ (WIN et al., 2002).

Iniciador	Sequência (5' – 3')
P1UP	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG
P2	GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT
P1	ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT
V1	CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA
M1	GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT

Fonte: Protocolo de PCR convencional para detecção de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* por gene 18S DNAr do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

5.5 Amostras provenientes de seres humanos e símios

Amostras de DNA extraído do sangue de 22 casos de malária causada por *P. vivax*, inicialmente detectados em gota espessa, procedentes da região endêmica, foram incluídas nas análises¹³. Além disso, também foram incluídas amostras de um símio do gênero *Allouata* infectado, coletadas em 2009 em Valsugana Velha.

5.6 Amplificação por PCR e sequenciamento do genoma mitocondrial completo

Seguindo o protocolo proposto por Rodrigues *et al.* (2014)⁶⁶ houve amplificação do genoma mitocondrial completo (6 kb) de *P. vivax/simum* das 22 amostras provenientes de sangue humano total. Para amplificação das amostras provenientes de mosquitos e símio, um novo protocolo precisou ser desenvolvido. Foram desenhados 14 pares de *primers* (Pvm1F/Pvm1R a Pvm14F/Pvm14R – Tabela 1, Artigo 02) pelo software *Primer3* para a amplificação, em 14 fragmentos, do genoma

mitocondrial total dos parasitos ali presentes. A reação foi feita por PCR convencional, usando, para cada amostra testada, 0,5 uL da enzima *Taq* DNA polimerase (5,0 U/ μ l) (*Fermentas*), 2,0 ul de DNA extraído, 0,5ul de cada primer [5.0 μ M], 2ul de tampão para a *Taq* DNA polimerase (com KCl), 0,6 ul de deoxirribonucleosídeos (dNTP mix) (2,0 mM cada) e 1,6 ul de $MgCl_2$ (25,0 mM). A reação apresentou volume final de 20ul. A PCR foi realizada no termociclador GeneAmp PCR 9700 (*Applied Biosystems*), com uma desnaturação inicial a 95° C por um minuto, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 95° C por 15 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 minutos. A fase final de extensão foi feita a 72° C por cinco minutos. Os produtos da PCR foram purificados com o kit *Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare Biosciences*) e sequenciados usando *BigDye kit* (*Applied Biosystems*) no sequenciador de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*), pelo método de Sanger¹²⁰. Os fragmentos foram concatenados gerando o genoma mitocondrial completo pelo software *DNASTAR* (versão 8.1.13) e as sequências foram depositadas na base de dados *GenBank*. A probabilidade posterior Bayesiana (BPP) $\geq 95\%$ foi considerada significativa. A árvore de consenso foi visualizada usando o programa *FigTree* (versão 1.4.2).

5.7 Considerações éticas

Todos os indivíduos que participaram do estudo de Cerutti *et al.* (2007)¹³ foram submetidos a questionários trimestrais e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do início das coletas (aprovação CEP/UFES – ANEXO C). A amostra de símio e as dos mosquitos foram coletadas mediante autorização do IBAMA/SISBIO (n° 2508929).

5.8 Análise estatística

Para determinar a importância e a distribuição das diversas espécies de anofelinos, foram feitas análises de diversidade, dominância e abundância por meio do índice de diversidade de Shannon e do índice de dominância de Simpson. Nas diversas comparações, o nível de significância considerado foi de 5%. Cálculos de correlação bivariada foram utilizados para determinar a relação entre a captura de

anofelinos, temperatura e pluviosidade (dados fornecidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER), também com nível de 5%.

As sequências de genoma mitocondrial completo foram alinhadas no programa *ClustalX* (versão 2.1) e editadas manualmente no programa *MEGA* (versão 7.0). A rede de haplótipos por *median-joining*¹²¹ foi gerada pelo programa *Network* versão 4.6 (*Fluxus Technologies*) com seus parâmetros padrão. Essa análise foi feita com as amostras sequenciadas neste estudo (29 amostras) e com mais 149 sequências brasileiras de genoma mitocondrial completo, tanto de *P. simium* (total de 10 símios) quanto de *P. vivax* (139 humanos de Mata Atlântica e de floresta Amazônica), disponíveis no *GenBank* (*NCBI*). Para a construção das redes de haplótipos, foram utilizados dois conjuntos de dados distintos: um com todas as sequências brasileiras e outro apenas com amostras do Espírito Santo. No caso da árvore filogenética, apenas o conjunto de dados completo foi utilizado.

6 RESULTADOS

Dois artigos científicos completos com resultados deste estudo foram publicados nos periódicos “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” (MIOC; ISSN 1678-8060/fator de impacto 2.605/Qualis CAPES B2 – Medicina II) e “Malaria Journal” (MJ; ISSN 1475-2875/fator de impacto 2.715/Qualis CAPES A2 – Medicina II).

Nesta sessão, seguindo a ordem cronológica de obtenção dos resultados (Artigo 01, publicado no MIOC e Artigo 02, publicado no MJ), os trabalhos serão apresentados em português, mas as versões originais em inglês podem ser encontradas na sessão ANEXOS (ANEXO A e ANEXO B, respectivamente), ao final da tese.

6.1 Artigo 01

Caracterização ecológica e infecção por *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) em uma região de Mata Atlântica do Sudeste brasileiro após 10 anos: o comportamento do vetor da malária autóctone mudou?

Julyana Cerqueira Buery[∞], Helder Ricas Rezende[♠], Licia Natal^º, Leonardo Santana da Silva[∞], Regiane Maria Tironi de Menezes^ω, Blima Fux[∞], Rosely dos Santos Malafronte^º, Aloisio Falqueto[∞], Crispim Cerutti Junior^{∞*}

[∞]Universidade Federal do Espírito Santo, Unidade de Medicina Tropical, Vitória, ES, Brasil;

[♠]Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil;

^ºUniversidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil;

^ωSuperintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor correspondente

RESUMO

INTRODUÇÃO: No Sul e Sudeste do Brasil, casos de malária autóctone podem ser encontrados próximos a fragmentos de Mata Atlântica. Considerando que há pontos

obscuros quanto à transmissão da doença, a observação do comportamento dos possíveis vetores nessas regiões se faz necessária. Um estudo entomológico e de infecção natural foi realizado em anofelinos (Diptera: Culicidae) capturados nos municípios da região montanhosa do estado do Espírito Santo em 2004-2005. De maneira semelhante, entre os anos de 2014-2015, 12 capturas mensais foram realizadas, na estação de captura permanente do estudo acima citado (Valsugana Velha, Santa Teresa, ES). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Armadilhas luminosas com CO₂ (CDC-CO₂) foram instaladas nas áreas abertas, na margem da floresta (copa e solo) e no interior da floresta (copa e solo), e armadilhas *Shannon* foram instaladas na margem da floresta. **RESULTADOS:** Foram capturados 1.414 anofelinos distribuídos em 13 espécies. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar&Knab continuou sendo a espécie mais capturada em CDC-CO₂ instalada na copa da mata e foi também o vetor com maior prevalência de infecção por *Plasmodium vivax*, de acordo com técnicas moleculares de PCR. **CONCLUSÃO:** Em relação aos mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, *P. vivax* foi encontrado apenas em abdômes, enfraquecendo a possibilidade de que tal subgênero também atue na transmissão de malária nessa região específica.

INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma doença de grande expressão na região Amazônica, a malária permanece residual nas florestas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Nessas regiões, a doença é conhecida como malária-bromélia, já que os vetores do gênero *Anopheles* se reproduzem nos verticilos das *Bromeliaceae*, plantas típicas desse bioma (Downs & Pittendrigh 1946). A presença de poucos casos humanos autóctones (por vezes, assintomáticos), a distância espacial entre os casos e a baixa parasitemia à microscopia enfraquecem a possibilidade de uma cadeia de transmissão tradicional. Acredita-se que o ciclo dos plasmódios se mantenha por reservatórios do parasito, na floresta ou na população rural, representados tanto por símios quanto por seres humanos, assintomáticos ou não. Estudos vêm sendo realizados no sentido de verificar a validade desta hipótese (Curado et al. 1997, Duarte et al. 2006, Cerutti et al. 2007, Meneguzzi et al. 2009, Rezende et al. 2009).

No que diz respeito ao vetor, no Espírito Santo, são conhecidas 26 espécies de *Anopheles* spp., demonstrando um cenário de abundância de anofelinos (Coutinho 1947, Andrade & Brandão 1957, Ferreira 1964, Natal et al. 2007, Sallum et al. 2008, Meneguzzi et al. 2009, Rezende et al. 2009, Silva et al. 2013). Sabe-se que os vetores de maior capacidade e competência pertencem ao subgênero *Kerteszia*, principalmente *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, nos estados do Sul e Sudeste brasileiros (Meneguzzi et al. 2009). Porém, espécies de anofelinos envolvidas na dinâmica de transmissão da malária fora da Amazônia variam de acordo com as situações ambientais e epidemiológicas (de Pina-Costa et al. 2014). Os casos autóctones de malária extra-amazônica se encontram em regiões montanhosas, de temperatura amena, e estão associados com atividades agrícolas perto da floresta, realizadas por homens jovens (Cerutti et al. 2007). Adicionalmente, no entanto, há mais um ambiente de transmissão da malária no Espírito Santo. A região norte do estado é um cenário frequente de surtos da doença. Esses surtos surgem a partir de introdutores provenientes da região Amazônica.

Os registros de malária autóctone por *Plasmodium falciparum* no Espírito Santo estão relacionados a esses surtos. Os casos detectados no local de cada surto, embora também sejam chamados de casos autóctones por definição epidemiológica, ocorrem no contexto de uma doença trazida do exterior, ao contrário do que é observado na Mata Atlântica. Portanto, no nosso atual nível de conhecimento, não é possível reconhecer a ocorrência de malária sintomática causada por *P. falciparum* em um ambiente de Mata Atlântica, como ocorre em relação ao *P. vixax*.

Estados como São Paulo, Santa Catarina e Espírito Santo são cobertos por florestas ainda densas de Mata Atlântica (IESB 2007). Entre eles, o Espírito Santo é o que tem registrado o maior número de casos de malária-bromélia nos últimos anos. O bioma em questão é muito úmido, abundante em chuvas e possui vegetação que propicia a reprodução dos anofelinos. Além disso, a malária-bromélia já começa a servir como marcador biológico de atividades humanas dentro dessas florestas (Gomes et al. 1985, Rezende et al. 2013). Rezende et al. (2009) encontraram um comportamento anofélico semelhante ao esperado pela literatura na localidade de Valsugana Velha, no município de Santa Teresa: alta prevalência de *A. (K.) cruzii* em uma região montanhosa de Mata Atlântica, em área endêmica para a doença no estado do Espírito Santo. Porém, considerando-se a hipótese de um modelo de

transmissão típico de zoonose nesse cenário, isto demandaria um comportamento vetorial estável e constante. Tal comportamento, portanto, precisa ser reavaliado para estabelecer as características de transmissão no decorrer dos anos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da área. O estudo foi realizado na área rural do município de Santa Teresa, que se localiza a aproximadamente 78 km de Vitória, no estado do Espírito Santo. A estação de captura permanente encontra-se na localidade de Valsugana Velha ($19^{\circ}57'58.4''$ S, $40^{\circ}34'45.2''$ W), onde foram registrados casos de malária residual de sistemas de Mata Atlântica no estudo de Cerutti et al. (2007) (Figura 1).

Figura 1 – Mapa político do município de Santa Teresa, com destaque para a comunidade rural onde as coletas foram realizadas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Coleta de anofelinos. Foram realizadas capturas horárias de anofelinos em uma estação permanente de captura localizada na área de transmissão da malária-bromélia. Tais capturas foram realizadas um dia por mês, durante um ano, de junho de 2014 a maio de 2015, totalizando 12 coletas. Dois métodos de captura foram utilizados:

- Armadilhas luminosas CDC com CO₂ (Gomes et al. 1985) que foram instaladas nas áreas abertas, na margem da floresta (copa e solo) e no interior da floresta (copa e solo);
- Armadilhas luminosas de *Shannon* (Bustamante & Pires 1951), instaladas na margem da floresta.

As cinco armadilhas do tipo CDC foram instaladas simultaneamente, com duas delas sendo erguidas a 15 metros de altura na copa das árvores (na margem e no interior da floresta), duas erguidas a um metro do solo (na margem e no interior da floresta) e uma instalada no limite entre a floresta e a área próxima às habitações. Por esse método, as capturas duraram 12 horas, sendo as armadilhas colocadas à noite (18:00, horário de Brasília) e retiradas pela manhã (6:00, horário de Brasília). Nas armadilhas de *Shannon*, os membros da equipe realizaram as capturas ao longo das quatro primeiras horas após o crepúsculo (18:00 às 22:00, horário de Brasília), a cada mês.

Armazenamento e identificação dos insetos. Os espécimes foram guardados em tubos contendo isopropanol e, posteriormente, foram identificados pelas chaves propostas por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). A identificação inicial foi feita pela equipe do Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo (NEMES/ES) e revisada pela equipe do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/USP).

Técnicas moleculares. O DNA para detecção dos plasmódios foi obtido a partir do agrupamento dos mosquitos, em *pools* (máximo de 10 amostras/*pool*) de tórax, abdome ou mosquito inteiro, dependendo do subgênero dos espécimes. Foram seccionados os do subgênero *Nyssorhynchus* e processados inteiros os pertencentes ao subgênero *Kerteszia*. O mesmo kit de extração (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) foi utilizado, seguindo as orientações do fabricante. Cada *pool* incluía fêmeas da mesma espécie, coletadas em um mesmo tipo de armadilha, na mesma data. A detecção da presença de *P. vivax* ou *P. malariae* nos *pools* foi baseada no protocolo de *nested*-PCR descrito por Kimura *et al.* (1997) e modificado por Win *et al.* (2002). O alvo foi o gene que codifica a subunidade ribossomal 18S DNAr. A revelação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob luz ultravioleta. Em casos positivos, fragmentos do tamanho de 100 pb eram amplificados.

Análise estatística. Para determinar a importância e a distribuição das diversas espécies de anofelinos, foram feitas análises de diversidade, dominância e

abundância por meio do índice de diversidade de Shannon e do índice de dominância de Simpson. Nas diversas comparações, o nível de significância considerado foi de 5%. Cálculos de correlação bivariada foram utilizados para determinar a relação entre a captura de anofelinos, a temperatura e a pluviosidade (dados fornecidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER), também com nível de 5%.

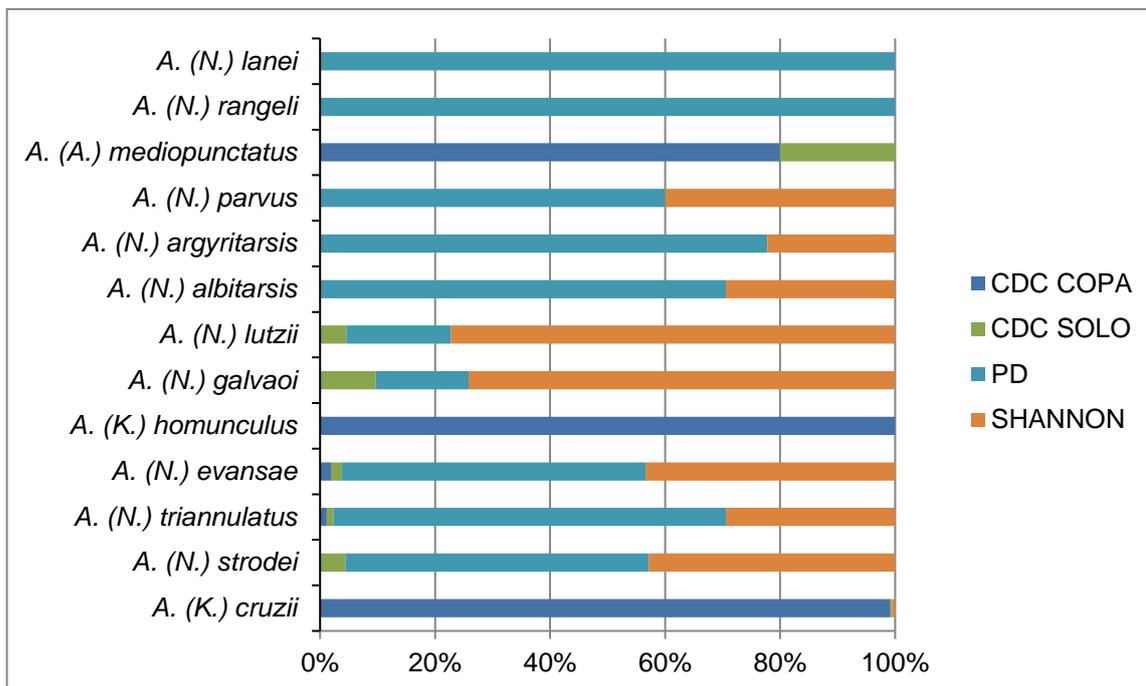
RESULTADOS

Um total de 1.414 espécimes foi capturado, resultando em um conjunto de 13 espécies. O maior número de espécimes foi coletado em abril de 2015 (341) e o menor número de espécimes em março de 2015 (05). Em todas as capturas, houve predomínio de *Anopheles (K.) cruzii*, totalizando 1.044 dos 1.414 mosquitos (Tabela 1). A armadilha na qual mais mosquitos foram capturados foi a CDC com CO₂ colocada na copa das árvores, onde também o *A. (K.) cruzii* ganhou destaque (Figura 3).

Tabela 1 – Porcentagem das espécies de anofelinos encontradas entre junho de 2014 e maio de 2015 na estação permanente de captura em Santa Teresa, ES.

Espécies	Quantidade	[%]
<i>A. (K) cruzii</i>	1044	73,8
<i>A. (N) strodei</i>	103	7,3
<i>A. (N) triannulatus</i>	84	6,0
<i>A. (N) evansae</i>	52	3,7
<i>A. (K) homunculus</i>	39	2,7
<i>A. (N) galvaei</i>	29	2,0
<i>A. (N) lutzii</i>	21	1,5
<i>A. (N) albitarsis</i>	17	1,2
<i>A. (N) argyritarsis</i>	09	0,6
<i>A. (N) parvus</i>	07	0,5
<i>A. (A). mediopunctatus</i>	05	0,4
<i>A. (N) rangeli</i>	03	0,2
<i>A. (N) lanei</i>	01	0,1
TOTAL	1414	100

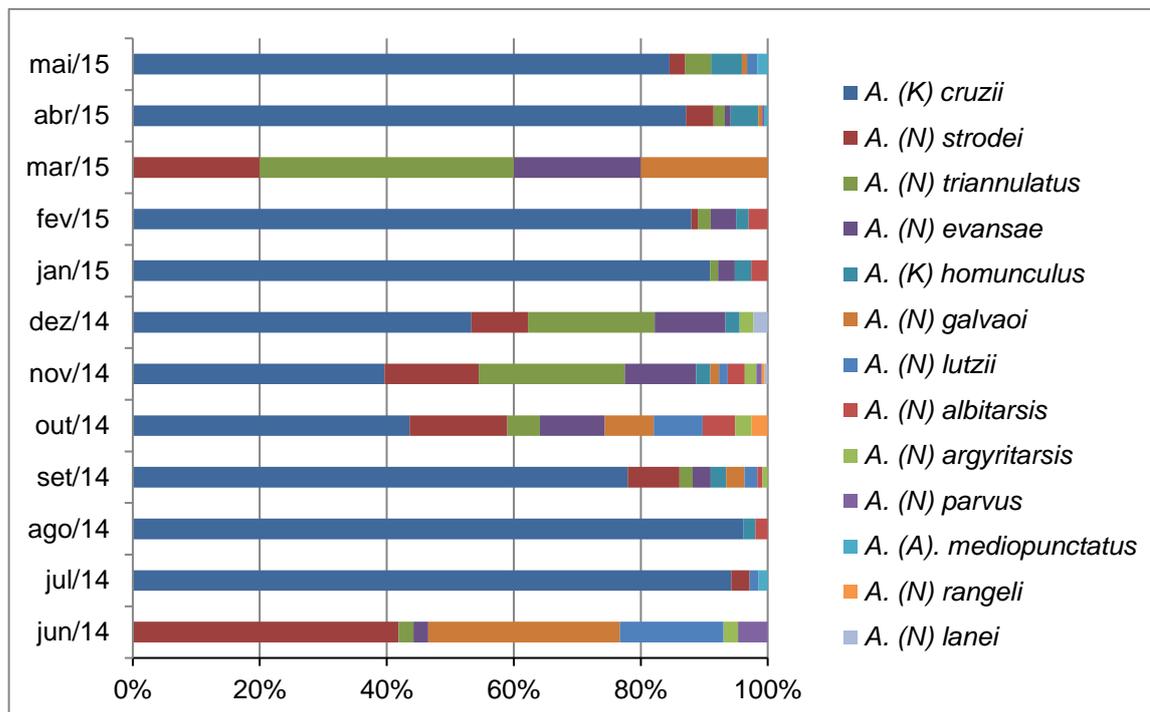
Figura 3 – Porcentagem de espécies capturadas por armadilha, no período de junho de 2014 a maio de 2015, na estação de captura permanente em Santa Teresa, Espírito Santo.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Condições climáticas. Os meses de novembro de 2014, setembro de 2014 e abril de 2015 apresentaram a maior frequência de captura, respectivamente (Figura 4). Não houve captura simultânea de todas as espécies nas coletas mensais e todas as espécies se mostraram ausentes em pelo menos um mês ao longo do período total de captura. Apenas em junho de 2014 e em março de 2015, *A. (K.) cruzii* não foi capturado (Figura 4). Foram os únicos momentos nos quais deixou de ser a espécie predominante, dando lugar a *A. (N.) strodei* e *A. (N.) triannulatus*, respectivamente.

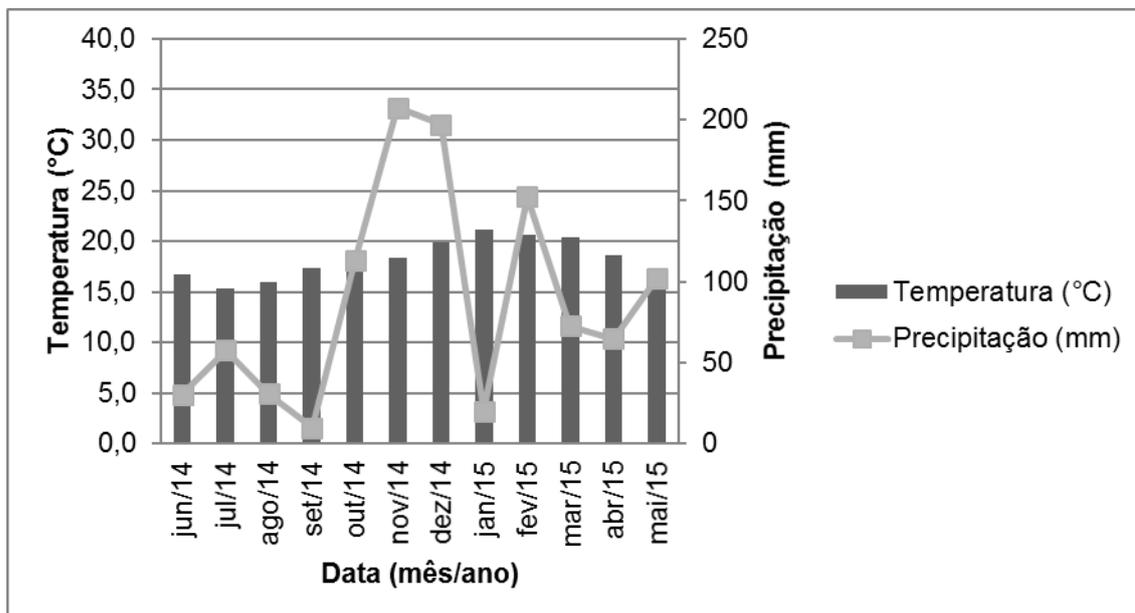
Figura 4 – Espécies que foram capturadas a cada mês de coleta, no período de junho de 2014 a maio de 2015, na estação de captura permanente de Santa Teresa, Espírito Santo.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Uma tendência negativa foi observada para a correlação entre o número de anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* e a temperatura, embora sem significância estatística ($r = -0,04$; $p = 0,89$). Da mesma forma, uma tendência positiva foi observada para a correlação entre o número de anofelinos e a pluviosidade ($r = 0,17$; $p = 0,59$), mas não houve significância. Para o subgênero *Kerteszia*, a correlação entre a frequência de captura e temperatura ($r = -0,04$; $p = 0,99$) ou pluviosidade ($r = -0,13$; $p = 0,68$) revelou coeficientes negativos, sem significância. A temperatura média mensal e a precipitação em Valsugana Velha são mostradas na Figura 5.

Figura 5 – Dados de temperatura e precipitação em Santa Teresa, ES, entre junho de 2014 e maio de 2015.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Distribuição espacial. Foram mais frequentemente capturados *A. (N.) strodei* e *A. (N.) triannulatus* na armadilha de Shannon e *A. (K.) cruzii* nas armadilhas CDC com CO₂ (Figura 3) localizadas nas copas das árvores. O índice de dominância de Simpson (D) revelou que a dominância na armadilha de Shannon (D1 = 0,227) é maior que a dominância dos indivíduos coletados em CDC com CO₂ (D2 = 0,172) ($p < 0,02$), ambos na margem da floresta. Em relação ao cálculo do índice de diversidade de Shannon (H'), a diversidade de anofelinos coletados na armadilha de Shannon (H'2 = 1,866) foi maior quando comparada àquela dos anofelinos coletados na CDC com CO₂ na margem da floresta, próxima às áreas de habitação (H'1 = 1,734) ($p = 0,004$). *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* foi capturado em maior número em áreas da margem da floresta, seguido por *A. (N.) triannulatus*. *A. (N.) lanei* e *A. (N.) rangeli* foram capturados apenas na armadilha CDC com CO₂ localizada no peridomicílio, enquanto *A. (K.) homunculus* o foi apenas nas armadilhas CDC instaladas nas copas das árvores.

Taxas de infecção natural (Tabela 2). Do total de pools de espécimes investigados, 13 foram positivos para *Plasmodium vivax*. Dez pertenciam à espécie *A. (K.) cruzii* e três eram abdomes que pertenciam a espécimes do subgênero *Nyssorhynchus* (Figura 2). Como apresentado na Tabela 2, a maior parte dos

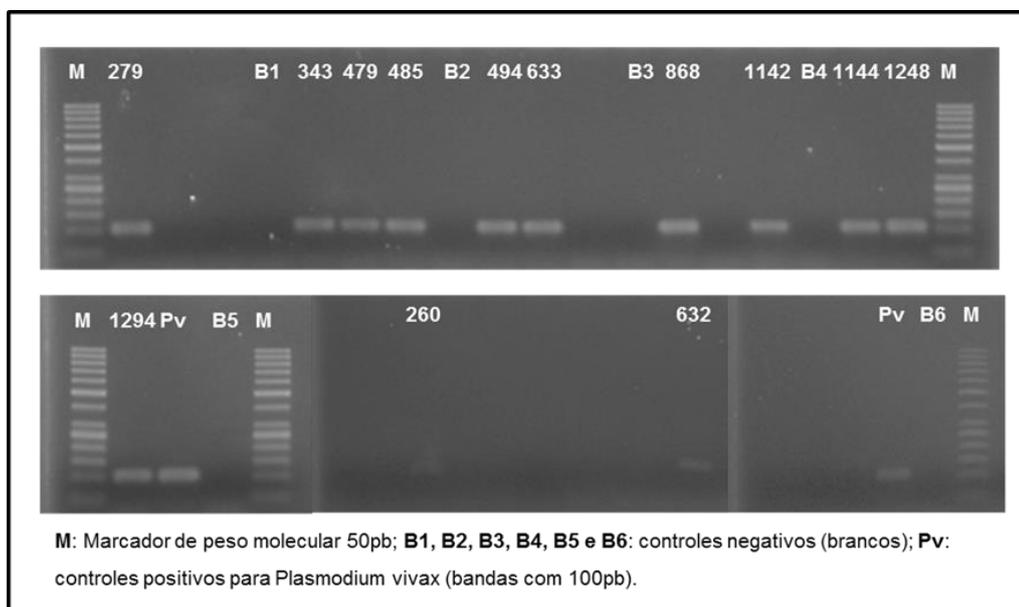
mosquitos infectados foi constituída por *A. (K.) cruzii*, capturados em armadilhas CDC com CO₂ localizadas nas copas das árvores. A Figura 6 mostra a distribuição mensal da captura dos mosquitos nos quais *P. vivax* foi encontrado. Não houve detecção de infecção por *P. malariae*.

Tabela 2 – Espécies, armadilhas e datas de coletas referentes aos mosquitos positivos para *Plasmodium vivax* na estação permanente de captura em Santa Teresa, Espírito Santo.

Amostra	Espécie	Armadilha	Data
260a*	<i>A. (N.) lutzii</i>	<i>Shannon</i>	Setembro 2014
279	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Agosto 2014
343	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Agosto 2014
479	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Outubro 2014
485	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Outubro 2014
494a*	<i>A. (N.) evansae</i>	<i>Shannon</i>	Outubro 2014
632	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC solo	Novembro 2014
633	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Novembro 2014
868	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Fevereiro 2015
1142	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Abril 2015
1144	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Abril 2015
1248	<i>A. (K.) cruzii</i>	CDC copa	Abril 2015
1294a*	<i>A. (N.) strodei</i>	CDC peridomiciliar	Mai 2015

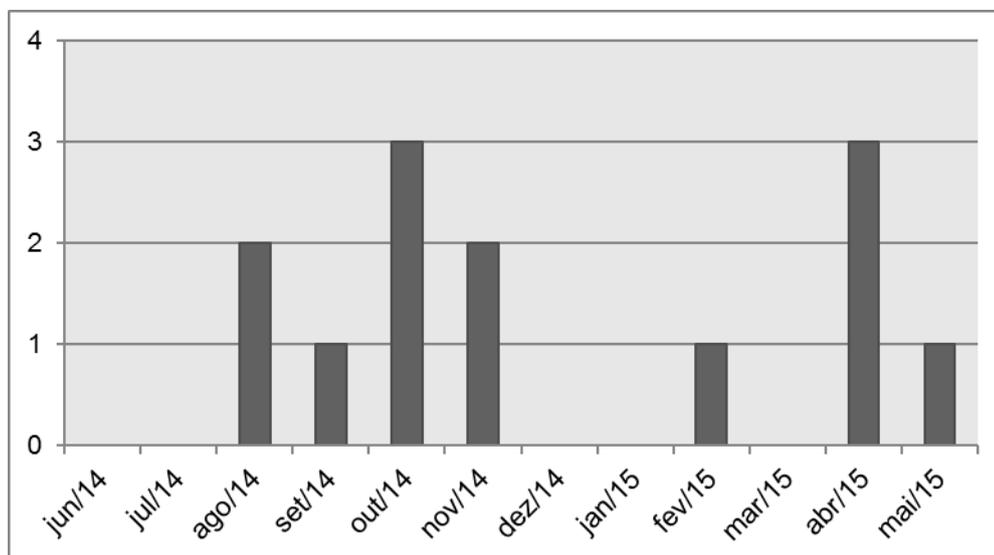
*a = abdômen.

Figura 2 – Gel de agarose corado com brometo de etídeo, fotografado pelo software Alpha Imager, com as 13 amostras de pools de fêmeas de anofelinos positivas para *Plasmodium vivax*.



Fonte: Resultado da pesquisa.

Figura 6 – Distribuição cronológica da captura de fêmeas de anofelinos infectadas por *Plasmodium vivax* na estação permanente de captura em Santa Teresa, Espírito Santo.



Fonte: Resultado da pesquisa.

DISCUSSÃO

A malária-bromélia se sobressaiu nas regiões de Mata Atlântica do Sul e Sudeste brasileiros após as medidas de controle implementadas pelo governo terem eliminado a transmissão nas áreas planas exploradas pelo homem (Barata 1998, MS 2015). Uma vez tendo permanecido de forma residual nas áreas de eliminação, a malária-bromélia ou de Sistemas de Mata Atlântica passou a ser estudada com mais intensidade nas décadas de 1980 e 1990 (Duarte et al. 2013). Com uma compreensão mais consistente da ecologia dos vetores e da epidemiologia dos surtos, surgiram mais evidências favoráveis a um comportamento compatível com uma zoonose. A hipótese de zoonose pressupõe a existência concomitante de malária símia. Tal existência já foi comprovada no passado (Duarte et al. 2008), mas sua avaliação prospectiva demanda uma logística de extrema complexidade. Portanto, a avaliação de comportamento vetorial favorável para a transmissão da enzootia é mais viável e pode fornecer evidência indireta tanto da presença da infecção entre os símios quanto de sua fonte para a ocorrência de casos humanos. Tendo em vista a necessidade de um comportamento vetorial estável e constante para manutenção da malária símia, estudos de acompanhamento das regiões endêmicas são necessários. Além disso, segundo Marrelli et al. (2007), todo o território de Mata Atlântica que sobreviveu ao desmatamento deve ser cuidadosamente monitorado devido às mudanças ambientais e à possibilidade de manutenção do ciclo a partir do número elevado de indivíduos assintomáticos, que podem servir de reservatório do parasito naquelas regiões.

No presente estudo, *A. (K.) cruzii* ainda prevalece como o principal vetor encontrado na estação de captura de Valsugana Velha. Entre 2004 e 2005 (Rezende et al. 2009), 61.2% dos 2.290 anofelinos coletados eram dessa espécie. Em 2014 e 2015, dos 1,414 anofelinos, 73.8% eram *A. (K.) cruzii*. Observa-se, portanto, um aumento da proporção do principal vetor da malária-bromélia na fauna local. Tanto estudos mais antigos como os de Deane (1988), quanto estudos mais recentes como os de Duarte et al. (2013), Neves et al. (2013) e Kirchgatter et al. (2014) já demonstraram a magnitude da presença dessa espécie nas regiões de Mata Atlântica com floresta nativa preservada.

Manteve-se também a distribuição do *A. (K.) cruzii* de dentro para fora da mata. Como visto em 2004 e 2005, por Rezende et al. (2009), os anofelinos dessa espécie apareceram em sua maioria absoluta nas copas das árvores no interior da floresta, enquanto que, à medida que as armadilhas iam ao encontro da margem da mata e do

peridomicílio, os exemplares diminuía drasticamente. Mais perto da área de ocupação humana, a fauna de anofelinos era substituída por espécies como *A. (N.) strodei* e *A. (N.) triannulatus*. Em São Paulo, entre 2009 e 2011, esse comportamento também foi detectado quando comparadas áreas antrópicas e silvestres na localidade de Parelheiros. Lá, 438 *A. (K.) cruzii* foram registrados em certa área antrópica e 4.832 na área silvestre (Duarte et al. 2013).

O predomínio absoluto de *A. (K.) cruzii* na copa, observado no presente estudo, assinala um comportamento assinantrópico (Forattini et al. 1990) e reforça seu papel na transmissão da malária símia. Entretanto, apesar de permanecer essencialmente na copa, alguns espécimes foram encontrados nas CDC com CO₂ no solo e na armadilha de Shannon, o que aponta para a possibilidade da eventual descida desses vetores a partir de seu local preferencial nas copas, ocasião em que poderiam transmitir incidentalmente os parasitos para os seres humanos. Isso reforça a hipótese de que a malária-bromélia se mantenha na região por meio de infecção símia. Uma vez que o homem está presente na mata e o *A. (K.) cruzii* desce para se alimentar, cria-se a condição para os plasmódios circulantes em macacos, que estavam nas copas das árvores, causarem a infecção humana.

A partir de estudos de diagnóstico morfométrico de Lorenz et al. (2012), houve a diferenciação entre *A. (K.) cruzii* e *A. (K.) homunculus* não prevista no estudo de Rezende et al. (2009). Entretanto, pode-se constatar a presença de apenas 39 *A. (K.) homunculus* durante o período de coletas entre 2014 e 2015, em contraste com 1.045 *A. (K.) cruzii*, devidamente identificados. Uma das limitações deste estudo foi ter a identificação das espécies sido feita apenas de forma morfológica. Para minimizar a possibilidade de identificação incorreta, melhoramos a precisão por meio da avaliação inicial por entomologistas experientes e por uma revisão por outros profissionais da entomologia, realizada em casos de dúvida.

Em relação à época do ano na qual a maior parte dos mosquitos foi capturada, diferentemente do esperado, o verão não ganhou destaque. Interessantemente, as estações com clima mais ameno se sobressaíram. Nos meses de setembro de 2014 e abril de 2015, obteve-se mais sucesso nas capturas, por exemplo. Isso corrobora o estudo de Rezende et al. (2009) que sugeriu a adaptação dos anofelinos ao ambiente de temperatura amena. Houve também um alto número de espécimes coletados em novembro de 2014, mas, naquela ocasião, a média de precipitação foi a maior daquele

ano (média de 207,6 mm/mês) e, no dia da captura, a temperatura foi amena (variando de 19,7 a 21,3°C). Neste mês, o fator “chuva” pode ter provocado o aumento da proliferação dos mosquitos.

Neste estudo, 13 *pools* de mosquitos foram positivos para *P. vivax*. Em 2004 e 2005 (Rezende et al. 2009), obteve-se 10 *pools* de anofelinos infectados pela mesma espécie do parasito. Porém, ao contrário do que aconteceu há 10 anos, as reações de PCR realizadas no material das coletas de 2014 e 2015 não mostraram infecção nos tóraces de mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*. Considera-se que a forma infectante deve chegar à glândula salivar do anofelino para que a infecção aconteça. Assim, a divisão em tórax e abdome durante os experimentos reforça evidências favoráveis à participação de outras espécies de vetores na cadeia de transmissão. Por ser *Kerteszia* um subgênero de vetor conhecido, não houve a divisão do corpo para execução dos experimentos, como aconteceu com os mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, com o intuito de verificar a possibilidade de que esses mosquitos participem da cadeia de transmissão. Já que não foi detectada infecção nos tóraces de *Nyssorhynchus* como há 10 anos, sugere-se a possibilidade de que, com o passar dos anos, os *Nyssorhynchus* tenham deixado de exercer o papel de vetores secundários e que o *A. (K.) cruzii* atualmente seja o único vetor da malária-bromélia nessa localidade. A progressiva exploração do ambiente rural e florestal pelos habitantes locais pode ter tornado os eventos de transmissão mais distantes do ambiente antrópico, onde há maior dominância dos *Nyssorhynchus*. Nessas circunstâncias, diante da dominância dos *A. (K.) cruzii*, os *Nyssorhynchus* não têm a oportunidade de se infectar. O homem frequenta a floresta para limpar as nascentes de rios ou pegar madeira de lenha e, assim, adquire a doença. Retornando para sua residência, provavelmente infecta os *Nyssorhynchus* peridomiciliares.

Os *A. (K.) cruzii* infectados foram coletados em armadilhas CDC com CO₂ na copa das árvores no interior da floresta e apenas um em CDC com CO₂ localizada próxima ao solo, a um metro de altura. Tal fato reforça a ideia de que as infecções podem ocorrer em ambos os *habitats*, resultado do comportamento acrodendrofílico com eventuais descidas a alturas mais baixas, quando podem ocorrer repastos em hospedeiros não habituais. Esse fato também reforça a possibilidade de a doença ser uma zoonose em regiões como Valsugana Velha, em Santa Teresa, ES.

Sobre o índice de dominância de Shannon, houve maior dominância na armadilha de Shannon do que na armadilha CDC-CO₂, ambas na margem da mata. Já em relação ao índice de diversidade de Simpson, a diversidade de anofelinos coletados com armadilha de Shannon também foi maior do que aquela observada em CDC-CO₂, no mesmo *habitat*. A instalação da armadilha próxima à coleção hídrica, onde há criadouros de *Nyssorhynchus*, justificaria a maior diversidade.

Esses dados corroboram o estudo realizado na mesma região em 2013 (Rezende et al. 2013), quando foi observada maior dominância e diversidade de anofelinos em ambiente antrópico com presença de malária. Estes achados reforçam o papel da ocupação humana na determinação tanto da distribuição quanto do comportamento anofélico, uma vez que ambos os índices predominaram nas capturas realizadas em ambiente mais relacionado às habitações humanas.

O estudo revela que houve pouca mudança no comportamento vetorial na região estudada. O *A. (K.) cruzii* continua sendo o anofelino mais infectado em Valsugana Velha e os mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* parecem não participar da cadeia de transmissão. O comportamento acrodendrofílico dos *A. (K.) cruzii*, principalmente dos infectados, reforça a hipótese de que a presença de *P. vivax* nesses espécimes surja pelos repastos sanguíneos em animais que vivem na copa das árvores, como os símios.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo e ao Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo / SESA pelo suporte logístico e pelo fornecimento de equipamentos no campo; a Claudiney Biral dos Santos pelo suporte técnico; a Filomena E C Alencar, Creuza Rachel Vicente, Marcelo Urbano Ferreira, Priscila Thihara Rodrigues e Lais Camoese Salla pela leitura crítica do manuscrito; aos proprietários da fazenda Recanto da Preguiça por permitirem as coletas no local e ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER / ES) por fornecer os dados de precipitação e temperatura.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e pelo Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde (PPSUS/MS) (número da concessão: 65834119/2014).

CONFLITO DE INTERESSES

Não há.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

No processo de captura, nenhum dano foi infligido ao meio ambiente. Os membros da equipe utilizaram roupas longas, luvas e chapéus com tela, de modo a evitar picadas pelos mosquitos anofelinos. Também foram calçadas botas para evitar acidentes por animais peçonhentos. Foi concedida licença para captura de insetos artrópodes - SISBIO / Instituto Chico Mendes (ICMBio / IBAMA / MMA), com número 19227-1.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

JCB e CCJr conceberam a idéia principal do estudo e escreveram a primeira versão do manuscrito; JCB, LSS e HRR participaram das atividades de campo nas quais os mosquitos foram coletados; HRR fez a primeira identificação das espécies de mosquitos; CCJr e AF garantiram assistência entomológica e epidemiológica à equipe; JCB, BF, LN e RSM foram responsáveis pela identificação molecular dos plasmódios em anofelinos; RMTM contribuiu com a análise estatística dos dados. Todos os autores contribuíram lendo criticamente a versão final deste artigo.

REFERÊNCIAS

Andrade RM, 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. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1957; 9: 391-403.

Barata RB. Malária e seu controle. São Paulo: Hucitec; 1998.

Bustamante FM, Pires WM. Shannon dawn trap: its use in the verification of the durability of residual toxic effects of insecticides. *Folha Med.* 1951; 32(8): 53-5.

Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCLD, Falqueto A, Rezende HR, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007; 6: 33.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Cad Saude Publica.* 1994; 11: 228 pp.

Coutinho JO. Contribuição para o estudo da distribuição geográfica dos anofelinos do Brasil [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1947.

Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(2): 235-43.

De Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFS, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(5): 618-33.

Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38(2): 223-30.

Downs WG, Pittendrigh CS. Bromelian malaria in Trinidad, British West Indies. *Am J Trop Med.* 1946; 26: 47-66.

Duarte AM, Malafrente RS, Cerutti Jr C, Curado I, Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop.* 2008; 107(2): 179-85.

Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. *Parasit Vectors.* 2013; 6: 58.

Duarte AMRC, Porto MAL, Curado I, Malafronte RS, Hoffman EHE, Oliveira SG, et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *Int J Primatol.* 2006; 35(2): 87-96.

Ferreira E. Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1964; 16: 329-48.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucc D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11 - biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles* (*Kerteszia*) in South- Eastern Brazil. *Rev Saude Publica.* 1990; 24(2): 107-14.

Gomes AC, Rabello EX, Natal D. A new collecting chamber for a CDC-miniature trap. *Rev Saude Publica.* 1985; 19(2): 190-1.

IESB - Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia. Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira - PROBIO. Levantamento da cobertura vegetal nativa do bioma Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.

Kimura M, Kaneco O, Liuc Q, Zhouc M, Kawamotoc F, Watayad Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int.* 1997; 46(2): 91-5.

Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RM, Alves IC, Lima GFMC, Guimarães LO, et al. *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* (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. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56(5): 403-9.

Lorenz C, Marques T, Sallum MA, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors.* 2012; 5(1): 257.

Marrelli MT, Malafronte RS, Sallum MAM, Natal D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic Rainforest: current knowledge and future challenges. *Malar J.* 2007; 6: 127.

Meneguzzi VC, dos Santos CB, Pinto IS, Feitoza LR, Feitoza HN, Falqueto A. Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance

of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(4): 570-5.

MS - Ministério da Saúde. Ministério da Saúde lança Plano de Eliminação da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.

Natal D, Urbinatti PR, Malafronte RS, Rezende HR, Cerutti Jr C, Sallum MAM. First record of *Anopheles (Anopheles) costai* Fonseca & Ramos, 1939 in Espírito Santo State. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007; 49(5): 323-6.

Neves A, Urbinatti PR, Malafronte RS, Fernandes A, Paganini WS, Natal D. 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 Trop. 2013; 125(1): 102-6.

Rezende HR, Falqueto A, Urbinatti PR, de Menezes RM, Natal D, Cerutti Jr C. Comparative study of distribution of anopheline vectors (Diptera: Culicidae) in areas with and without malaria transmission in the highlands of an extra-Amazonian region in Brazil. J Med Entomol. 2013; 50(3): 598-602.

Rezende HR, Soares RM, Cerutti C, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, 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. Neotrop Entomol. 2009; 38(2): 272-80.

Sallum MAM, Urbinatti PR, Malafronte RS, Rezende HR, Cerutti Jr C, Natal D. Primeiro registro de *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae) no estado do Espírito Santo, Brasil. Rev Bras Entomol. 2008; 52(4): 671-3.

Silva KS, Pinto IS, Leite GR, Virgens TM, Santos CB, Falqueto A. Ecology of Anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Central Atlantic Forest biodiversity corridor, southeastern Brazil. J Med Entomol. 2013; 50(1): 24-30.

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Trop Med Int Health. 2002; 7(3): 231-9.

6.2 Artigo 02

Genoma mitocondrial de *P. vivax/simium* detectado em uma região endêmica para malária na Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil: mosquitos, símios e humanos albergam o mesmo parasito?

Julyana Cerqueira Buery[∞], Priscila Thihara Rodrigues[¥], Lícia Natal^º, Laís Camoese Salla[¥], Ana Carolina Loss^º, Creuza Rachel Vicente[∞], Helder Ricas Rezende[¤], Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte^ω, Blima Fux[∞], Rosely dos Santos Malafrente^º, Aloísio Falqueto[∞] e Crispim Cerutti Jr.[∞]

[∞] Unidade de Medicina Tropical, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo 29043-900, Brasil.

[¥] Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, São Paulo 05508-900, Brasil.

^º Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Avenida Doutor Enéas Carvalho de Aguiar, 470, Cerqueira Cesar, São Paulo 05403-000, Brasil.

^º Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia, Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória, Espírito Santo 29075-910, Brasil.

[¤] Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo, Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, Rua Pedro Zangrandi, 320, Jardim Limoeiro, Serra, Espírito Santo 29164-020, Brasil.

^ω Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, Rua Paula Souza 166, Luz, São Paulo 01027-000, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A transmissão da malária nas regiões extra-amazônicas do Brasil, embora interrompida na década de 1960, persiste em algumas áreas de floresta densa de Mata Atlântica, com relatos de casos caracterizados por ciclos de transmissão e apresentações clínicas peculiares. A malária-bromélia, como é chamada, é particularmente frequente no estado do Espírito Santo, sendo *Plasmodium vivax* o parasito comumente reconhecido como o agente etiológico das infecções humanas. Com relação às distâncias espaciais e temporais entre os casos relatados nesta região, o ciclo de transmissão parece não corresponder ao ciclo tradicional da malária.

A existência de uma zoonose, com símios infectados participando na epidemiologia, é, portanto, estabelecida como uma hipótese. No presente estudo, a transmissão da malária-bromélia no Espírito Santo é investigada com base no genoma mitocondrial completo do DNA extraído de isolados de *Plasmodium* spp. que infectaram humanos, um símio do gênero *Allouata* e mosquitos *Anopheles* spp. *Plasmodium vivax/simum* foi identificado nas amostras por *nested-PCR* e *PCR* em tempo real. Após a amplificação, o genoma mitocondrial foi completamente sequenciado e comparado em uma rede de haplotipos que incluiu todas as sequências de genomas mitocondriais de *P. vivax/simum* de amostras de seres humanos e símios de outras regiões do Brasil. RESULTADOS: a rede de haplótipos indica que humanos e símios da Mata Atlântica são infectados pelo mesmo haplótipo, mas alguns isolados de seres humanos não são idênticos ao isolado de símio. Além disso, o DNA de plasmódios extraído de mosquitos revelou sequências diferentes das obtidas de símios, mas semelhantes a dois isolados de seres humanos. CONCLUSÕES: esses achados fortalecem o suporte à hipótese de que, na Mata Atlântica e especialmente no estado com a maior frequência de malária-bromélia no Brasil, parasitos com estruturas moleculares semelhantes são compartilhados por seres humanos e símios. A reconhecida identidade entre *P. vivax* e *P. simium* ao nível de espécie, o compartilhamento de haplótipos, e a participação do mesmo vetor na transmissão da infecção para ambas as espécies hospedeiras indica transferência interespecie dos parasitos. No entanto, a intensidade, a frequência e a direção desta transferência ainda precisam ser esclarecidas.

PALAVRAS-CHAVE: *Anopheles*; Malária; Epidemiologia; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; DNA mitocondrial; Análise de sequência, DNA; Zoonoses.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a malária ocorre originalmente em todo o território nacional. No entanto, a região Amazônica registra 99% de todos os casos no país [1]. Desde a década de 1940, um programa nacional de controle manteve a transmissão da malária restrita à Região Norte. Conseqüentemente, nas décadas de 1960 e 1970, a região

extra-Amazônica chegou perto da completa eliminação da doença. Porém, a transmissão residual persistiu em certas áreas de floresta densa [2].

Na Mata Atlântica, a malária apresenta uma incidência muito baixa, com casos principalmente relacionados ao *Plasmodium vivax*, apresentando poucos sintomas clínicos [1-4]. A baixa incidência e a dispersão territorial dos casos relatados fornecem evidências favoráveis à existência de um reservatório incógnito dos parasitos. Isso, por sua vez, levanta questões sobre a participação de portadores assintomáticos ou símios locais infectados na transmissão [5]. A similaridade genética entre *P. vivax*, que infecta humanos, e o parasito que infecta símios na Mata Atlântica, chamado *Plasmodium simium*, também dá suporte à hipótese de zoonose.

Após o primeiro relato de uma infecção natural de *P. simium* em um ser humano [5], a identidade entre *P. simium* e *P. vivax* foi estabelecida muitas vezes: (1) por estudos sobre a proteína CSP no início dos anos 90 [6], (2) por análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene do citocromo *b* do genoma mitocondrial [7], (3) por polimorfismos de microssatélites [8], (4) novamente por variações da CSP [9] e (5) pelo sequenciamento do gene *Msp-1* [10]. Neste contexto, a evidência recente apresentada por Brasil *et al.* (2017) [11] de alguns polimorfismos de nucleotídeos únicos diferenciando *P. simium* de *P. vivax* não parece implicar na sua separação em duas espécies diferentes.

Na região extra-Amazônica, o termo malária-bromélia refere-se à doença cujo vetor, conhecido como *Anopheles (Kerteszia) cruzii* [12], depende das bromélias como locais de reprodução. Evidências moleculares e sorológicas apresentadas por diferentes estudos sugerem que a malária-bromélia é altamente relacionada a atividades humanas realizadas perto do ambiente da floresta [13-15]. Além disso, a ocorrência da doença é escassa e os surtos são raros [16].

Considerando as características apresentadas acima e o fato de que os parasitos albergados por símios locais são geneticamente indistinguíveis daqueles encontrados no sangue humano, a hipótese de um cenário zoonótico para a malária-bromélia encontra forte substrato [17-23]. No entanto, mesmo com uma gama de investigações científicas que corroboram a hipótese de zoonose, permanece o debate sobre a direção da transferência dos parasitos. Por exemplo, comparando a variabilidade genética em estudos baseados na proteína de ligação de Duffy de eritrócitos coletados de símios da espécie *Alouatta guariba*, Costa [24] sugeriu que o

parasito símio se originaria de sua contraparte humana. Esta hipótese é adicionalmente embasada por Rodrigues *et al.* (2017) [25] com suporte na variabilidade genética limitada entre *P. simium* e *P. vivax*.

Em seu estudo, Brasil *et al.* (2017) [11] sugeriram a possibilidade de usar polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) para diferenciar *P. simium* de *P. vivax*, com foco em sequencias completas do genoma mitocondrial. No entanto, a diferenciação entre as duas variantes da mesma espécie não é uma tarefa fácil.

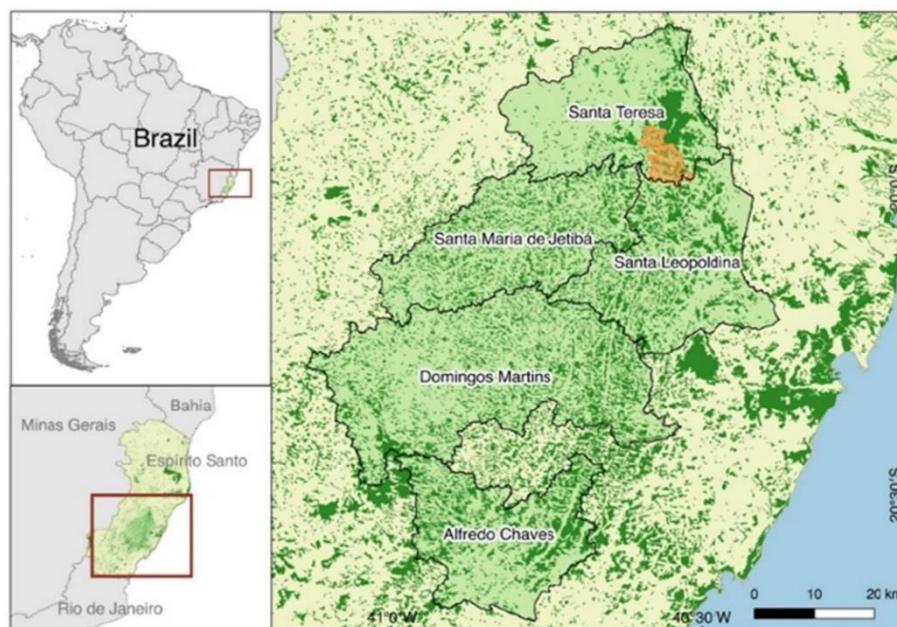
Para melhor verificar as características genéticas distintivas entre estas variantes, este estudo apresenta a caracterização molecular de *P. vivax/simium* com base no sequenciamento de genomas mitocondriais de parasitos isolados de ambos hospedeiros humanos e símios e, de maneira inédita, de mosquitos do gênero *Anopheles*, em uma área endêmica da Mata Atlântica brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo. O Espírito Santo é um estado brasileiro localizado na Região Sudeste, com grandes áreas de floresta densa de Mata Atlântica. O trabalho de campo para coletar amostras de anofelinos e de símios foi concentrado em Valsugana Velha, distrito de Santa Teresa, que é a principal área com registro de malária neste município. Santa Teresa está localizada a 78 km da capital do Espírito Santo, Vitória (Figura 1). A topografia da região é irregular, com um relevo montanhoso configurado por elevações que atingem a altitude de 655 m acima do nível do mar e temperaturas médias que variam entre 15,3 e 21,0°C.

Procedência das amostras. Foram colhidas amostras de sangue humano dos 22 casos de malária causada por *P. vivax* entre 2001 e 2004, previamente detectados por gota espessa nas comunidades da área endêmica [16]. Quatro amostras de sangue humano foram coletadas dos habitantes de Santa Teresa e 18 de outros municípios do Espírito Santo, também cobertos pela Mata Atlântica (Figura 1). A amostra de sangue do símio foi obtida de um espécime do gênero *Alouatta* capturado vivo em Valsugana Velha em 2009. Seis espécimes de mosquitos anofelinos infectados por *P. vivax* e capturados na mesma área, entre 2014 e 2015, também foram incluídos nas análises [um *Anopheles (Nyssorhynchus) lutzi*, um *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* e quatro *Anopheles (Kerteszia) cruzii*] [26].

Figura 1 – Mapa mostrando a área de amostragem da malária no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil



Fonte: Arquivo pessoal.

Extração de DNA e confirmação de infecção. A extração de DNA para confirmação da infecção nas amostras de sangue humano e do símio foi viabilizada pelo *QIAamp Blood DNA Mini Kit*, enquanto o DNA dos mosquitos foi extraído pelo *DNAeasy Blood and Tissue Kit*, ambos seguindo as instruções do fabricante (*Qiagen*). A infecção foi confirmada em todas as amostras por *nested-PCR* [27, 28] e por PCR em tempo real (adaptado de Rubio et al. [29]), com iniciadores desenhados para amplificar o gene da subunidade ribossomal 18S DNAr. Controles positivos e controles negativos foram utilizados em todas as reações.

Amplificação por PCR e sequenciamento do genoma mitocondrial completo. O genoma mitocondrial completo (6 kb) de *P. vivax/simum* das 22 amostras de sangue humano foi amplificado e sequenciado seguindo o protocolo proposto por Rodrigues et al. (2014) [30]. Um novo protocolo teve que ser desenvolvido para realizar a amplificação do DNA extraído do símio e das amostras de mosquito. Quatorze primers (Pvm1F / Pvm1R a Pvm14F /Pvm14R- Tabela 1) projetados pelo *software Primer3* foram utilizados em uma PCR convencional. O experimento, para cada amostra, incluiu 0,5 µl da enzima *Taq DNA polimerase* (5,0 U / µl) (*Fermentas*), 2,0 µl do DNA extraído, 0,5 µl de cada *primer* (5,0 µM), 2,0 µl de 10 × Tampão para *Taq DNA polimerase* (com KCl), 0,6 µl do *mix* de dNTP (2,0 mM cada) e 1,6 µl de MgCl₂ (25,0

mM), em um volume final de 20 μ l. A amplificação foi executada no termociclador *GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems)*, com desnaturação inicial a 95 ° C durante um minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 15 segundos, anelamento a 60 ° C por 30 segundos e extensão a 72 ° C por 30 minutos. O passo final da extensão foi realizado a 72 ° C durante cinco minutos. Os produtos da *PCR* foram purificados pelo *Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Biosciences)* e sequenciados usando o *BigDye kit (Applied Biosystems)* no sequenciador de DNA *ABI 3100 (Applied Biosystems)*. Montagens do genoma mitocondrial completo foram geradas usando o software *DNASTAR (versão 8.1.13, Madison)*. As sequências foram depositadas no *GenBank* [31]. (Material Suplementar 1: Tabela S1 – ANEXO B).

Tabela 1 – Sequencia de *primers* para amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *Plasmodium vivax/simum*. (Continua)

<i>P. vivax/simum</i>		
Primer	Sequencias (5' – 3')	Tamanho (pb)
Pv mosq mt 1	F:5'-AGCTGTAGATGGATGCTTCG -3'	557
	R:5'-CGAATTGAAGTGTGGAGAGAA -3'	
Pv mosq mt 2	F:5'-TTTCAAGAGTCCAAGGTTTCG-3'	577
	R:5'-TGTAACGACTTCCCCATTGT-3'	
Pv mosq mt 3	F:5'-CGTAACCATGCCAACACATA-3'	555
	R:5'-CAGCCTGGGATCAAAAAGTA-3'	
Pv mosq mt 4	F:5'-GACCGTCAAATCCTTTTCATT-3'	584
	R:5'-CGAGAAGGGAAGTGTGTTTC-3'	
Pv mosq mt 5	F:5'-GACCGGTCAAACGGAAT-3'	537
	R:5'-TTGGAGAATGTTTTGCATCA-3'	
Pv mosq mt 6	F:5'-TGAAAAATGTAAACCTGTAACACAA-3'	589
	R:5'-GTTAACGGCACACAAAATCA-3'	
Pv mosq mt 7	F:5'-TTCCATATAATGATGTTAATGAAGG-3'	544
	R:5'-ATCCATGTCAGGCGTTAAAA-3'	
Pv mosq mt 8	F:5'-AGATCGCGTACTTTGGACTG-3'	599
	R:5'-ACCTCCTCCAAATTCTGCTG-3'	

Tabela 1 – Sequencia de *primers* para amplificação e sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *Plasmodium vivax/simium*. (Conclusão)

<i>P. vivax/simium</i>		
<i>Primer</i>	<i>Sequencias (5' – 3')</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
Pv mosq mt 9	F:5'-TGGTTCTCCAGAACTTGCAT-3' R:5'-TGAGCCCATACAACACTTCC-3'	609
Pv mosq mt 10	F:5'-CCAGCATTGGTGTATTAGTC-3' R:5'-CATCCATTAAAGCGTCTGG-3'	608
Pv mosq mt 11	F:5'-TCTTACCTATGCATTTCTTGGGA-3' R:5'-CAGTTGCACCCCAATAACTC-3'	576
Pv mosq mt 12	F:5'-GCTACAGGTGCATCTCTTGTATT-3' R:5'-ACCATTCAGGAACAATTTGAA-3'	553
Pv mosq mt 13	F:5'-CCCTTCTATCCAAATCTATTAAGTC-3' R:5'-CTGAATATTCTCTAGCACCAAATG-3'	596
Pv mosq mt 14	F:5'-GATTACAGCTCCCAAGCAAA-3' R:5'-CAACTCCCTATCATGTCTTGC-3'	258

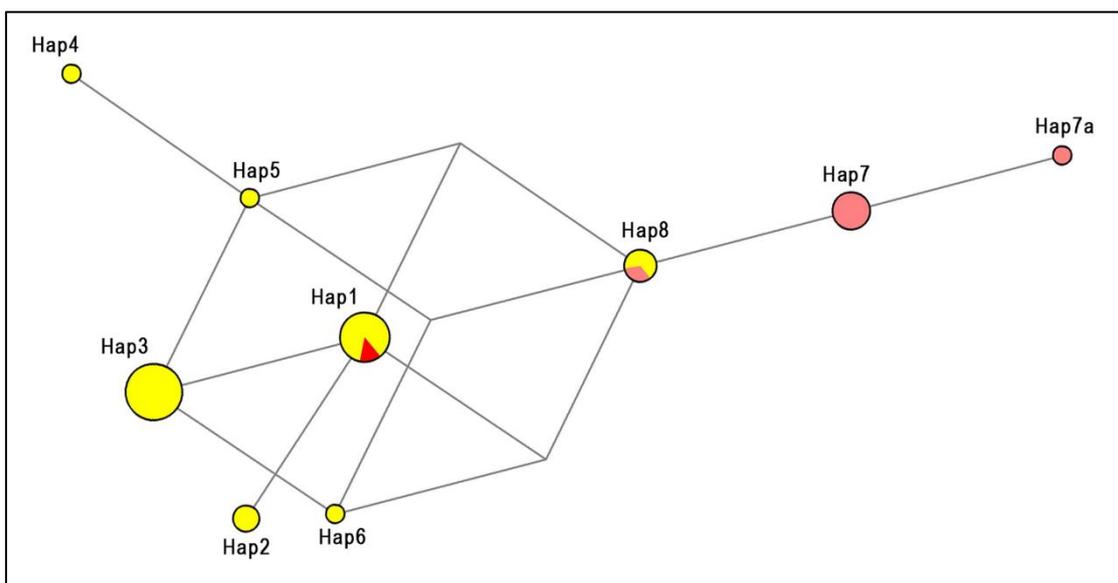
Análise dos dados. As sequências do genoma mitocondrial completo foram alinhadas pelo programa *ClustalX* (versão 2.1) e editadas manualmente no programa *MEGA* (versão 7.0). A p-distância genética entre as sequências também foi calculada no *MEGA*. O número de haplótipos, a diversidade de haplótipos (Hd) e a diversidade de nucleotídeos (Pi) foram calculados usando *DNAsp* (versão 5). A rede de haplótipos foi gerada por meio de *median-joining* [32] no programa *Network*, versão 4.6 [33], a partir dos parâmetros padrão. Dois diferentes conjuntos de dados foram utilizados nas análises da rede de haplótipos: um incluindo todas as 29 sequências de genoma mitocondrial de *P. vivax/simium* da Mata Atlântica coletadas no Espírito Santo (n = 29) e outro que também incluía 149 sequências de genoma mitocondrial de *P. vivax/simium* de amostras brasileiras Amazônicas e extra-Amazônicas, com 10 das sequências provenientes de símios e 139 de DNA mitocondrial coletado de humanos (mtDNA) (n = 178). Análise filogenética Bayesiana foi realizada para o conjunto de dados completo de *P. vivax/simium* (n = 178) usando o *MrBayes* (versão 3.2.1), com duas corridas de quatro cadeias, três aquecidas e uma a frio, por $7 \cdot 10^6$ gerações. Somente grupos com probabilidade posterior Bayesiana (BPP) $\geq 95\%$ foram considerados significativos. A árvore de consenso foi visualizada usando *FigTree* (versão 1.4.2). Tomando o número de acesso *GenBank* NC_007243.1 como

referência, os SNP nas posições 4134 e 4468 foram observados em todas as sequências de mtDNA, obtidas de humanos, símios e mosquitos, para verificar se eles são úteis para distinguir *P. simium* e *P. vivax*. Como sugerido por Brasil *et al.* (2017) [11], *P. vivax* deveria ter T/A e *P. simium* C/G nas posições 4134 e 4468, respectivamente.

RESULTADOS

A rede compreendendo apenas amostras deste estudo (n = 29) é mostrada na Figura 2, enquanto a rede de haplótipos e a árvore filogenética criada usando todo o conjunto de dados (n = 178) são mostradas na Figura 3.

Figura 2 – Rede de haplótipos de genoma mitocondrial de *Plasmodium vivax/simium* coletados em Mata Atlântica, Espírito Santo, Brasil. Aqui, 29 amostras são apresentadas; 22 de humanos, seis de mosquitos do gênero *Anopheles* e uma de um símio do gênero *Allouata*.

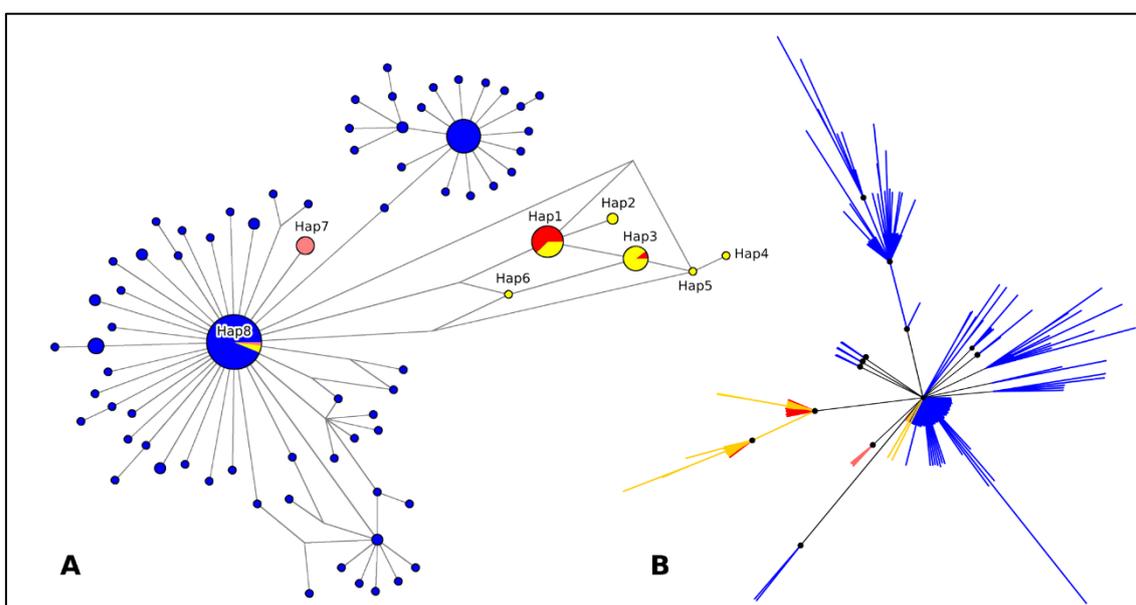


Fonte: Resultado da pesquisa.

Entre os 22 isolados obtidos a partir de sangue humano de habitantes da Mata Atlântica, sete haplótipos distintos foram identificados (Figuras 2, 3A: Hap1, Hap2, Hap3, Hap4, Hap5, Hap6 e Hap8). Dois deles (Figuras 2, 3A: Hap1 e Hap3) foram compartilhados com amostras isoladas de símios. Hap3 continha SNPs idênticos aos das sequências de *P. simium* depositadas no *GenBank*, como mostrado na Figura 3A. Hap1 continha SNPs idênticos aos da sequência do isolado obtido do símio capturado na área de estudo. Duas outras amostras obtidas dos isolados humanos (Figura 3A:

Hap8) continham SNPs idênticos aos encontrados nos isolados de infecções humanas adquiridas na região Amazônica (*P. vivax*). Os quatro haplótipos restantes (Hap2, Hap4, Hap5 e Hap6) continham SNPs exclusivos da área deste estudo (Figura 3A, Tabela 2).

Figura 3 – Rede de haplótipos de genoma mitocondrial e árvore filogenética de *Plasmodium vivax/simium* do Brasil. São apresentadas 178 amostras, incluindo as 29 do estado do Espírito Santo. A rede de haplótipos A e a árvore filogenética B tem o mesmo padrão de cor, agrupadas por hospedeiros: azul para casos humanos da região Amazônica; amarelo para casos humanos da Mata Atlântica; vermelho para símios de Mata Alântica; rosa para mosquitos *Anopheles* de Mata Atlântica. PPB $\geq 0,95$ são indicados com círculos negros na árvore filogenética.



Fonte: Resultado da pesquisa.

Conforme demonstrado na Figura 2, três haplotipos foram identificados nos isolados obtidos dos anofelinos (Hap7, Hap7a e Hap8): destes, dois eram exclusivos do vetor (Figuras 2, 3A: Hap7 e Hap7a), enquanto o terceiro (Figura 3A: Hap8) foi idêntico ao haplótipo identificado nos isolados da região Amazônica, bem como em dois isolados humanos da área de estudo (Tabela 2).

Tabela 2 – SNPs do genoma mitocondrial de *Plasmodium vivax/simum* de amostras humanas, símias.

Haplótipo	Amostra	Fonte	SNPs (posição baseada no número de acesso NC_007243.1 do GenBank)						
			463	1342	3325	4134*	4468*	4511	5322
Hap1	PsimiumES	Macaco	T	C	A	C	G	G	A
Hap1	1312MT	Humano
Hap1	1565MT	Humano
Hap1	VC57MT	Humano
Hap1	OJA51_MT	Humano
Hap1	ACC54_MT	Humano
Hap1	SV555_MT	Humano
Hap2	JSB62_MT	Humano	.	G
Hap2	RO54_MT	Humano	.	G
Hap3	GAB847_MT	Humano	.	.	T
Hap3	/1272MT	Humano	.	.	T
Hap3	1411MT	Humano	.	.	T
Hap3	1760MT	Humano	.	.	T
Hap3	1451MT	Humano	.	.	T
Hap3	FW63MT	Humano	.	.	T
Hap3	143MT	Humano	.	.	T
Hap3	111MT	Humano	.	.	T
Hap3	AJR54_MT	Humano	.	.	T
Hap4	ALNL53MT	Humano	.	.	T	T	.	.	C
Hap5	MA5M61_MT	Humano	.	.	T	T	.	.	.
Hap6	761MT	Humano	.	.	T	.	A	.	.
Hap7a**	479mosq	Mosquito	A	.	.	T	A	C	.
Hap7	485mosq	Mosquito	.	.	.	T	A	C	.
Hap7	632mosq	Mosquito	.	.	.	T	A	C	.
Hap7	343mosq	Mosquito	.	.	.	T	A	C	.
Hap7	260mosq	Mosquito	.	.	.	T	A	C	.
Hap8	1294mosq	Mosquito	.	.	.	T	A	.	.
Hap8	40MT	Humano	.	.	.	T	A	.	.
Hap8	103_03MT	Humano	.	.	.	T	A	.	.

e de mosquitos do Espírito Santo, Brasil

*SNPs sugeridos por Brasil et al. (2007) para diferenciar *P. vivax* (T/A) e *P. simium* (C/G); ** Hap7a é representado como Hap7 no conjunto de dados completo com 178 amostras porque a posição 463 foi excluída do banco de dados completo devido a nucleotídeos ausentes em uma ou mais sequências neste locus.

A divergência genética dentro dos haplótipos obtidos na Mata Atlântica é muito baixa, com apenas sete SNPs identificados a partir de um trecho de DNA de 5590 pb (distância p máxima 0,1%) (Tabela 2). Entre estes, três SNPs foram encontrados na região não codificadora do genoma mitocondrial, um SNP dentro da sequência do gene CYTB (mutação sinônima) e três SNPs dentro da sequência do gene COX1 (uma mutação sinônima e duas não sinônimas). As sequências COX3 foram conservadas em todas as amostras da Mata Atlântica. Além disso, tanto a diversidade de haplótipos (Hd) quanto a diversidade nucleotídica (Pi) foram baixas para as amostras desse bioma (Tabela 3). Curiosamente, mesmo os isolados de símios se apresentando mais geograficamente distribuídos do que os isolados de mosquitos, tiveram menor Hd e Pi (Tabela 3).

Os dois SNPs sugeridos por Brasil *et al.* (2017) [11] não se mostraram úteis para distinguir *P. simium* de *P. vivax*, ao menos para as amostras deste estudo. Isto porque alguns haplótipos apresentaram sequências diferentes das propostas como distintivas entre *P. simium* e *P. vivax*. Mais especificamente, eles mostraram uma combinação destas sequências (Tabela 2: Hap4, Hap5, Hap6). A árvore filogenética (Figura 3B) também mostrou que os isolados extraídos de humanos, mosquitos e símios não eram reciprocamente monofiléticos e algumas dessas sequências mantiveram-se agrupadas com alto suporte estatístico (BPP \geq 95%). A rede de haplótipos mostrou um relacionamento reticulado entre haplótipos, sem evidência de isolamento de qualquer haplótipo e com apenas uma ou duas etapas de mutação conectando todas as sequências das amostras da Região da Mata Atlântica.

Tabela 3 – Número de haplótipos, diversidade de nucleotídeos e diversidade de haplótipos em genomas mitocondriais de *Plasmodium vivax/simium* amostrados de diferentes hospedeiros em regiões amazônicas e extra-amazônicas, no Brasil.

Fonte dos isolados	Número dos isolados	Número dos haplótipos	Diversidade nucleotídica (Pi)	Diversidade haplotípica (Hd)
Humanos (Amazônia)	139	69	0.00047	0.880
Humanos (Mata Atlântica)	22	7	0.00023	0.771
Mosquitos	6	3	0.00011	0.600
Símios	11	2	0.00003	0.182
Total	178	76	0.00051	0.907

DISCUSSÃO

Plasmodium vivax é um protozoário de distribuição cosmopolita, causando infecções em populações em diferentes continentes. Seu similar sul-americano, o *P. simium*, é o agente etiológico da malária em símios que habitam a Mata Atlântica [34]. Vários estudos sugeriram que *P. vivax* e *P. simium* são a mesma espécie, com base em suas semelhanças genéticas [5-10]. Em algumas áreas, incluindo a do presente estudo, tanto símios quanto humanos estão infectados por este agente, tornando plausível a hipótese de zoonose. Os resultados do presente estudo, mostrando uma diversidade haplótipica em uma situação de baixa divergência genética no Espírito Santo, indicam a heterogeneidade dos isolados obtidos de diferentes hospedeiros e fortalecem a compreensão de que *P. vivax* e *P. simium* são a mesma espécie com pequenas variações genéticas. Além disso, estes resultados corroboram os achados de Costa (2014) [35] e Rodrigues *et al.* (2017) [25], cujas análises filogenéticas de amostras de diferentes regiões do mundo indicaram uma recente transferência do parasito dos humanos para os símios do Novo Mundo.

Entre os oito haplótipos identificados na área de estudo, dois eram comuns aos humanos e aos símios com base em sequências depositadas no *GenBank*, bem como naquela obtida a partir do símio local. Esse achado representa evidência de transmissão do parasito de um hospedeiro para outro. Ao mesmo tempo, tal compartilhamento não pôde ser confirmado para os demais haplótipos, já que as sequências eram claramente distintas. Quatro dos haplótipos obtidos de humanos eram exclusivos da área de estudo e os dois restantes eram compatíveis com aqueles considerados próprios da região Amazônica [25]. A inclusão de amostras obtidas a partir de mosquitos para a comparação das sequências mitocondriais nunca foi realizada antes no Brasil, apesar de ter sido anteriormente sugerida por Brasil *et al.* (2017) [11]. Curiosamente, os resultados deste estudo não foram consistentes com Rodrigues *et al.* (2017) [25], que sugeriram que dois SNPs eram distintos entre a malária da Mata Atlântica (C/G) e da região Amazônica (A/T). Em vez disso, o DNA extraído de mosquitos coletados na estação de captura permanente dentro da floresta de Mata Atlântica do Espírito Santo revelou os nucleotídeos A/T nestes *loci*. Esses mesmos SNPs também foram propostos por Brasil *et al.* (2017) [11] como distintivos entre *P. vivax* e *P. simium*. No entanto, os resultados atuais demonstram que os SNPs não conseguiram distinguir as duas linhagens no Espírito Santo, já que não foram conservados em pelo menos três amostras de seres humanos na área de estudo

(Tabela 2). Além disso, foi demonstrado que os isolados de diferentes hospedeiros compartilham haplótipos e não há evidências de monofilia entre amostras humanas e simianas.

Os mosquitos responsáveis pela transmissão da malária no sistema de Mata Atlântica pertencem ao subgênero *Kerteszia*, com a espécie *Anopheles (Kerteszia) cruzii* [26, 36, 37] sendo a mais abundante. Espécimes de espécies do subgênero *Nyssorhynchus* também foram capturados na região, mostrando-se infectados por *P. vivax/simium* recuperado do sangue contido no abdômen [26]. Embora seja possível que os mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* estejam sendo infectados durante o repasto de sangue humano, o papel deles como vetores é improvável. O fato de que o haplótipo 8 foi obtido de seres humanos e de apenas um *pool* de *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* capturado perto das moradias sugere que os mosquitos foram infectados pelos seres humanos acidentalmente. O haplótipo 8 tem sequências idênticas às consideradas específicas para a região Amazônica. Dois outros haplótipos (Hap7 e Hap7a), obtidos de outros mosquitos, apesar de estarem intimamente relacionados com os da região Amazônica, também têm SNPs distintos, o que os torna exclusivos para os mosquitos da área de estudo (Figuras. 2, 3, Tabela 2).

O estudo tem algumas limitações. O DNA do parasito foi obtido de seres humanos, do símio e dos mosquitos em diferentes períodos, impedindo assim conclusões em relação à possível circulação de todos os haplótipos com a mesma magnitude ao mesmo tempo. Além disso, apenas uma única amostra proveniente de símio estava disponível, impedindo a determinação da diversidade dos haplótipos que infectam esse hospedeiro (Figura 2). A rede de haplótipos construída com os dez símios da Mata Atlântica revelou dois diferentes haplótipos compartilhados com seres humanos na área deste estudo (Figura 3A: Hap1 e Hap3). Araújo *et al.* (2013) [38] destacam a aparente escassez da malária simiana na região Amazônica, atribuindo o fato a dificuldades para se capturar primatas não humanos e obter amostras de boa qualidade. As mesmas dificuldades são aplicáveis às condições da Mata Atlântica.

A diversidade genética encontrada no presente estudo é maior do que a relatada por Brasil *et al.* (2017) [11]. A presença de sequências identificadas em isolados obtidos de mosquitos e compartilhadas por dois isolados de seres humanos, mas diferentes daquelas obtidas de símios no Espírito Santo, indica que o ciclo de

transmissão da malária residual é complexo e não pode ser adequadamente verificado apenas por alguns estudos com poucas amostras. Os dados sugerem que a transferência interespecie dos parasitos já ocorreu no passado ou ainda está ocorrendo. Contudo, a intensidade, a frequência e a direção desta transferência ainda precisam ser esclarecidas.

O mérito do presente estudo, semelhantemente ao de Brasil *et al.* (2017) [11], é documentar a presença do mesmo parasito em hospedeiros humanos e símios. Encontrar o mesmo parasito em duas espécies hospedeiras é necessário, mas não suficiente, para confirmar uma zoonose. O processo de verificação de um ciclo zoonótico demandaria a demonstração de diferentes diversidades genéticas dos parasitos entre hospedeiros e uma estimativa do tempo para o antepassado comum mais recente por análise filogenética de espécimes isolados de ambos os hospedeiros.

Tal abordagem foi realizada para analisar a transmissão de *Plasmodium knowlesi*, quando foi visto um maior número de genótipos nas infecções em símios do que nas infecções em humanos [39]. Além disso, o tempo para o antepassado comum mais recente com base na análise de mtDNA revelou que a espécie seria derivada de uma população de parasitos ancestral, que existia antes da colonização humana no sudeste da Ásia [39]. Ambas as descobertas foram capazes de apoiar a hipótese de uma zoonose real, apontando para uma transferência recente dos parasitos para a população humana. No caso do *P. vivax/simum*, no entanto, a evidência aponta para a direção oposta.

Aqui, a diversidade haplotípica é menor entre os símios e as análises filogenéticas indicam uma transferência recente das espécies dos humanos para os símios [25, 34]. Conseqüentemente, o presente estudo, tal como o estudo de Brasil *et al.* (2017) [11], não é suficiente para determinar definitivamente como a transferência ocorre na Mata Atlântica, impedindo qualquer conclusão em relação a um ciclo zoonótico. Ao incluir mais amostras de símios e vetores, todos obtidos no mesmo período, estudos futuros devem viabilizar uma compreensão mais profunda do ciclo de transmissão singular desta doença endêmica.

CONCLUSÃO

O sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *P. vivax/simium* em uma área da Mata Atlântica no Brasil revelou oito haplótipos, dois dos quais foram compartilhados por hospedeiros humanos e símios. Curiosamente, os outros seis haplótipos eram distintos, abrigando sequências exclusivas originadas de infecções humanas na Mata Atlântica ou idênticas às da região Amazônica. Tais resultados indicam a possibilidade de um ciclo zoonótico, mas, dada a diversidade observada nos haplótipos, mais estudos são necessários para estabelecer melhor a dinâmica da transferência de parasitos entre humanos e símios.

ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico; PCR: reação em cadeia da polimerase; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; km: quilômetros; ° C: graus Celsius; kb: kilobases; µl: microlitros; U: unidade; µM: micromolares; mM: milimolares; T: timina; A: adenina; C: citosina; G: guanina; IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis; SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade; pb: par de bases.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

JCB e CCJ conceberam a ideia central do estudo. JCB, CCJ e ACL escreveram a primeira versão do manuscrito. CCJ, HRR, AMCRD e AF contribuíram com assistência entomológica e epidemiológica. JCB, LN e RSM foram responsáveis pelo diagnóstico das infecções. PTR e LCS deram o suporte científico e técnico para a amplificação do genoma mitocondrial e seu sequenciamento. JCB, PTH e LCS trabalharam na análise laboratorial para amplificação e sequenciamento. PTR, ACL e CRV analisaram os dados das sequências. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo pelo apoio logístico para a realização do trabalho de campo. Nosso sincero

agradecimento ao Dr. Marcelo Urbano Ferreira pela leitura crítica, pela doação de reagentes e por manter sempre as portas abertas em seu laboratório. Agradecemos especialmente à população de Santa Teresa por sua calorosa recepção e sua confiança em nosso trabalho.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

DISPONIBILIDADE DE DADOS E MATERIAIS

Alguns conjuntos de dados analisados durante o presente estudo não estão disponíveis publicamente devido ao volume de dados e em deferência a outros colegas, cujos dados ainda não foram publicados, mas estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação

CONSENTIMENTO PARA PUBLICAÇÃO

Amostras biológicas de seres humanos foram remanescentes de um projeto anterior cujos dados já foram publicados [16]. Foram obtidos termos de consentimento dos indivíduos naquela ocasião. Como os outros dados (vetores e símios) foram coletados primariamente para este projeto, não foi necessário qualquer consentimento de terceiros.

APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR

A coleta de amostras de sangue humano foi realizada em um estudo prévio [16] e este material permaneceu armazenado desde então. No estudo anterior, as amostras de sangue foram coletadas somente após o termo de consentimento ter sido assinado. A coleta de amostras de sangue de símio e de espécimes de mosquitos [26] teve autorização do órgão responsável (IBAMA/SISBIO; Número 2508929).

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi apoiada pelo CNPq/Ministério da Saúde-Decit/Secretaria do Estado da Saúde do Espírito Santo/Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo (Edital 10/2013 PPSUS- 65834119/2014). JCB possui bolsa de doutorado da Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo (FAPES, 139/14). ACL possui bolsa de estudos de pós-doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo (CAPES/FAPES, 68854315/14). O órgão de financiamento não teve influência no delineamento do estudo e na coleta, análise e interpretação dos dados, nem sobre a redação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. De Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araújo MP, Suarez-Mutis MC, Santelli ACF, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109:618–33.
2. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2000 a 2011. *Boletim Epidemiológico*. 2013;44. Brasília.
3. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malária control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101:229–37.
4. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitaemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2013; 11:623–39.
5. Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87:1–20.
6. Goldman IF, Qari SH, Millet PG, Collins WE, Lal AA. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. *Mol Biochem Parasit*. 1993; 57:177–80.
7. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:8124–9.

8. Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:14455–60.
9. Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102:15523–8.
10. Tazi L, Ayala FJ. Unresolved *direction of host transfer of Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. Infect Genet Evol. 2011; 11:209–21.
11. Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco C Jr, Silva S, et al. *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonoses with outbreak potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest. Lancet Glob Health. 2017; 5:1038–46.
12. Downs WG, Pittendrigh CS. Bromelian malaria in Trinidad, British West Indies. Am J Trop Med. 1946; 26:47–66.
13. Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária vivax no foco Aldeia dos índios, município de Peruíbe, Estado de São Paulo, 1984 a 1986. Cad Saúde Públ. 1988; 4:276–92.
14. Curado I, Duarte AMRCD, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92:235–43.
15. Curado I, Malafrente RS, Duarte AMRC, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EAB. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2006; 100:54–62.
16. Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab C, Rezende HR, Duarte AM, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malar J. 2007; 6:33.
17. Lal AA, La De, Cruz VF, Collins WE, Campbell GH, Procell PM, McCutchan TF. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? J Biol Chem. 1988; 263:5495–8.

18. Arruda ME, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41:379–85.
19. Fandeur T, Volney B, Peneau C, De Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae*. *Parasitology* 2000; 120:11–21.
20. Volney B, Pouliquen JF, De Thoisy B, Fandeur T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey population in French Guiana. *Acta Trop.* 2002; 82:11–23.
21. Duarte AM, Porto MAL, Curado I, Malafronte RS, Hoffmann EHE, Oliveira SG, et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol.* 2006; 35:87–96.
22. Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C, Curado I, Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop.* 2008; 107:179–85.
23. Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa MEL, Dafne VD, Neves A, et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol.* 2011; 40:392–400.
24. Costa DC. A infecção malárica pelo *Plasmodium simium*/*Plasmodium vivax* em primatas não humanos da Mata Atlântica brasileira, 2014. p. 178 [Tese de Doutorado, Centro de Pesquisas René Rachou—Fundação Oswaldo Cruz].
25. Rodrigues PT, Valdivia HO, Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti Jr C, et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *bioRxiv.* 2017. doi: 10.1101/141853.
26. Buery JC, Rezende HR, Natal L, Santana LS, Menezes RMT, Fux B, et al. Ecological characterization 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? *bioRxiv.* 2017. doi: 10.1101/146803.
27. Kimura M, Kaneco O, Liuc Q, Zhouc M, Kawamotoc F, Watayad Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int.* 1997; 46:91–5.

28. Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health*. 2002; 7:231–9.
29. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, et al. Sensitive, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60:183–7.
30. Rodrigues PT, Alves JMP, Santamaria AM, Calzada JE, Xayavong M, Parise M, et al. Using mitochondrial genome sequences to track the origin of imported *Plasmodium vivax* infections diagnosed in the United States. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 90:1102–8.
31. GenBank. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, Bethesda. 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>. Accessed 17 Oct 2017.
32. Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999; 16:37–48.
33. Network. Fluxus Technologies, Suffolk. 2017. <http://www.fluxus-engineering.com>. Accessed 23 Feb 2017.
34. Deane LM, Ferreira Neto JA, Okumura M, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1969; 11:71–86.
35. Costa DC, Assis GMP, Silva FAS, Araújo FC, de Souza Junior JC, Braga Hirano ZM, et al. *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-related malaria parasite: genetic variability of Duffy binding protein II and the Duffy antigen/receptor for chemokines. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0131339.
36. Rezende HR, Soares RM, Cerutti C, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, 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. *Neotrop Entomol*. 2009; 38:272–80.
37. Rezende HR, Falqueto A, Urbinatti PR, De Menezes RM, Natal D, Cerutti C Jr. Comparative study of distribution of anopheline vectors (Diptera: Culicidae) in areas with and without malaria transmission in the highlands of an extra-Amazonian region in Brazil. *J Med Entomol*. 2013; 50:598–602.

38. Araújo MS, Messias MR, Figueiró MR, Gil LHS, Probst CM, Vidal NM, et al. Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). *Malar J.* 2013; 12:180.

39. Lee KS, Divis PCS, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, et al. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog.* 2011; 7:1002015.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o presente estudo, diferentes aspectos da transmissão da malária da região endêmica do Espírito Santo foram abordados. As distintas técnicas e a variedade de informações se completam quando o conjunto de resultados é observado. Desde a coleta dos insetos até a análise computacional das sequências, a preocupação com a elucidação da cadeia de transmissão esteve presente.

A primeira publicação científica mostra que houve pouca mudança no comportamento do vetor na região estudada. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* permanece sendo o mosquito com maior evidência de infecção natural em Valsugana Velha e mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* não parecem participar da cadeia de transmissão. O comportamento acrodendrofilico de *A. (K.) cruzii*, particularmente daqueles infectados, fortalece a hipótese de que a presença de *P. vivax/simium* nos espécimes resulta da hematofagia em animais que vivem na copa das árvores, como os símios.

Paralelamente, o sequenciamento do genoma mitocondrial completo de *P. vivax/simium* nessa mesma área da Mata Atlântica no Brasil revelou oito haplótipos, dois dos quais foram compartilhados por hospedeiros humanos e símios. Curiosamente, os outros seis haplótipos eram distintos, abrigando sequências exclusivas provenientes de infecções humanas na Mata Atlântica ou idênticas àquelas da região Amazônica. Tais resultados indicam a transferência dos parasitos entre hospedeiros símios e humanos, embora a intensidade, a frequência e a direção desta transferência permaneçam a ser determinadas. Assim, dada a diversidade observada nos haplótipos, mais estudos são necessário para que se possa conhecer melhor a dinâmica da transferência de parasitos entre humanos e simios.

8 CONCLUSÕES

- *Anopheles (Kerteszia) cruzii* continua sendo a espécie de anofelino mais capturada (73,8%), especialmente nas armadilhas localizadas nas copas das árvores;
- *Anopheles (Kerteszia) cruzii* permanece sendo o mosquito com maior evidência de infecção natural (10 em 13 infectados, ou 76,9%), com exemplares positivos para presença de *P. vivax/simium* encontrados tanto em armadilha de copa quanto nas próximas ao solo;
- Mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* não parecem participar da cadeia de transmissão já que, ao contrário de 10 anos atrás, os resultados recentes não mostraram evidências de DNA de *Plasmodium* spp. em seus tóraces.
- Pela primeira vez, mediante desenvolvimento de protocolo específico, sequências de genomas mitocondriais completos dos *P. vivax/simium* encontrados nos mosquitos da Mata Atlântica brasileira foram publicadas e estão disponíveis no *GenBank*;
- O sequenciamento dos genomas mitocondriais completos de *P. vivax/simium* da Mata Atlântica do Espírito Santo revelou oito haplótipos, dois dos quais foram compartilhados por hospedeiros humanos e pelo símio;
- Os outros seis haplótipos eram distintos entre si e agrupavam sequências exclusivas de infecções humanas de Mata Atlântica ou eram idênticos aos da região Amazônica;
- Parece haver a possibilidade de um ciclo zoonótico no estado do Espírito Santo. Porém, frente à diversidade haplotípica observada, mais estudos, que incluam amostras de símios e vetores obtidas em um mesmo período de tempo, são necessários para esclarecer a dinâmica da transferência dos parasitos entre hospedeiros.

9 REFERÊNCIAS

1. DOWNS, W.G.; PITTENDRIGH, C.S. Bromelian malaria in Trinidad, British West Indies. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 26, p. 47-66, 1946.
2. GRIFFING, S.M.; TAUIL, P.L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 710-718, 2015.
3. DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 5-14, 1986.
4. COURA, J.R.; SUAREZ-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, p. 229–237, 2006.
5. YALCINDAG, E.; ELGUERO, E.; ARNATHAU, C.; DURAND, P.; AKIANA, J.; ANDERSON, T.; 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.
6. GADELHA, P. Conforming strategies of public health campaigns to disease specificity and national contexts: Rockefeller Foundation's early campaigns against hookworm and malaria in Brazil. **Parasitologia**, v. 40, n. 1-2, p. 159-175.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Departamento de Erradicação e Controle de Endemias. **O controle de endemias no Brasil: de 1979 a 1984**. Brasília: SUCAM, 1985.
8. Barata RB. **Malária e seu controle**. 1. ed. São Paulo: Hucitec; 1998.
9. 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.
10. TAUIL, P.; DEANE, L.; SABROZA, P.; RIBEIRO, C. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 71–111, 1985.
11. CURADO, Izilda. **Soroepidemiologia de malária em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo**. 1996. Dissertação (Mestrado em

Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

12. CURADO, I.; DUARTE, A.M.R.C.; LAL, A.A.; OLIVEIRA, S.G.; KLOETZEL, J.K. 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.
13. CERUTTI, Jr Crispim. **Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.
14. CERUTTI, C. Jr; BOULOS, M.; COUTINHO, A.F.; HATAB, M.C.L.D.; FALQUETO, A.; REZENDE, H.R.; 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.
15. RACHOU, R. G. Da infectibilidade dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* pelos parasitas da malária humana. **A Folha Médica**, v. 27, p. 181-183, 1946.
16. CORRÊA, R.R.; FORATTINI, O.P.; GUARITA, O.F.; RABELLO, E.X. Observações sobre o vôo do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator*, vetores de malária (*Diptera, Culicidae*). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v. 26, p. 333-342, 1961.
17. FERREIRA, E.; CORRÊA, R.R.; TOMICH, A.; SÁ, F.T. Estudo sobre o raio de vôo do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator* em Guaratuba, litoral do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, p. 819-822, 1969.
18. DUARTE, A.M.C.R.; MALAFRONTTE, R.S.; CERUTTI, C. Jr; CURADO, I.; PAIVA, B.R.; MAEDA, A.Y.; et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.
19. DEANE, L.M.; CAUSEY, O.R.; DEANE, M.P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, p. 827-966, 1948.
20. FORATTINI, O.P.; GOMES, A.C.; SANTOS, J.L.F.; KAKITANI, I.; MARUCCI, D. Freqüência 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.

21. FORATTINI, O.P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; GOMES, A.C. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 1 – Parity of blood seeking *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 1993a.
22. FORATTINI, O.P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; GOMES, A.C. 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, 1993b.
23. GUIMARÃES, A.E.; GENTILE, C.; LOPES, C.M.; MELLO, R.P. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil: II – Habitat distribution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 17-28, 2000.
24. BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde lança Plano de Eliminação da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20609-ministerio-da-saude-lanca-plano-de-eliminacao-da-malaria-no-brasil>> Acesso em: 08 fev. 2016.
25. CANCIAN, Natália. Casos de malária invertem tendência de queda e aumentam 28% neste ano. **Folha de São Paulo**. 10 out. 2017. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2017/10/1926086-casos-de-malaria-invertem-tendencia-de-queda-e-aumentam-28-neste-ano.shtml>>. Acesso em: 18 dez. 2017.
26. FORMENTI, Lígia. Casos de malária voltam a crescer no Brasil, aponta Ministério da Saúde. **UOL Notícias Ciência e Saúde**. 10 out. 2017a. Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/estado/2017/10/10/casos-de-malaria-voltam-a-crescer-no-brasil-mostra-ministerio-da-saude.htm>>. Acesso em: 18 dez. 2017.
27. FORMENTI, Lígia. Casos de malária voltam a crescer no Brasil. **Estadão Saúde**, 2017b. Disponível em: <<http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,casos-de-malaria-voltam-a-crescer-no-brasil,70002036979>>. Acesso em: 18 dez. 2017.
28. BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de Eliminação da Malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/04/Plano-eliminacao-malaria-pub.pdf>> Acesso em: 09 dez. 2017.

29. ESPÍRITO SANTO. Secretaria do Estado da Saúde. Programa Estadual de Controle da Malária. **Informe Técnico**. Vitória: SESA, 2004.
30. REZENDE, H.R.; SOARES, R.M.; CERUTTI, C. Jr; ALVES, I.C.; NATAL, D.; URBINATTI, P.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.
31. REZENDE, H.R.; FALQUETO, A.; URBINATTI, P.R.; DE MENEZES, R.M.; NATAL, D.; CERUTTI, C. Jr. Comparative study of distribution of anopheline 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.
32. ALENCAR, F.E.C.; MALAFRONTTE, R.S.; CERUTTI, C. Jr; NATAL, L.; BUERY, J.C.; FUX, B.; et al. Reassessment of asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. in an endemic area with a very low incidence of malaria in extra-Amazonian Brazil. **Malaria Journal**, v. 16, p. 452, 2017.
33. MENEGUZZI, V.C.; DOS SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; FEITOZA, L.R.; FEITOZA, H.N.; FALQUETO, A. 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.
34. ROSA-FREITAS, M.G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE CARVALHO-PINTO, C.J.; FLORES-MENDOZA, C.; SILVA-DO-NASCIMENTO, T.F. Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 651–655, 1998.
35. SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. **Informativo Programa de Malária: Vetores**. São Paulo: SESA, 2015. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/vetores>>. Acesso em: 08 fev. 2016.
36. SHANNON, R.C. Anophelines of the Amazon Valley. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 35, p. 117-143, 1933.

37. LAPORTA, G.Z.; LINTON, Y-M.; WILKERSON, R.C.; BERGO, E.S.; NAGAKI, S.S.; SANT'ANA, D.C.; et al. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 426, 2015.
38. FONTOURA, N.G.; ARAKI, A.S.; VAN-DER-MAAS-AZEVEDO, R.; GALARDO, A.K.; PEIXOTO, A.A.; LIMA, J.B. Hybrid sterility in crosses between two Brazilian sibling species of the *Anopheles albitarsis* complex. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 559, 2014.
39. LORENZ, C.; MARQUES, T.; SALLUM, M.A.; SUESDEK, L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 257, 2012.
40. CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p. 228, 1994.
41. GUIMARÃES, A.E. **Aspectos da ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1998.
42. FORATTINI, O.P.; LOPES, O.S.; RABELO, E.X. Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 2, p. 111-173, 1968.
43. ALVARENGA, D.A.M.; PINA-COSTA, A.; BIANCO, C.; MOREIRA, S.B., BRASIL, P.; PISSINATTI, A.; et al. New potential *Plasmodium brasilianum* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malaria Journal**, v. 16, p. 71, 2017.
44. COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 579-592, 2007.
45. DEANE, L.M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 1–20, 1992.
46. DE ALVARENGA, D.A.M.; PINA-COSTA, A.; DE SOUSA, T.N.; PISSINATTI A.; ZALIS, M.G.; SUARÉZ-MUTIS, M.C; 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, p. 81, 2015.

47. GRIGG, J.M.; SNOUNOU, G. *Plasmodium simium*: a Brazilian focus of anthropozoonotic vivax malaria? **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. 961-962, 2017.
48. FUENTES-RAMÍREZ, A.; JIMÉNEZ-SOTO, M.; CASTRO, R.; ROMERO-ZUÑIGA, J.J.; DOLZ, G. Molecular Detection of *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* in Non-Human Primates in Captivity in Costa Rica. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170704, 2017.
49. GOLDMAN, I.F.; QARI, S.H.; MILLET, P.G.; COLLINS, W.E.; LAL, A.A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, p. 177–180, 1993.
50. ESCALANTE, A.A.; FREELAND, D.E.; COLLINS, W.E.; LAL, A.A. 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, p. 8124–8129, 1998.
51. LECLERC, M.C.; DURAND, P.; GAUTHIER, C.; PATOT, S.; BILLOTTE, N.; et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 4455–4460, 2004.
52. 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, p. 15523–15528, 2005.
53. 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, p. 209–221, 2011.
54. LALREMRUATA, A.; JEYARAJ, S.; ENGLEITNER, T.; JOANNY, F.; LANG, A.; BÉLARD, S.; et al. Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 398, 2017.
55. GUIMARÃES, L.O.; BAJAY, M.M.; WUNDERLICH, G.; BUENO, M.G.; RÖHE, F.; CATÃO-DIAS, J.I.; 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.

56. LALREMURATA, A.; MAGRIS, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; KOEHLER, M.; ESEN, M.; KEMPAIAH, P.; et al. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **BioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1186–1192, 2015.
57. DUARTE, A.M.C.R; PEREIRA, D.M.; DE PAULA, M.B.; FERNANDES, A.; URBINATTI, P.R.; RIBEIRO, A.F.; et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 58, 2013.
58. CARVALHO, M.E.; GLASSER, C.M.; CIARAVOLO, R.M.C.; ETZEL, A.; SANTOS, L.A.; FERREIRA, C.S. Sorologia de malária vivax no foco Aldeia dos índios, município de Peruíbe, Estado de São Paulo, 1984 a 1986. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, p. 276–292, 1988.
59. CURADO, I.; MALAFRONTTE, R.S.; DUARTE, A.M.R.C.; KIRCHGATTER, K.; BRANQUINHO, M.S.; GALATI, E.A.B. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v.100, p. 54–62, 2006.
60. LAL, A.A.; LA, D.E.; CRUZ, V.F.; COLLINS, W.E.; CAMPBELL, G.H.; PROCELL, P.M.; et al. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 5495–5498, 1988.
61. ARRUDA, M.E.; NARDIN, E.H.; NUSSENZWEIG, R.S.; COCHRANE, A.H. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 379–385, 1989.
62. FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae*. **Parasitology**, v. 120, n. 11, p. 21, 2000.
63. VOLNEY, B.; POULIQUEN, J.F.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey population in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 11, p. 23, 2002.

64. DUARTE, A.M.C.R.; PORTO, M.A.L.; CURADO, I.; MALAFRONTA, R.S.; HOFFMANN, E.H.E.; OLIVEIRA, S.G.; et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, p. 87–96, 2006.
65. YAMASAKI, T.; DUARTE, A.M.C.R.; CURADO, I.; SUMMA, M.E.L.; DAFNE, V.D.; NEVES, A.; et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, n. 40, p. 392–400, 2011.
66. COSTA, Daniela Camargos. **A infecção malárica pelo *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* em primatas não humanos da Mata Atlântica brasileira**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
67. RODRIGUES, P.T.; ALVES, J.M.P.; SANTAMARIA, A.M.; CALZADA, J.E.; XAYAVONG, M.; PARISE, M.; et al. Using mitochondrial genome sequences to track the origin of imported *Plasmodium vivax* infections diagnosed in the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 1102–1108, 2014.
68. RODRIGUES, P.T.; VALDIVIA, H.O.; OLIVEIRA, T.C.; ALVES, J.M.P.; DUARTE, A.M.R.C.; CERUTTI, C. Jr; et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1993, 2018.
69. AUBURN, S.; BARRY, A.E. Dissecting malaria biology and epidemiology using population genetics and genomics. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 77-85, 2017.
70. KOEPFLI, C.; RODRIGUES, P.T.; ANTAO, T.; ORJUELA-SANCHEZ, P.; VAN DEN EEDE, P.; et al. *Plasmodium vivax* Diversity and Population Structure across Four Continents. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0003872, 2015.
71. KITTICHAJ, V.; KOEPFLI, C.; NGUITRAGOOL, W.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L. Substantial population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand facilitates identification of the sources of residual transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 16, v. 10, p. e0005930, 2017.
72. MU, J.; SEYDEL, K.B.; BATES, A.; SU, X.Z. Recent Progress in Functional Genomic Research in *Plasmodium falciparum*. **Current Genomics**, v. 11, n. 4, p. 279-286, 2010.

73. MURRAY, L.; MOBEGI, V.A.; DUFFY, C.W.; ASSEFA, S.A.; KWIATKOWSKI, D.P.; LAMAN, E.; et al. Microsatellite genotyping and genome-wide single nucleotide polymorphism-based indices of *Plasmodium falciparum* diversity within clinical infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 275, 2016.
74. BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
75. LORENZETTI, A.; FORNAZARI, P.A.; BONINI-DOMINGOS, A.C.; DE SOUZA RODRIGUES PENHALBEL, R.; FUGIKAHA, E.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; et al. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 8-12, 2008.
76. COSTA, M.R.; VIEIRA, P.P.; FERREIRA, C.D.E.O.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.D. Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 381-385, 2008.
77. KRAMPA, F.D.; ANIWEH, Y.; AWANDARE, G.A.; KANYONG, P. Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria. **Diagnostics (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 19, 2017.
78. DOWLING, M.A.; SHUTE, G.T. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 34, p. 249–267, 1966.
79. PAYNE, D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, p. 621–626, 1988.
80. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, p. 575–594, 1988.
81. MILNE, L.M.; KYI, M.S.; CHIODINI, P.L.; WARHURST, D.C. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, p. 740–742, 1994.

82. MANGOLD, K.A.; MANSON, R.U.; KOAY, E.S.C.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; THOMSON, R.B.; et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005.
83. EKALA, M.T.; LEKOULOU, F.; DJIKOU, S.; DUBREUIL, G.; ISSIFOU, S.; NTOUMI, F. Evaluation of a simple and rapid method of *Plasmodium falciparum* DNA extraction using thick blood smears from Gabonese patients. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 93, n. 1, p. 8-11, 2000.
84. NWAKANMA, D.C.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; WALTHER, M.; CROZIER, S.; DUBOVSKY, F.; MALKIN, E.; et al. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 11, p. 1567-1574, 2009.
85. DE ARAUJO, F.M. Comparação dos resultados do diagnóstico microscópico de malária (gota espessa) e teste molecular (PCR) em estudo de base populacional na área urbana de Mâncio Lima, AC. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 66., 2014. Rio Branco. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/66ra/resumos/resumos/6328.htm>> Acesso em: 20 dez. 2017.
86. MAENO, Y. Molecular epidemiology of mosquitoes for the transmission of forest malaria in south-central Vietnam. **Tropical Medicine and Health**, v. 45, p. 27, 2017.
87. BUERY, J.C.; REZENDE, H.R.; NATAL, L.; SANTANA, L.S.; MENEZES, R.M.T.; FUX, B.; et al. Ecological characterization and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 years period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 111-118, 2018.
88. LEE, S.H.; KARA, U.A.; KOAY, E.; LEE, M.A.; LAM, S.; TEO, D. New strategies for the diagnosis and screening of malaria. **International Journal of Hematology**, v. 7, n. 61, p. 291-293, 2002.
89. STEENKESTE, N.; INCARDONA, S.; CHY, S.; DUVAL, L.; EKALA, M.T.; LIM, P.; et al. Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers. **Malaria Journal**, n. 8, p. 86, 2009.

90. KIMURA, M.; KANECO, O.; LIUC, Q.; ZHOUC, M.; KAWAMOTOC, F.; WATAYAD, Y.; 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.
91. WIN, T.T.; LIN, K.; MIZUNO, S.; ZHOU, M.; LIU, Q.; FERREIRA, M.U.; et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. **Tropical Medicine & International Health**, v. 7, p. 231–239, 2002.
92. MIGUEL-OTEO, M.; JIRAM, A.I.; TA-TANG, T.H.; LANZA, M.; HISAM, S.; RUBIO, J.M. Nested multiplex PCR for identification and detection of human Plasmodium species including *Plasmodium knowlesi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 3, p. 299-304, 2017.
93. RUBIO, J.M.; BENITO, A.; ROCHE, J.; BERZOSA, P.J.; GARCÍA, M.L.; MICÓ, M.; et al. Seminested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 183–187, 1999.
94. HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
95. LI, J.; WIRTZ, R.A.; MCCONKEY, G.A.; SATTABONGKOT, J.; MCCUTCHAN, T.F. Transition of *Plasmodium vivax* ribosome types corresponds to sporozoite differentiation in the mosquito. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 283-289, 1994a.
96. KAMAU, E.; TOLBERT, L.S.; KORTEPETER, L.; PRATT, M.; NYAKOE, N.; MURINGO, L.; et al. Development of a Highly Sensitive Genus-Specific Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of Plasmodium by Amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2946–2953, 2011.
97. LI, J.; MCCONKEY, G.A.; ROGERS, M.J.; WATERS, A.P.; MCCUTCHAN, T.R. *Plasmodium*: the developmentally regulated ribosome. **Experimental Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 437-441, 1994b.
98. PUTAPORNTIP, C.; BUPPAN, P.; JONGWUTIWES, S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 10, p. 1484-1491, 2011.

99. GHAYOUR NAJAFABADI, Z.; OORMAZDI, H.; AKHLAGHI, L.; MEAMAR, A.R.; RAEISI, A.; RAMPISHEH, Z.; et al. Mitochondrial PCR-based malaria detection in saliva and urine of symptomatic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 358-362, 2014.
100. ISOZUMI, R.; FUKUI, M.; KANEKO, A.; CHAN, C.W.; KAWAMOTO, F.; KIMURA, M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. **Parasitology International**, v. 64, n. 3, p. 304-308, 2015.
101. HAANSHUUS, C.G.; MOHN, S.C.; MORCH, K.; LANGELAND, N.; BLOMBERG, B.; HANEVIK, K. A novel, single-amplification PCR targeting mitochondrial genome highly sensitive and specific in diagnosing malaria among returned travellers in Bergen, Norway. **Malaria Journal**, v. 12, p. 26, 2013.
102. THANAPONGPICHAT, S.; MCGREADY, R.; LUXEMBURGER, C.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F.; et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 275, 2013.
103. TRIPATHI, M.; DAS, A. Genotyping malaria parasites with DNA barcodes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 12, p. 1636–1638, 2015.
104. AYALA, F.J.; RICH, S.M. Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. **Gene**, v. 261, n. 1, p. 161-170, 2000.
105. PRUGNOLLE, F.; ROUGERON, V.; BECQUART, P.; BERRY, A.; MAKANGA, B.; RAHOLA, N.; et al. Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8123-8128, 2013.
106. BARRY, A.E.; WALTMANN, A.; KOEPFLI, C.; BARNADAS, C.; MUELLER, I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. **Pathogens Global Health**, v. 109, n. 3, p. 142-152, 2015.
107. GELABERT, P.; SANDOVAL-VELASCO, M.; OLALDE, I.; FREGEL, R.; RIEUX, A.; ESCOSA, R.; et al. Mitochondrial DNA from the eradicated European *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from 70-years old slides from the Ebro Delta in Spain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 41, p. 11495-11500, 2016.

108. TYAGI, S.; PANDE, V.; DAS, A. Whole Mitochondrial Genome Sequence of an Indian *Plasmodium falciparum* Field Isolate. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 99–103, 2014.
109. PRESTON, M.D.; CAMPINO, S.; ASSEFA, S.A.; ECHEVERRY, D.F.; OCHOLLA, H.; AMAMBUA-NGWA, A.; et al. A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. **Nature Communications**, v. 5, p. 4052, 2014.
110. JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; FERREIRA, M.U.; KANBARA, H.; HUGHES, A.L. Mitochondrial Genome Sequences Support Ancient Population Expansion in *Plasmodium vivax*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 8, p. 1733–1739, 2005.
111. CORNEJO, O. E.; ESCALANTE, A. A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 558–563, 2006.
112. BRASIL, P.; ZALIS, M.G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A.M.; BIANCO, C. Jr; SILVA, S.; et al. *Plasmodium simium* causing human malaria: a zoonoses with outbreak potential in the Rio de Janeiro Brazilian Atlantic forest. **The Lancet Global Health**, v. 5, p. 1038–1046, 2017.
113. MU, J.; JOY, D.A.; DUAN, J.; HUANG, Y.; CARLTON, J.; WALKER, J.; et al. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 8, p. 1686-1693, 2005.
114. CULLETON, R.; COBAN, C.; ZEYREK, F.Y.; CRAVO, P.; KANEKO, A.; et al. The Origins of African *Plasmodium vivax*; Insights from Mitochondrial Genome Sequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29137, 2011.
115. LIU, W. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature Communications**, v. 5, p. 3346, 2014.
116. TAYLOR, J.E.; PACHECO, M.A.; BACON, D.J.; BEG, M.A.; MACHADO, R.L.; FAIRHURST, R.M.; et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 9, p. 2050-2064, 2013.

117. MANN, R.; SHARMA, S.; MISHRA, N.; VALECHA, N.; ANVIKAR, A.R. Comparative assessment of genomic DNA extraction processes for *Plasmodium*: Identifying the appropriate method. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 52, n. 4, p. 273-80, 2015.
118. GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; NATAL, D. A new collecting chamber for a CDC-miniature trap. **Revista de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 190-191, 1985.
119. BUSTAMANTE, F.M.; PIRES, W.M. Shannon dawn trap: its use in the verification of the durability of residual toxic effects of insecticides. **Folha Médica**, v. 32, n. 8, p. 53-55, 1951.
120. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
121. BANDELDT, H-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

