

Superintendência de Controle de Endemias

Thaysa Carolina Cantanhede Figueiredo

**A infecção natural por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica – Revisão
Bibliográfica.**

São Paulo

Fevereiro 2021

Superintendência de Controle de Endemias

Thaysa Carolina Cantanhede Figueiredo

A infecção natural por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica – Revisão Bibliográfica.

**Trabalho de conclusão de curso de especialização
Apresentado a Superintendência de Controle de Endemias,
Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos
Para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme da Souza”,
Como requisito parcial para a obtenção do título de
Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e
Hospedeiros Intermediários.
Orientador (a): Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte**

São Paulo

Fevereiro 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Figueiredo, Thaysa Carolina Cantanhede
A infecção natural por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica
– revisão bibliográfica / Thaysa Carolina Cantanhede Figueiredo. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de
Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de
Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e
Hospedeiros Intermediários .

Orientação: Prof(a). Dr(a). Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte.

1. Malária. 2. Plasmodium. 3. Anopheles. 4. Vetor. 5. Reação de cadeia da polimerase.

SES/CCD/SUCEN - 101/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda sabedoria, discernimento, paciência, força e fé que sempre esteve comigo.

Agradeço a minha Mãe Marines Cantanhede Figueiredo por sempre me incentivar nos estudos e sempre me dar forças em todos os momentos da minha vida.

Agradeço o meu Pai Cosme de Jesus Ribeiro Figueiredo por estar sempre olhando e me protegendo, mesmo não estando fisicamente sei que está presente espiritualmente.

Agradeço a minha irmã Thays Cristina Cantanhede Figueiredo que uma influência e inspiração na busca por conhecimento.

Agradeço a minha orientadora Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte pela dedicação e força na implementação desse trabalho e por sempre me incentivar e animar em todas pesquisas e estudo.

Agradeço a Laura Nobo Costa, Fabiana Santos Silva, Igor Lucoves Sicchi e Amanda Lumi Kawanami por me ensinarem as técnicas de Biologia Molecular.

Agradeço a Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman, chefe do Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo por me permitir utilizar as instalações e equipamentos do laboratório.

Agradeço a Sra. Sônia, Anderson e Luciano, do Laboratório de Virologia, por sempre estarem dispostos a ajudar na conclusão de alguma atividade prática de laboratório.

Agradeço aos meus colegas, em especial Lucas Mendes, Jomar Fagundes, Cayuan Tadeu, Vinicius Lima e Aline Vieira pela parceria e conselhos durante o desenvolvimento do estudo.

Por fim, agradeço a Sucen por acreditar em mim e me oferecer essa oportunidade de desenvolver os meus conhecimentos e me tornar uma profissional mais qualificada.

RESUMO

Figueiredo, T.C.C. A infecção natural por plasmódios na Mata Atlântica- Revisão Bibliográfica.2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Vigilância e Controle de Hospedeiros Intermediários) - Centro de Formação de Recursos Humanos para SUS/SP; SUCEN, São Paulo.

Introdução: A malária é considerada uma doença infecciosa não contagiosa e de transmissão vetorial, apenas cinco espécies causam malária no ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo o vetor mosquito do gênero *Anopheles*. Na região da Mata Atlântica o principal vetor é o *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, em especial *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator*, que são os principais vetores da malária humana e símia na Mata Atlântica. **Objetivo:** Realizar uma revisão bibliográfica e atualização sobre a detecção por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica e conhecer técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao tema. **Métodos:** Para a realização da revisão bibliográfica, foram realizadas buscas nas seguintes bases de dados: Scielo, PubMed, Ministério da Saúde, BVS, entre outros, com as seguintes palavras chaves Malaria, *Anopheles*, *Plasmodium*, Mata Atlântica, vetor. Nas práticas laboratoriais foram realizadas: Extração de DNA de anofelinos (kit Quiagen), técnica de PCR em tempo real (TaqMan 18S rRNA) e PCR convencional (Cyt b) para detecção de plasmódios. **Resultados:** Foram analisados 45 artigos sobre o tema e no treinamento das técnicas foram realizadas extrações de DNA de 60 pools de fêmeas de anofelinos da região de Parelheiros (pesquisa coordenada pela Dra. Ana Maria R. de C. Duarte, FAPESP 2014/10.919-4) e realizadas as reações de PCR para a detecção de plasmódio. **Discussão:** Foi observado que na região de Mata Atlântica as taxas de infecção dos anofelinos variam nos diferentes estudos, sendo em alguns locais é maior do que em outros, contudo mais estudos deverão ser feitos para uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão nos vetores no bioma Mata Atlântica. O principal vetor o *An. cruzii*, mas foi foram encontrados vetores secundários positivos para *P. vivax* e *P. malariae*, como *An. strodei*, e *An. triannulatus*, sugerindo que em áreas de borda de floresta, com maior atividade antrópica, esses vetores potencialmente tenham um papel na transmissão, inclusive considerando a circulação de outras espécies de plasmódio, como de *P. falciparum*. **Conclusão:** Os estudos analisados apontaram que a taxa de infecção de mosquitos é variável nos anofelinos na Mata Atlântica de acordo com a localização geográfica e existem muitas lacunas nos conhecimentos da dinâmica de transmissão envolvendo portadores assintomáticos humanos e/ou reservatórios símios, portanto é de suma importância continuar os estudos na região e

adotar novas técnicas que permitam realizar a análise dos vetores infectados. A adoção da PCR em tempo real seria ideal, por apresentar maior sensibilidade e rapidez, entretanto é uma técnica com custos ainda muito elevados e deve ser avaliada para ser aplicada em atividades de Vigilância.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium*, Anopheles, vetor, Reação de cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Figueiredo, T.C.C. Natural infection by plasmodia in the Atlantic Forest - Bibliographic Review.2021. Course Conclusion Paper (Specialist in Surveillance and Control of Intermediate Hosts) - Human Resources Training Center for SUS / SP; SUCEN, São Paulo.

Introduction: Malaria is considered a non-contagious and vector-borne infectious disease, only five species cause malaria in humans: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi*, being the vector mosquito of the genus *Anopheles*. In the Atlantic Forest biome, the main vector is anophelines of subgenus *Kerteszia*, especially *Anopheles (Kerteszia) cruzii* and *Anopheles (Kerteszia) bellator*, which are the main vectors of human and simian malaria in the Atlantic Forest. **Objective:** To carry out a bibliographic review and update on the detection by *Plasmodium* in anopheles in the Atlantic Forest biome and to know Molecular Biology techniques applied to the theme. **Methods:** To carry out the bibliographic review, searches were carried out in the following databases: Scielo, PubMed, Ministry of Health, VHL, among others, with the following keywords Malaria, Anopheles, *Plasmodium*, Mata Atlântica, vector. In laboratory practices, the following were performed: DNA extraction from anopheles (Quiagen kit), real-time PCR technique (TaqMan 18S rRNA) and conventional PCR (Cyt b) to detect plasmodia. **Results:** 45 articles on the subject were analyzed and in the training of the techniques, DNA extractions were performed from 60 pools of female anopheles in the Parelheiros region (research coordinated by Dr. Ana Maria R. de C. Duarte, FAPESP 2014/10.919- 4) and performed the PCR reactions for the detection of plasmodium. **Discussion:** It was observed that in the Atlantic Forest region, anopheline infection rates vary in different studies, in some places it is higher than in others, however more studies should be done to better understand the transmission dynamics in vectors in the Atlantic forest biome. The main vector is *An. cruzii*, but secondary vectors were found positive for *P. vivax* and *P. malariae*, such as *An. strodei*, and *An. triannulatus*, suggesting that in forest edge areas, with greater anthropic activity, these vectors potentially have a role in transmission, including considering the circulation of other species of Plasmodium, such as *P. falciparum*. **Conclusion:** The studies analyzed pointed out that the mosquito infection rate is variable in the *Anopheles* in the Atlantic Forest according to the geographic location and there are many gaps in the knowledge of the transmission dynamics involving asymptomatic human carriers and/or simian reservoirs, therefore, it is very important to continue studies in the Atlantic Forest and adopt new techniques that will allow the analysis of infected vectors to be carried out. The adoption of PCR in real time would be ideal, as it presents greater sensitivity

and speed, however it is a technique with very high costs and must be evaluated to be applied in Surveillance activities.

Keywords: Malaria, *Plasmodium*, Anopheles, vector, Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma: artigos, monografias, teses e livros consultados na revisão.....	11
Figura 2. Imagens das práticas laboratoriais	15
Figura 3. PCR em tempo real para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de <i>P. vivax</i>	16
Figura 4. PCR em tempo real para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de <i>P. malariae</i>	17
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 2%	18

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição do número de casos autóctones de malária no Estado de São Paulo2
- Tabela 2.** Primers utilizados para amplificação de Plasmodium em amostras de DNA de anofelinos em PCR-TR no sistema Taqman9
- Tabela 3.** Principais artigos científicos, monografias, teses e livros consultados para a realização da revisão com enfoque na infecção natural de anofelinos na Mata Atlântica, organizados por ordem cronológica 13

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. “Primers” para amplificação de gênero <i>Plasmodium</i> , de acordo com a descrição dos autores*	10
---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais malária: doença e dados epidemiológicos no Mundo e Brasil	1
1.2. O ciclo de vida do plasmódio	2
1.3. A malária humana na Mata Atlântica	3
1.4. Os vetores na Mata Atlântica	4
2. A detecção de plasmódios em vetores anofelinos	5
3. Justificativa	6
4. Objetivo	7
4.1. Objetivo geral	7
4.2. Objetivos específicos	7
5. Materiais e Métodos	7
5.1. Delineamento da revisão	7
5.2. Prática das Técnicas Associadas	8
5.2.1. Testes de PCR em tempo real 18S para detecção de infecção natural por plasmódios em amostras de fêmeas de anofelinos	8
5.2.2. Teste de PCR convencional, para a detecção de fragmento de DNA mitocondrial (Cyt b)	9
5.2.3. Gel de Eletroforese para visualização dos produtos de PCR	10
6. Resultados	11
6.1. Seleção de artigos	11
6.2. Resultados do treinamento das práticas laboratoriais associadas à detecção de infecção de DNA de plasmódios em anofelinos: extração de DNA, reação de PCR em tempo real e reação de PCR convencional	14
7. Discussão	19
7.1. A infecção natural nos anofelinos da Mata Atlântica	19
8. Conclusões	26
9. Referencias	27

I Introdução

I.1 Aspectos gerais malária: doença e dados epidemiológicos no Mundo e Brasil.

A malária é considerada uma doença infecciosa não contagiosa e de transmissão vetorial. São cinco espécies que causam a malária nos seres humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo o vetor mosquito do gênero *Anopheles* (Amaral *et al.*, 2019).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 228 milhões de novos casos da doença foram notificados no mundo em 2018, além da ocorrência de mais de 405 mil óbitos por malária (Ministério da Saúde, 2019).

No Brasil, a região Amazônica concentra 99% dos casos de malária no país (Amaral *et al.*, 2019). A exemplo, no ano de 2010 em Rondônia ocorreram 42.761 casos de malária, o que corresponde a 13,1% do total de casos registrados no país no mesmo ano. O *P. vivax* foi o mais prevalente na região, com cerca de 89% dos casos e o *P. falciparum* com cerca de 10,1% dos casos e menos de 1% por infecção mista. (Simões *et al.*, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2007 e 2016 o número de casos de malária diminuiu, porém depois de quase 10 anos, em 2017 o número de casos de malária aumentou cerca de 53% em relação a 2016. No ano de 2018 o Brasil apresentou cerca de 194.513 casos notificados de malária (Amaral *et al.*, 2019).

Em áreas fora a região Amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados de estados pertencentes a área endêmica, contudo existe a transmissão residual da malária em estados de regiões extra-Amazônica, principalmente em áreas de Mata Atlântica no Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo) (Ministério da Saúde, 2019). Segundo o CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica), no estado de São Paulo obteve os seguintes números de casos entre os anos de 2018 a 2020 (CVE, 2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do número de casos autóctones de malária no Estado de São Paulo.

Distribuição do número de Casos Autóctones de Malária segundo Município Provável de Infecção e Ano de Sintomas - Estado de São Paulo - 2018 a 2020*.

Município Provável de Infecção	2018*		2019*		2020*	
	nº de casos	%	nº de casos	%	nº de casos	%
Bertioga	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Biritiba-Mirim	1	11,1	0	0,0	0	0,0
Cananeia	0	0,0	1	7,7	0	0,0
Caraguatatuba	1	11,1	2	15,4	0	0,0
Eldorado	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Iporanga	0	0,0	1	7,7	1	20,0
Juquitiba	1	11,1	0	0,0	0	0,0
Miracatu	0	0,0	2	15,4	0	0,0
Mongagua	0	0,0	0	0,0	1	20,0
Natividade da Serra	1	11,1	3	23,1	0	0,0
Paraibuna	0	0,0	1	7,7	0	0,0
Salesópolis	1	11,1	0	0,0	0	0,0
São Paulo	0	0,0	1	7,7	0	0,0
São Sebastião	4	44,4	2	15,4	3	60,0
Ubatuba	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	9	100,0	13	100,0	5	100,0

*dados provisórios - atualizados em 19/08/2020

Fonte: SINANNET/Divisão de Zoonoses - CVE

I.2 O ciclo de vida do plasmódio

O ciclo de vida do plasmódio apresenta uma fase assexuada no hospedeiro humano e uma fase sexuada no mosquito. A infecção começa quando a fêmea do mosquito *Anopheles* pica o hospedeiro humano e através das suas glândulas salivares introduz esporozoítos (formas infectantes), que circulam pela corrente sanguínea e em pouco tempo invadem as células hepáticas. Multiplicam-se de forma assexuada nos hepatócitos em um processo chamado esquizogonia, no qual o núcleo se divide várias vezes, dando origem a uma forma multinucleada, essa é a esquizogonia pré – eritrocítica e dura de 6 a 16 dias após a inoculação. Quando o esquizonte se rompe são liberados merozoítos, que circulam na corrente sanguínea dando origem a um novo ciclo reprodutivo no homem (Nogueira & Rosário, 2010).

Logo após a replicação inicial nas células hepáticas os parasitas se multiplicam assexuadamente no interior dos eritrócitos (hemácias), denominada como esquizogonia eritrocitária. Esses esquizontes ao se fragmentarem rompem as hemácias e os merozoítos são liberados na corrente sanguínea. Durante esse período alguns merozoítos rompem as hemácias jovens e se diferenciam para originar gametócitos, que poderão ser ingeridos por uma fêmea de anofelino ao se alimentar, dando início reprodução sexuada. (Henrique & Santos, 2016).

No ciclo sexuado do parasita (microgametócitos macho e macrogametócitos fêmea), são ingeridos pelo mosquito fêmea durante o repasto sanguíneo. Quando se encontram dentro do estômago da fêmea, o microgameta penetra nos macrogametas originando o zigoto. Esses zigotos se tornam móveis e alongados passando a serem designados como oocinetos, a partir desse momento os oocinetos poderão invadir a parede do estômago do mosquito e se diferenciaram em oocistos. Os oocistos se desenvolvem, rompem as células e liberam esporozoítos, que circulam pela hemolinfa até atingirem as glândulas salivares do mosquito, iniciando o ciclo de vida da malária novamente (Henrique & Santos, 2016).

I.3 A malária humana na Mata Atlântica

A malária na Mata Atlântica envolve a ocorrência de poucos casos registrados, que em sua maioria são assintomáticos, com baixa parasitemias. O diagnóstico da doença é feito através do exame de gota espessa e na maioria das vezes o agente etiológico identificado morfológicamente é o *P. vivax*, mas se sabe que o *P. malariae*, circula também nas áreas de Mata Atlântica e que os casos são subnotificados, pois esse parasito só é diferenciado por meio de leitura de lâmina de esfregaço, e esse método não é utilizado no programa de controle da doença. (Curado *et al.* 1997).

Estudos soro-epidemiológicos apontaram a presença de anticorpos contra forma infectante e sanguínea em indivíduos em moram na região da Mata Atlântica paulista (Vale do Ribeira, Litoral Norte e Sul) e nas áreas montanhosas do Espírito Santo sugerindo contato com anofelinos infectados de modo a evidenciar um ciclo silencioso de transmissão da doença. (Curado *et al.*;2006; Alencar *et al.*;2018).

Estudos realizados na região da Serra do Mar, mostraram que fêmeas de anofelinos estavam infectadas e circulavam, mesmo na ausência de casos registrados da doença, sugerindo a ocorrência de reservatórios humanos assintomáticos e/ou reservatórios símios que podem sustentar a transmissão da malária autóctone (Duarte *et al.*, 2013).

No Novo Mundo ocorrem dois plasmódios símios que apresentam características morfológicas, fisiológicas e genéticas que os tornam similares ou indistinguíveis. O *Plasmodium simium* que infecta macacos em áreas de Mata Atlântica restritas ao sudeste e sul do Brasil e possui similaridades morfológicas e moleculares com *P. vivax* (Deane, 1992; Duarte *et al.*, 2008). Este parasita possivelmente surgiu em primatas não humanos da Mata Atlântica após a introdução de *P. vivax*, e mais recentemente foi descrito como causador de surtos zoonóticos em comunidades humanas (Brasil *et al.*, 2017). O *Plasmodium brasilianum*, que infecta macacos

do Novo Mundo em toda América Central e América do Sul também foram implicadas como parasitas zoonóticos. No entanto, *P. brasilianum* e o *P. malariae* são morfológicamente, biologicamente e geneticamente quase idênticos, sugerindo que eles são membros da mesma espécie de *Plasmodium* (Lalremruata *et al.*, 2015)

Por esse motivo existe a possibilidade que em áreas onde ocorre a doença simultaneamente em humanos e símios, a malária se comporte como uma zoonose (Deane, 1992; Yamasaki *et al.*, 2011).

I.4 Os vetores na Mata Atlântica

O mosquito *Anopheles darlingi* é considerado o principal vetor da malária no Brasil, apresentando comportamento antropofílico e endofágico, e suas larvas se desenvolvem em coleções de águas, como remansos de rios e cursos d'água de porte variável (Forattini, 2002; Barbosa *et al.*, 2013).

Contudo, ocorre um ciclo de transmissão peculiar nas áreas de Mata Atlântica no Sul e Sudeste do Brasil, por conta da presença de bromélias, nas quais a água acumulada nos verticílios serve de habitat para as fases larvárias do mosquito *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, em especial *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator*, que são os principais vetores da malária humana e símia na Mata Atlântica (Deane *et al.*, 1970; Gadelha, 1994; Marrelli *et al.*, 2007).

O *Anopheles cruzii* é um mosquito acrodendofílico, mas dependendo da localização geográfica na Mata Atlântica, pode se alimentar tanto no nível da copa das árvores, quanto no nível do solo (dispersão vertical), com isso esse vetor tem papel importante na transmissão malária autóctone nas áreas de vale e nas montanhas do Sudeste, pois pode picar o ser humano e primatas não humanos com a mesma frequência (Deane *et al.*, 1984; Deane, 1992; Pina-Costa *et al.*, 2014).

A fêmeas do subgênero *Kerteszia* se alimentam de sangue continuamente durante o dia, principalmente dentro de florestas úmidas. De acordo com Forattini *et al.* (1986), dois picos de atividade podem ser identificados, um pico alto associado ao pôr do sol e um pico secundário associado ao nascer do sol, enquanto que Tubaki *et al.* (1993) descreveram um pico noturno de atividade para *An. cruzii* em Peruíbe, estado de São Paulo.

A malária-bromélia foi um sério problema de saúde pública em Brasil durante o século XIX e primeira metade de século XX (Gadelha, 1994). O contato próximo entre humanos e a Mata Atlântica levaram a ampla exposição às picadas de mosquito e transmissão da malária-bromélia durante esses períodos. Contudo, o desmatamento causado pelo homem dizimou essas plantas e, assim, reduziu drasticamente o número de mosquitos deste subgênero. Isso foi observado por Forattini *et al.* (1986) no Vale do Ribeira, SP, quando compararam as faunas da floresta primitiva com área de transição e ambientes com alterações antrópicas na mesma região. Medidas de controle implementadas na década de 1940, que incluiu desmatamento e eliminação de bromélias, junto com o uso de inseticidas químicos e drogas antimaláricas, resultou em uma diminuição significativa no número de casos de malária na região da Mata Atlântica (Marrelli *et al.*, 2007).

I.5 A detecção de plasmódios em vetores anofelinos.

Tradicionalmente a identificação de infecção em fêmeas de anofelinos era feita por meio da dissecação da glândula salivar para a observação de esporozoítos em lâminas (Rachou, 1958). Essa técnica apresenta limitações, pois permite apenas observar a presença da forma parasitária, porém não é possível identificar a espécie de plasmódio

Um dos principais parâmetros para a análise no controle e monitoramento da malária é a detecção de espécies de *Plasmodium* nos vetores capazes de infectar os humanos (Barbosa & Souto, 2013), porém pouco se sabe sobre a infecção natural de anofelinos por plasmódios em áreas de malária residual como a Mata Atlântica.

Entre as décadas de 1980 e 1990 surgiram novas técnicas que permitiram aperfeiçoar a sensibilidade e especificidade da detecção de plasmódio e melhorar o diagnóstico. A técnica de ELISA para a identificação da proteína circumsporozoíta (CSP) solucionou em grande parte do problema, porém apresentava custo elevado e protocolo com longas etapas, tornando o teste demorado e oneroso (Burkot *et al.*, 1984; Wirtz *et al.*, 1987).

A partir da década de 1990, a técnica de PCR passou a ser utilizada de forma mais eficiente para a detecção de plasmódios. A maioria dos protocolos usaram como alvo principal o gene ribossomal (18S rRNA), que possui várias cópias repetitivas e conservadas dos genes de *Plasmodium*. (Snounou *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1997).

Atualmente a técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada por apresentar maior sensibilidade e rapidez, permitindo também quantificação da amostra de estudo (Marie *et al.*, 2013; Bickersmith *et al.*, 2015), contudo a limitação é que a técnica é cara, considerando a quantidade de amostras de anofelinos que deve ser processada. A utilização dessa técnica em pesquisas é viável, porém ainda é onerosa para a utilização em trabalhos de Vigilância.

2- Justificativa

A técnica de dissecação de glândulas salivares em fêmea de anofelinos não permite a identificação do plasmódio, e exige elevado conhecimento técnico e entomológico, o que torna esse método inviável para pesquisa, e trabalhos de vigilância e controle, salvo em situações em que a técnica poderá ser utilizada como recurso complementar dependendo dos objetivos dos estudos e/ou atividades de vigilância.

Como advento da PCR foi possível realizar a identificação dos plasmódios anofelinos capturados em estudos de campo e com isso foi possível observar a circulação e estimar a taxa de infecção natural ou experimental em mosquitos do gênero *Anopheles* para o monitoramento e fator de risco de transmissão da malária na Região Amazônica (Nascimento, 2016).

Na Mata Atlântica ainda é difícil caracterizar a dinâmica da transmissão da malária uma vez que possivelmente os ciclo humano-humano e o ciclo humano-símios ocorrem simultaneamente.

Integrar os dados de pesquisas sobre a infecção natural de anofelinos de modo a facilitar o acesso e compreensão da literatura relacionada é de grande importância para que se possa repensar a vigilância e o controle da malária em áreas residuais no Estado de São Paulo.

Portanto, foi realizada uma compilação de dados bibliográficos sobre a infecção natural nos vetores a aos aspectos epidemiológicos associados à malária na Mata Atlântica, e foi proposta uma reflexão sobre o uso da técnica de detecção de infecção nos vetores como instrumento auxiliar na realização de atividades de vigilância e controle.

3- OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Realizar revisão bibliográfica e atualização sobre a detecção por plasmódios em anofelinos na Mata Atlântica, bem como conhecer e aplicar as técnicas de Biologia Molecular mais comumente utilizadas em pesquisas, propondo uma reflexão sobre o uso da mesma como instrumento auxiliar na vigilância e no controle da malária.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar pesquisas bibliográficas nas bases de dados sobre artigos científicos e livros que descrevam as técnicas e os estudos sobre anofelinos na Mata Atlântica.
- Conhecer e aplicar a técnica de extração de DNA de mosquito (anofelinos), por meio de kit específico;
- Conhecer e realizar técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com protocolos utilizados no laboratório, para detecção de *Plasmodium* em amostras de DNA de anofelinos coletados em áreas de Mata Atlântica (PCR convencional e PCR em Tempo Real).

4- Materiais e Métodos

4.1-Delineamento da revisão

Foram realizadas buscas nas seguintes bases de dados: SciELO, Lilacs, PubMed, MedLine e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); foram utilizadas as palavras-chave: Malaria, *Plasmodium Anopheles*, vector e Polymerase chain reaction.

4.2 Prática das Técnicas Associadas

4.2.1-Testes de PCR em tempo real 18S para detecção de infecção natural por plasmódios em amostras de fêmeas de anofelinos

As amostras de anofelinos que foram testadas foram procedentes de projeto de pesquisa da orientadora Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte (FAPES 204/10.919-4)

A extração do DNA genômico das amostras de fêmeas de anofelinos foi realizada por meio do DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

As reações foram realizadas no sistema TaqMan[®], de acordo com protocolo descrito por Bickersmith *et al.* (2015) para amplificação de fragmentos 18S *ssrRNA* gênero-plasmódio, *P. vivax* e *P. falciparum*, com pequenas modificações (~100pb). As amostras de DNA foram testadas separadamente com cada par de primers e sondas. Os primers e sondas para *P. malariae* foram descritos por Rougemont *et al.* (2004), mas serão utilizadas as mesmas condições de reação descritas abaixo (Tabela 2).

A reação de amplificação consistiu de 5,0 µl de DNA, e 12,5µl de TaqMan Universal Master Mix II, com UNG (Applied Biosystems) (2X), com 0,75 µl de Plasm2-R e para cada respectiva sonda 0,25 µl (10uM) e “primer” 0,75 µl (10uM), e água de injeção para completar o volume de 25µl (Tabela 1). As reações foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP. Os parâmetros utilizados foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 15 min, e 60°C por 1 min.

Tabela 2 Primers” utilizados para amplificação de *Plasmodium* em amostras de DNA obtid de anofelinos em PCR-TR r o sistema TaqMan[®].

“Primers”	Sequência 5’-3’
Plusmo1-F Plusmo2-R	GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA
Plusprobe	FAM -TCGTAATCITAACCATAAAAC- MGBNFQ
Falc-F Falciprobe	GACTAGGTGTTGGATGAAAAGTGTTAAA
Vivax-F	VIC - TGAAGGAAGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAAGA -QSY
Vivaxprobe	GACTAGGCTTTGGATGAAAAGATTTTAA NED
Mal-F	- ATAAACTCCGAAGAGAAAA - MGBNFQ
Malaprobe	CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A FAM - CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT -MGBNFQ

1- Bickersmith *et al.* (2015). 2- Rougemont *et al.* (2004).

Os controles positivos utilizados foram DNA extraído das amostras de sangue de macaco da Mata Atlântica naturalmente infectado com *P. simium*/*P. vivax* (amostras de pesquisa da Dra Ana Maria Duarte) e DNA extraído de lâminas de imunofluorescência com sangue de macaco infectado com *P. malariae*. O controle negativo foi o “mix” com todos os reagentes menos DNA.

4.2.2- Teste de PCR convencional, para a detecção de fragmento de DNA mitocondrial (Cyt b).

Foi realizada também a Nested-PCR convencional para amplificação de fragmento de DNA mitocondrial (cyt b) e essa técnica consistiu em duas reações:

A reação para amplificação de fragmento de citocromo b (*cyt b*) utilizou os primers **PfF3700 /PfR4615**, que produziu um fragmento de 915 pb na primeira reação. A segunda reação de PCR utilizou o primeiro produto em conjunto com **Pff 3700 / PfR4102**, e produziu um fragmento de **402 pb**. A primeira reação de PCR foi feita com 2 µl de DNA, enquanto a segunda foi executada com 1 µl de produto da primeira reação (**Quadro 1**).

As reações de PCR foram realizadas com uma mistura de PCR de 25 µl: 2 µl de molde, 2,5 µl de 10X tampão de PCR Taq, 10 pmol de cada primer, 100 µM de dNTP, 0,5 U de Taq Polimerase (Platinum Taq – Invitrogen).

O ciclo de amplificação da primeira reação consistiu em: desnaturação - 94 ° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, sendo desnaturação - 94 ° C, por 15 segundos, alinhamento - 50 ° C por 15 segundos, extensão - 72 ° C por 45 segundos, com extensão final de 72 ° C por 5 minutos. Na segunda reação serão feitos 20 ciclos, e a temperatura de alinhamento foi aumentada para 53° C.

Em todas as reações, foram acrescentados controles negativos e positivos. As reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP.

Quadro 1. “Primers” para amplificação de gênero *Plasmodium*, de acordo com a descrição dos autores*.

Gene	“primers”	Sequência	Pb	Reação
cytb1	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	915	Nest 1a ¹
	PfR4615	GTTTGCTTGGGAGCTGTAATC		
cytb1	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	402	Nest 2a ¹
	PfR4102	GCTGTATCATACCCTAAAG		

*1 – Siregaret *et al.*, 2015 e 2 – De Nys *et al.*, 2013.

4.2.3 -Gel de Eletroforese para visualização dos produtos de PCR

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma), 2,0% (p/v) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (p/v) em tampão TBE 1x (Tris borato 0,09M; EDTA 0,0002M) utilizando Electrophoresis Power Supply -EPS 200 (Pharmacia Biotech) como fonte a uma voltagem constante de 90V.

As bandas obtidas nessa reação poderão ser purificadas e sequenciadas, contudo, não houve tempo hábil para acompanhar essa etapa.

5. Resultados

5.1 Seleção dos artigos

Foram selecionados 45 artigos científicos sobre o tema. Os artigos foram acessados no segundo semestre de 2020, em inglês e português, nos sites PUBMED, SCIELO. As palavras-chave e os termos usados foram: Malaria, *Plasmodium*, Anopheles, vector e Polymerase chain reaction (em inglês e português). Foram selecionados todos os campos, tópicos e anos dos sites descritos. Também foram acrescentadas na revisão algumas teses, dissertações e monografias. Abaixo estão demonstrados o fluxograma da seleção de artigos (Figura 1) e uma tabela com as 18 principais referências em destaque (Tabela 3).

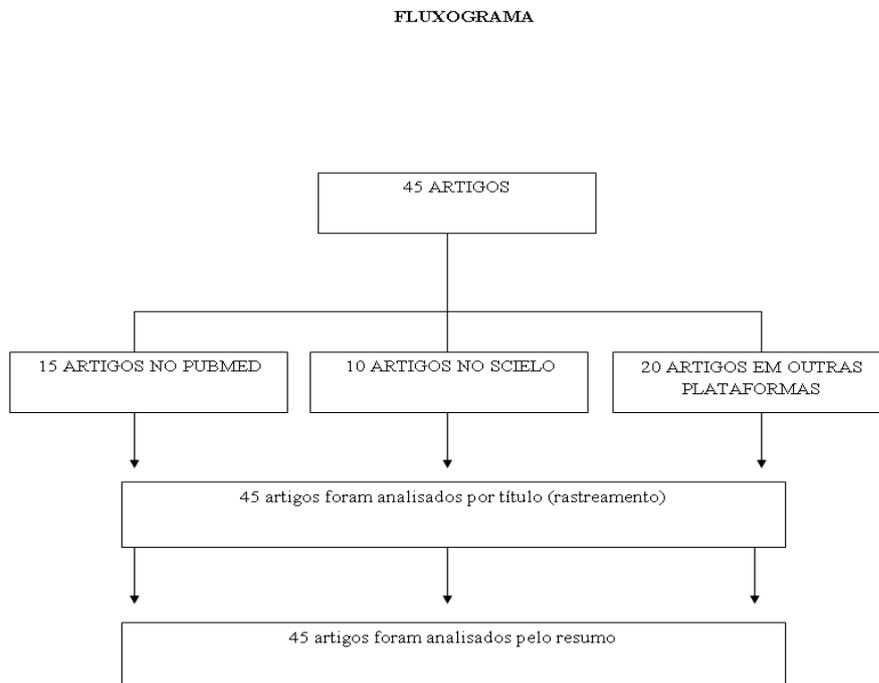


Figura 1. Fluxograma: artigos, monografias, teses e livros consultados na revisão.

Tabela 3. Principais artigos científicos, monografias, teses e livros consultados para a realização da revisão com enfoque na infecção natural de anofelinos na Mata Atlântica, organizados por ordem cronológica.

Autores e ano	TÍTULO
1-Rachou, 1958	Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária
2- Deane <i>et al.</i> , 1970	<i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> , a natural vector of the monkey malaria parasites, <i>Plasmodium simium</i> and <i>Plasmodium brasilianum</i> .
3- Deane, 1992	Simian Malaria in Brazil
4- Gadelha, 1994	From "forest malaria" to "bromeliad malaria": a case-study of scientific controversy and malaria control.
5- Forattini, 2002	Culicidologia Médica, Identificação, Biologia, Epidemiologia. (vol.2)
6- Curado <i>et al.</i> , 2006	Malaria epidemiology in low-endemicity áreas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil.
7- Cerutti <i>et al.</i> , 2007	Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an areaof very low incidence in Brazil
8- Marrelli <i>et al.</i> , 2007	<i>Kerteszia</i> subgenus of <i>Anopheles</i> associated with the Brazilian Atlantic rainforest:current knowledge and future challenges

9- Duarte et al., 2008	Natural <i>Plasmodium</i> infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections?
10- .Rezende et al., 2009	Entomological Characterization and Natural Infection of <i>Anophelines</i> in an Area of the Atlantic Forest with Autochthonous Malaria Cases in Mountainous Region of Espírito Santo State, Brazil
11- Duarte <i>et al.</i> , 2013	Natural infection in anophelines species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil
12- Neves et al., 2013	Malaria outside the Amazon region: Natural <i>Plasmodium</i> infection in anophelines collected near in indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil.
13- Kirchgatter <i>et al.</i> , 2014	<i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> (diptera: culicidae) in peridomiliary area during asymptomatic malaria transmission in the atlantic forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts
14- Pina-Costa <i>et al.</i> , 2014	Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region
15. Laporta <i>et al.</i> , 2015	<i>Plasmodium falciparum</i> in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm?
16- Buery <i>et al.</i> , 2018	Ecological characterisation 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?

17- Medeiros-Sousa et al., 2019	Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> , the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil
18- Buery et al.,2021	Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation

5.2 Resultados do treinamento das práticas laboratoriais associadas à detecção de infecção de DNA de plasmódios em anofelinos: extração de DNA, reação de PCR em tempo real e reação de PCR convencional.

Foi realizada a técnica de extração de DNA em amostras de anofelinos selecionadas pela Dra. Ana Maria Duarte. Os anofelinos processados fazem parte de conjunto de ainda não testadas da região de estudo de Parelheiros (oriundas de pesquisa da Dra. Ana Maria Duarte, FAPESP 2014.10.919-4). Foram analisadas 60 amostras de fêmeas de anofelinos que estavam acondicionadas em álcool isopropílico e organizadas em “pool” com até 10 exemplares, e separadas por espécie.

As amostras de DNA extraídas foram testadas na PCR em tempo real (TaqMan – 18S rRNA) e da PCR convencional (cyt b) e foram todas negativas para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* (Figura 2).

Nas figuras 3 e 4 é possível observar o gráfico resultante de uma **reação PCR TaqMan** realizada com controles positivos, nas quais é possível ver as curvas para a amostra controle positiva de *P. vivax* e *P. malariae*.

Na figura 5 está demonstrado uma imagem de um gel de agarose correspondente à corrida eletroforética de **reação PCR convencional** para amplificação de citocromo b de plasmódio (cyt b), na qual é possível observar as amostras negativas (sem bandas) e o fragmento gênero específico de *Plasmodium*, com 402 pares de base, correspondente à uma amostra positiva e o controle positivo.



Figura 2 – Imagens das práticas laboratoriais: 1) e 2) extração de DNA (Kit DNeasy Blood and Tissue Qiagen), 3) Preparação de amostras para PCR, 4) Imagem do equipamento de PCR-RT (StepOne, Applied Biosystem). Autor: Thaysa Carolina Cantanhede Figueiredo.

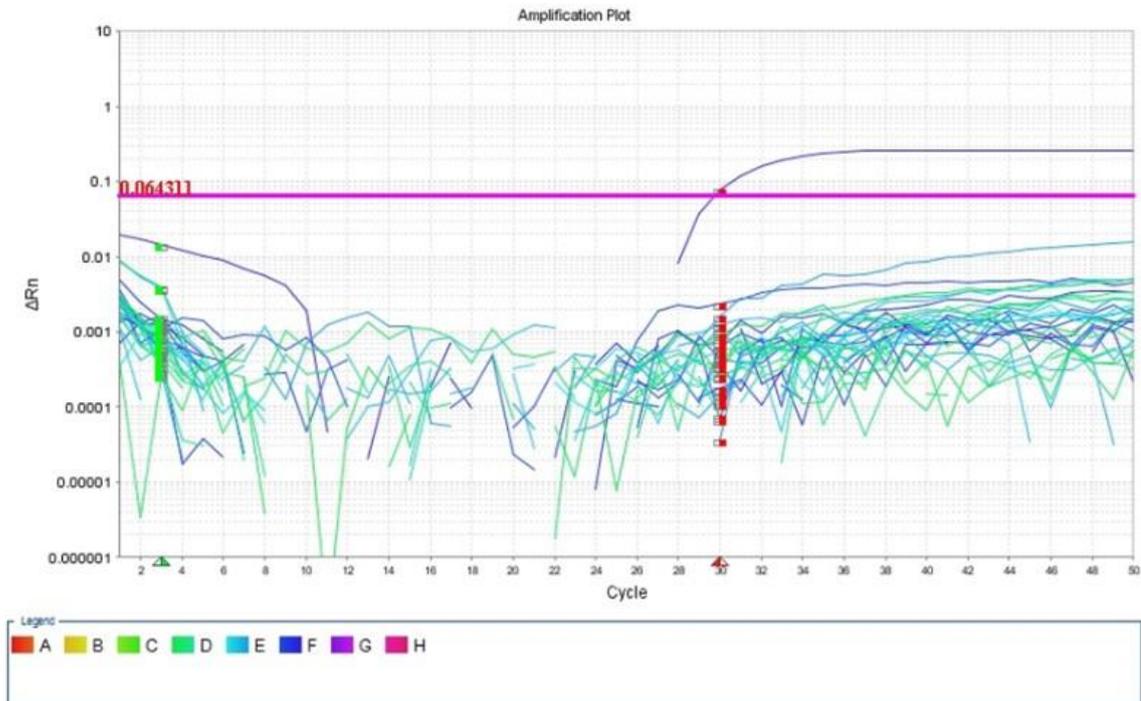


Figura 3. PCR em tempo real para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de *P. vivax*, teste de 60 amostras DNA de *Anopheles (Ker.) cruzii* (projeto Dra. Ana Maria Duarte/Parelheiros). Controle positivo: primeira curva ascendente, acima do limiar de reatividade (linha horizontal)., (projeto Dra. Ana Maria Duarte). O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade Gráfico gerado pelo programa do StepOne Plus (Applied Biosystem)

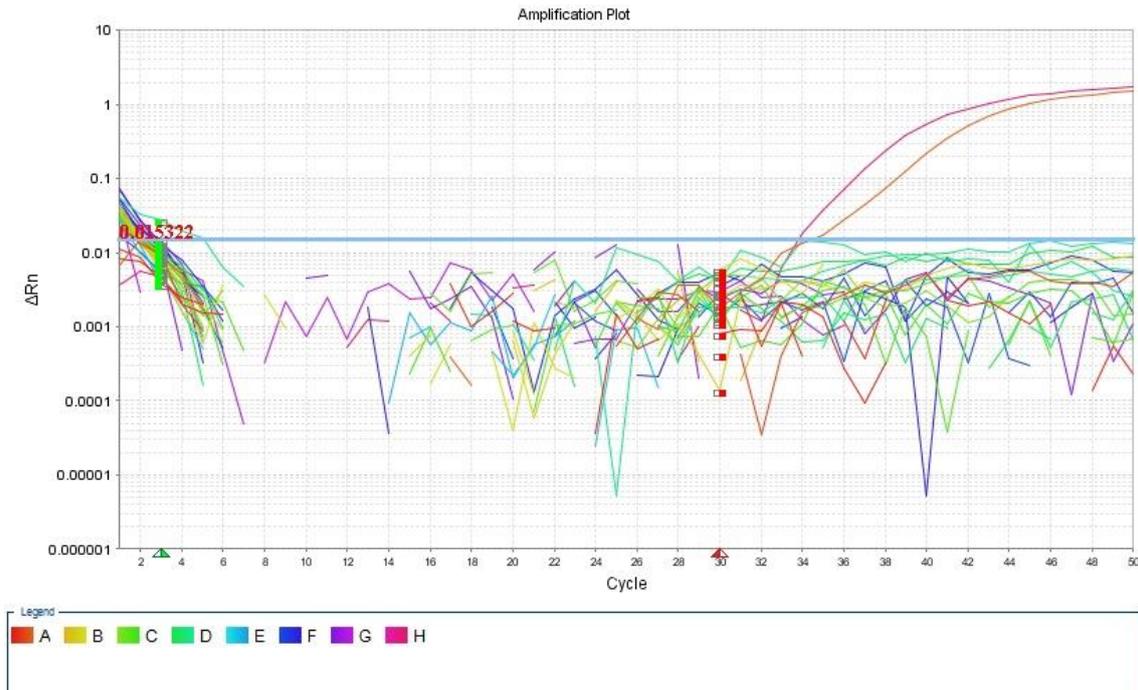


Figura 4. PCR em tempo real para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de *P. malariae*, teste de 60 amostras DNA de *Anopheles (Ker.) cruzii* (projeto Dra. Ana Maria Duarte/Parelheiros). Controles positivos: duas curvas ascendentes, acima do limiar de reatividade (linha horizontal)., (projeto Dra. Ana Maria Duarte). O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade Gráfico gerado pelo programa do StepOne Plus (Applied Biosystem)

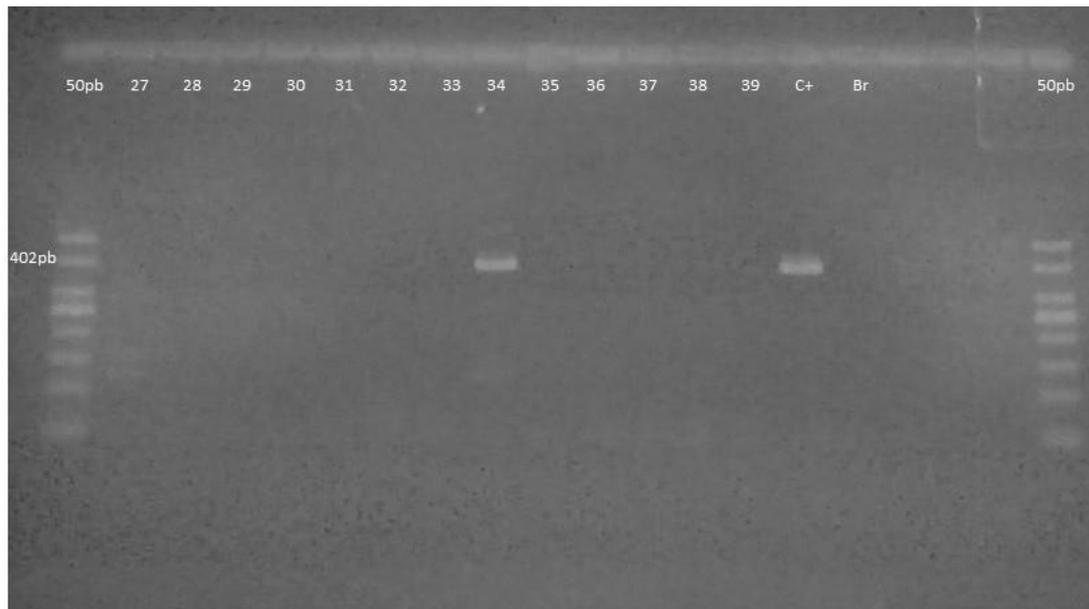


Figura 5- Eletroforese em gel de agarose a 2%. Técnica de PCR para amplificação de fragmentos de *cyt b* de *Plasmodium* (402 pares de bases) em amostras de DNA de anofelinos (*Anopheles cruzii* – projeto Dra. Ana Maria/Parelheiros). Amostra 34 – positiva. C+: Controle sabidamente positivo *An. cruzii* (Parelheiros) e Br: controle negativo (mix com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 50 pares de bases (pb).

O produto amplificado na reação acima foi purificado e será submetido à reação de sequenciamento para identificação molecular, contudo não houve tempo hábil para acompanhar essa etapa.

Como complementação da parte prática, acompanhei a pesquisa da Dra. Ana Maria Duarte em colaboração com o Prof. Dr. Crispim Cerutti Jr, da Universidade do Espírito. Esse estudo epidemiológico envolve também a detecção de infecção natural em anofelinos em área de ocorrência de casos humanos no Espírito Santo. Eu acompanhei o aluno de mestrado, Lucas Mendes Ferreira, durante as extrações de DNA e nas reações PCR TaqMan e PCR convencional. Já está sendo escrito um artigo científico com esses dados e eu participarei como co-autora.

Finalizando as práticas laboratoriais, tive a oportunidade de participar de uma coleta de mosquitos em campo, junto com uma equipe da SUCEN, porém o foco foi em vetores de Febre Amarela, contudo foi possível ver algumas técnicas utilizadas também para captura de anofelinos.

6 – DISCUSSÃO

Foi possível por meio das práticas laboratoriais, desde a extração de DNA até a interpretação dos resultados das técnicas de PCR (Convencional e PCR em Tempo Real), observar as características e procedimentos que precisam ser adotados e mantidos por um laboratório de Saúde Pública para que o mesmo possa realizar em sua rotina as técnicas básicas de Biologia Molecular no mesmo nível de um laboratório de pesquisa. É necessário investimento em infraestrutura, equipamentos, e reagentes e isso depende das condições político econômicas e de gestão da Instituição. Devem ser elaborados programas contínuos de treinamento e capacitação para os técnicos, tanto para a realização de atividade de campo (coleta de anofelinos, treinamento das técnicas: CDC, Shannon, aspiração), identificação de mosquitos (*Culicídeos*) e nas técnicas laboratoriais.

Vale destacar a importância de se avaliar a infecção natural como um parâmetro indispensável dentro do controle e vigilância da malária e paralelamente acompanhar a dinâmicas ecológica das populações de vetores nas áreas de ocorrência de casos, pois esses padrões podem sofrer modificações como por exemplo alterações antrópicas e mudanças climáticas, desmatamentos e aumentos das áreas de borda de floresta (Medeiros-Sousa *et al.*, 2019; Buery *et al.*, 2021).

Atualmente a técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada por apresentar maior sensibilidade e rapidez, permitindo também quantificação da amostra de estudo (Bickersmith *et al.*, 2015), contudo a limitação é o custo, pois a técnica ainda é cara, considerando a quantidade de amostras de anofelinos que deve ser processada. Mas esforços poderão ser feitos para tornar a técnica viável em atividades de vigilância e controle da malária.

6.1- A infecção natural nos anofelinos da Mata Atlântica

Embora os aspectos ecológicos da *An. cruzii* sejam conhecidos, sabemos pouca informação sobre a infecção natural da malária nesse vetor. Na década de 1940, houve relatos, com base em observações microscópicas, de infecção natural em espécimes do subgênero *Kerteszia* coletado no sudeste do Brasil (Rachou, 1958).

A taxa de infecção de *Plasmodium* pode variar entre espécies, pois algumas têm uma grande importância na transmissão da Malária em áreas endêmicas, mas existem outras espécies que tem seu papel secundário com relevância local (Velasquez, 2014).

O grau de importância de uma espécie de mosquito na transmissão da doença depende de alguns fatores, como: capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial estaria relacionada com a velocidade com a qual determinado parasita pode se espalhar na população de hospedeiros que são suscetíveis, em outras palavras, procura estimar a maneira pela qual a infecção pode se multiplicar por ação do vetor biológico, representado por determinada espécie ou população de mosquito. E a competência vetorial está relacionada com a capacidade intrínseca do mosquito que permite a replicação e transmissão do parasito. Atualmente se conhecemos 360 espécies de *Anopheles*, mas somente 45 espécies são envolvidas na transmissão da malária, era utilizado o termo Primárias e Secundárias de acordo com a capacidade vetorial, mas atualmente é utilizado dos termos de principais e auxiliares. (Forattini, 2002; Velasquez, 2014).

Em relação os anofelinos, o vetor é considerado competente quando o plasmódio consegue se desenvolver desde a fase de gametócitos (advindos do sangue ingerido), até a fase de esporozoíto na glândula salivar. O desenvolvimento de oocistos no intestino médio indica que o *Plasmodium* está estabelecido e a espécie de mosquito é suscetível. Esse parâmetro é utilizado para calcular a taxa de infecção entre mosquitos (proporção de indivíduos em uma população de mosquitos que expressa a incidência de *Plasmodium*) e também é usada para definir a competência vetorial e transmissão em regiões diferentes e populações diferentes (Velasquez, 2014).

Desde a década de 1980, algumas pesquisas foram conduzidas no Brasil visando a detecção de plasmódios em anofelinos, uma vez que os estudos sobre a infectividade de *Anopheles* ajudam a entender a dinâmica de transmissão da doença em determinadas áreas uma vez que o comportamento da espécie vetora está relacionado com a questão epidemiológica do local (Araújo, 2015).

Na região Amazônica, Arruda *et al.* (1986) realizaram o primeiro estudo com a técnica de ELISA com anticorpos monoclonais correspondentes a fração repetitiva da proteína circumsporozíta (CSP) para a incriminação de vetores, no qual encontraram o *An. darlingi* infectado pelo *P. falciparum* e *An. albitarsis s.l.* pelo *P. vivax*.

Porém outras espécies de anofelinos em áreas de florestas amazônica foram encontrados infectados naturalmente pelo *Plasmodium*.

Em um estudo realizado por Tadei & Tatcher (2000) em vários municípios do Amazonas, foram observadas infecções por *P. vivax* nas espécies *An. darlingi*, *An. triannulatus*, *An. mattogrossensis*, *An. nuneztovari*, *An. braziliensis*, *An. mediopunctatus* e *An. albitarsis*. As espécies *An. triannulatus*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari*, *An. mattogrossensis* e *An. darlingi* foram também encontradas infectadas pelo *P. falciparum*, sendo que *An. darlingi* foi considerado vetor para ambas espécies de *Plasmodium*. (Araújo, 2015).

Em outro estudo realizado no município de Marabá, no estado do Pará, o mosquito *An. darlingi* também foi considerado o principal vetor, sendo encontrado infectado por *P. vivax* VK247, *P. falciparum* e *P. malariae*, com taxa de infecção de 22,4%. O mosquito *An. albitarsis s.l.*, um dos principais vetores no leste do Pará, foi encontrado infectado por duas variantes da proteína circumsporozoíta (CSP) de *P. vivax*, VK210 e VK247, teve uma taxa de infecção de 5,2%. O *An. rondoni* infectado por *P. falciparum* e VK2010, foi considerado o terceiro mosquito mais capturado em áreas endêmicas de malária e com taxa de infecção de 3,6%. (Rocha *et al.*, 2008; Araújo, 2015).

Já considerando as áreas de Mata Atlântica, nos municípios de São Vicente e Juquitiba, no estado de São Paulo, foi realizado um estudo por Branquinho *et al.* (1997), no qual o objetivo foi investigar a infecção em anofelinos por meio da técnica de ELISA com anticorpos monoclonais específicos contra as regiões repetitivas da proteína CSP em *P. vivax*, *P. vivax* VK247 e *P. brasilianum/P. malariae*. Foram capturados 1.117 *An. cruzii* em São Vicente, sendo que 0,179% foram positivos para *P. vivax*; e em Juquitiba, 1.161 *An. cruzii* foram coletados, sendo que 0,086% foram positivos para *P. vivax* VK247 (Branquinho *et al.*, 1997).

Mais recentemente, no estudo de Duarte *et al.* (2013) foram coletados 6.703 fêmeas de anofelinos, com predomínio de *An. (Ker.) cruzii* (99%), e já utilizando testes de PCR convencional para amplificação de fragmento de gene ribossomal (18S rRNA), foram identificadas amostras positivas para *P. vivax* e *P. malariae*. Contudo dentre os poucos anofelinos de outras espécies foram observadas infecções naturais em *An. strodei* e *An. triannulatus* testaram positivo para *P. malariae* e o *An. lutzii* e *An. triannulatus* também foram detectados para *P. vivax*. *An. cruzii* desempenha o papel principal na transmissão, porém anofelinos de outras espécies potencialmente podem atuar na transmissão nas áreas antropizadas. Foi observado também um ciclo de transmissão silencioso, uma vez que mesmo em período que não houve caso notificado de malária, foram encontrados anofelinos infectados,

sugerindo que humanos assintomáticos e/ou reservatórios símios mantem esse ciclo ativo (Duarte *et al.*, 2013).

No trabalho de Neves *et al.* (2013), realizado na região de Itanhaém, São Paulo, próximo a uma aldeia indígena no Vale do Rio Brando, no qual o objetivo também foi detectar a infecção natural em anofelinos por PCR. A espécie mais predominante na região foi o *An. cruzii*, com 78,9%. Foram analisados cerca de 506 mosquitos para detectar a presença de plasmódio, *An. fluminensis*, *An. pseudomaculipes/maculipes* e *A. cruzii* foram positivos para *Plasmodium malariae* e para *P. vivax*, apenas *An. pseudomaculipes / maculipes*, resultando em uma taxa mínima de infecção de 0,24%. Concluindo que o *A. cruzii* pode estar na transmissão da malária entre macacos e humanos, uma vez que foi infectada por *P. malariae*. Os autores destacam a importância de compreender o papel dos anofelinos na transmissão da malária na Mata Atlântica (Neves *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado na região de Juquitiba, São Paulo, foram coletados um total de 13.441 mosquitos fêmeas *An. cruzii*, com a taxa mínima de infecção 0,03% e 0,01% para *P. vivax* e *P. malariae* e apenas sangue humano foi identificado nos mosquitos analisados, essa evidência sugere que os portadores humanos assintomáticos são a principal fonte de infecção por anofelinos na área peridomiciliar, sendo que as fêmeas de *An. cruzii* podem voar para o ambiente antrópico para se alimentar de sangue, principalmente no ambiente doméstico e peridoméstico e depois retornar ao ambiente natural, e além disso, a o comportamento de dispersão vertical, com distribuição do nível do solo até o topo das árvores, pode contribuir com a interação com reservatórios símios, corroborando com os estudos de Deane (1992). Mas também é importante observar que os casos humanos detectados na Mata Atlântica são geralmente assintomáticos, mostrando apenas níveis subparentes de parasitas, sendo possivelmente os reservatórios na área de estudo (Kirchgatter *et al.*, 2014).

Informações peculiares se somaram nesse contexto com os resultados obtidos no por Laporta *et al.* (2015) no estudo de anofelinos coletados nos municípios de Cananéia, Tapiraí e Eldorado, na qual a infecção natural também foi realizada por PCR para detecção de fragmento DNA ribossômico (18S rRNA). Surpreendentemente *An. cruzii* foi a espécie que apresentou alta infectividade para *P. falciparum*, 88% (22/25), para *P. vivax* a taxa foi de 18% de infecção, entretanto três espécimes foram também infectadas por *P. falciparum*, sendo um *An. strodei*, um *An. triannulatus* e um *An. galvaoi*. Os autores levantaram a hipótese de circulação de uma

nova espécie assemelhada ao *P. falciparum* ou de uma cepa adaptada aos vetores de Mata Atlântica, porém que não causa doença grave, possivelmente mantida em reservatórios símios (Laporta *et al* 2015).

Situação semelhante ocorre na Mata Atlântica do Espírito Santo, em locais onde também ocorrem casos autóctones de malária em um quadro epidemiológico similar, envolvendo baixas parasitemias e indivíduos oligossintomáticos (Cerutti *et al.*, 2007), pesquisa entomológica realizada por Rezende *et al.* (2009) com capturas nas áreas de florestas e em áreas abertas e próximas de residências apontou que a fauna anofélica é bem diversa envolvendo *An. cruzii*, *An. strodei*, *An. evansae*, *An. lutzi*, *An. albitarsis sl.* Foram observadas as seguintes espécies infectadas com plasmódios: *strodei*, *An. parvus*, *An. evansae* e *An. galvaoi*. Essas espécies podem ser encontradas em alguns locais com maior frequência e sua presença está relacionado com as modificações ambientais. Entretanto o fato de essas espécies terem sido encontradas em áreas de baixa endemicidade ou de casos de malária não serem tão frequentes no Espírito Santo quanto na Amazônia constituem evidências contra seu papel na transmissão da doença. Nesse estudo a evidência de *P. vivax* no tórax do *An. parvus* e *An. galvaoi* reforça de fato que eles estão atuando como vetores nessas locais. É possível que esses espécimes de *Nyssorhynchus* tenham sido infectados pelo *Plasmodium* ao picar seres humanos, mas a ausência de surtos de malária nos leva a acreditar que a transmissão de pessoa para pessoa é muito baixa. (Rezende *et al.*, 2009). Um estudo complementar do mesmo grupo foi realizado entre os anos de 2014 e 2015, sendo que os achados de infecção natural em anofelinos apontaram que houve predominância do subgênero *Kerteszia* nas coletadas, entretanto outros subgêneros como *Nyssorhynchus* também foram coletados. Foram foram identificados 13 amostras positivas para *P. vivax/P. simium* nos testes moleculares, destes 10 pertenciam a espécie *An. cruzii*, e as outras amostras positivas três detectadas no abdomen do subgênero *Nyssorhynchus*, enfraquecendo a hipótese que os mosquitos desse subgênero poderiam desempenhar um papel de transmissão da malária nessa região do Espírito Santo, contudo estudos adicionais serão necessários para elucidar essa questão (Buery *et al.*, 2018).

O conjunto de achados de infecção natural por plasmódios em anofelinos já publicados nos Estado de São Paulo e Espírito Santo leva a concluir que existe situações assemelhadas que ainda precisam ser melhor estudadas, porém demonstrando que além de *An. cruzii*, possivelmente outros potenciais vetores possam vir a desempenhar papel na transmissão em áreas de borda de floresta.

Com o objetivo de testar a hipótese de que fatores associados as mudanças antropogênicas do ambiente podem ser responsáveis pela variação na abundancia e acondrofilia nos mosquitos *A. cruzii*, Medeiros *et al.* (2019), realizaram um estudo na APA-Capivari-Monos, Parelheiros, zona sul do município de São Paulo (na mesma região de estudo de Duarte *et al.*, 2013) Foram coletados 6823 espécimes fêmeas de *An. cruzii*, sendo observada diferenças na abundância dessa espécie conforme o tipo de ambiente. Na área mais alterada e com maior presença humana (Bairro Embura) foram coletados poucos exemplares (5%), já na área mais florestada a abundância chegou a 74% (Bairro de Evangelista de Souza e Engenheiro Marsilac). Os parâmetros considerados foram cobertura florestal, locais que sofrem alterações antrópicas, fragmentos florestais e comprimento total da borda. Concluiu-se que as mudanças antropogênicas no ambiente levam a uma diminuição (rarefação) da abundância de *An. cruzii*, contudo há o aumento do contato entre mosquitos e humanos que habitam ou frequentam as áreas de bordas de fragmentos florestais onde esses mosquitos são encontrados.

Outro aspecto importante discutido foi a constatação que apesar da rarefação de *An. cruzii* nas áreas com maior alteração antrópica, foram encontrados espécimes de *An. cruzii*, *An. strodei* e *An. triannulatus* positivos para *P. vivax* e *P. malariae*, ressaltando a importância de realizar o rastreamento de infecção natural por PCR. Os autores sugerem que sejam desenvolvidos modelos preditivos que visem melhorar o entendimento de como os vetores da malária respondem às mudanças na paisagem, composição e configuração, podendo assim fornecer importantes informações para auxiliar no planejamento e direcionamento da prevenção e ações de controle. (Duarte *et al.*, 2013; Medeiros *et al.*, 2019).

Marrelli *et al.* (2007) ressaltam que apesar do grande domínio de *Kerteszia* na Mata Atlântica, a compreensão da distribuição das espécies de anofelinos ainda é limitada e estudo devem ser conduzidos uma vez que contínuas e intensas mudanças ambientais que podem alterar o padrão distribuição geográfica de mosquitos. Mesmo com uma baixa incidência de malária, ainda ocorreram alguns surtos ocasionais de malária nos últimos anos, com um número consideravelmente maior de casos, e isso pode estar relacionado às mudanças ambientais e

elevado número de humanos assintomáticos na região como reservatório, por isso toda região de Mata Atlântica deve ser monitorada (Marrelli *et al.*, 2007).

Finalizando, foi possível observar que ocorrem variações nas taxas de infecção nos anofelinos na Mata Atlântica ainda não compreendidas, apesar dos diversos estudos já realizados é sabido que o principal vetor da Mata Atlântica é o *An. cruzii*, entretanto observamos que outros vetores anofelinos secundários que podem ter papel importante na transmissão da malária e isso merece ser investigado.

Considerando de modo geral o status atual da vigilância entomológica na Mata Atlântica, dentro de ações programáticas baseadas apenas na identificação de vetores nos locais de ocorrência de caso confirmado de malária, vale a reflexão: Que tipos de informações ainda faltam e que podemos buscar para que possamos compreender melhor a dinâmica epidemiológica em meio às alterações antrópicas e mudanças climáticas no cenário atual?

7- Conclusões

- É de relevada importância a adoção de novas técnicas que permitam a observação da dinâmica de circulação de vetores anofelinos infectados para as atividades de vigilância e controle da malária na Mata Atlântica;

- Com a evolução da identificação de plasmódios em vetores, podemos perceber que a melhor técnica para a detecção de plasmódio é o PCR em tempo real, por sua rapidez e sensibilidade, entretanto é uma técnica que apresenta custo elevado, principalmente se considerar a sua adoção em serviços de saúde pública para ações de vigilância e controle, pois são necessários infraestrutura, equipamentos e reagentes e também o treinamento de técnicos.

- A taxa de infecção de anofelinos na Mata Atlântica é variável conforme a localização geográfica comparada a infecções em anofelinos na região Amazônica, isso pode refletir uma dinâmica de transmissão diferente, ainda pouco conhecida, envolvendo *An. cruzii*, e potencialmente outros vetores anofelinos e reservatórios símios e humanos assintomáticos.

8. Referências

Alencar F.E.C. *et al.* Assessment of asymptomatic *Plasmodium spp.* infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil. **Malar J.** 2018, 17:113. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2263-z>.

Amaral P.S.T., *et al.*; Vigilância em Saúde no Brasil 2003/2019 da criação da secretária de vigilância em saúde aos dias atuais [**Boletim Epidemiológico**- Internet]; Setembro, 2019. Disponível em: <https://ameci.org.br/wp-content/uploads/2019/09/boletim-especial-21-ago-19-web.pdf>.

Araújo I.C. Associação entre número de casos de malária e infectividade de *Anopheles spp.* em municípios do estado do Pará no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2013. [Dissertação-Internet]. **Universidade Federal do Pará**; Belém-Pará, 2015. Disponível em: http://www.ppgbaip.propesp.ufpa.br/ARQUIVOS/dissertacoes/2015/Izabela_Chaves_de_Araujo.pdf.

Barbosa, L.M.C., *et al.* Infectividade natural em *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis s.l.* Galvão e Damasceno, 1942 e *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 em áreas úmidas da cidade de Macapá, Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, p: 53-57. 2013.

Bickersmith S.A., *et al.* A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2015. doi: 10.1590/0074-02760150031.

Buery J.C., *et al.* Ecological characterisation and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed? **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2018 Feb;113(2):111-118. doi: 10.1590/0074-02760170225.

Buery J.C., *et al.* Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. **Microorganisms**. 2021 Jan 8;9(1):132. doi: 10.3390/microorganisms9010132.

Burkot T.R., *et al.* Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg.** 1984 Mar;33(2):227-31. doi: 10.4269/ajtmh.1984.33.227.

Branquinho M.S., *et al.* Infecção do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium vivax* variante VK247 nos Municípios de São Vicente e Jquitiba, São Paulo [Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jquitiba, São Paulo]. **Rev Panam Salud Publica.** 1997 Sep;2(3):189-93.

Brasil P., *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health.** 2017. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9.

Cerutti, C., *et al.* Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malar J** 6,33 (2007). doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-33>

Curado I., *et al.* Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/P. *brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1997 Mar-Apr;92(2):235-43. doi: 10.1590/s0074-02761997000200017.

Curado I., *et al.* Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Trop.** 2006 Nov;100(1-2):54-62. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.09.010.

CVE-Centro de Vigilância Epidemiológica [Internet]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/malaria/>

Malaria1820_dados.pdf.

Deane L.M., *et al.* The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in Southern Brazil suggests that human case of malaria of simian might be expected. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1984, 79:461-463.

Deane L.M., *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. **Trans R Soc MedHyg**, 64: 647, 1970.

Deane L.M. Simian Malaria in Brazil. Mem. **Inst.Oswaldo** Cruz, Rio de Janeiro, Vol.87,1992.

Duarte A.M., *et al.* Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Trop.** 2008 Aug;107(2):179-85. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.020.

Duarte A.M.R.C., *et al.* Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria the Atlantic Forest in Brazil. **Parasit Vectors**, 2013, 6:58 (doi: 10.1186/1756-3305-6-58).

Forattini O.P. Culicidologia Médica, Volume 2:Identificação.Biologia, Epidemiologia; São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**,2002.

Forattini O.P., *et al.* Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 1986,**20**:178-203.

Gadelha P. From "forest malaria" to "bromeliad malaria": a case-study of scientific controversy and malaria control. *Parassitologia* 1994, **36**:175-195.

Haas D.J., *et al.*; Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária** - ISSN:1679-7353 Ano XIV Número 26 – Janeiro de 2016 – Periódico Semestral.

Henrique R.L., *et al.* Malária em Sergipe: Situação atual [Trabalho de conclusão de curso-Internet]; **UNIT- Universidade Tiradentes**. Aracaju, 2016. Disponível em: <http://openrit.grupotiradentes.com:8080/xmlui/handle/set/set/1585>.

Kimura M., *et al.* Identification of the four species of human parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol. International** 46: 91-5, 1997.

Kirchgatter K., *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (diptera: culicidae) in peridomiliary 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.** 56(5):403-409; São Paulo,2014. doi: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000500006>.

Laporta, G.Z., *et al.* *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? **Malar J** 14, 181 (2015). doi: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0680-9>.

Lalremruata A., *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine.** 2015 Jul 29;2(9):1186-92. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033.

Ministério da Saúde [Internet].Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria#:~:text=Situa%C3%A7%C3%A3o%20epidemiol%C3%B3gica%20da%20mal%C3%A1ria&text=De%20acordo%20com%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o,405%20mil%20%C3%B3bitos%20por%20mal%C3%A1ria>.

Marie A., *et al.* Evaluation of a real-time quantitative PCR to measure the wild *Plasmodium falciparum* infectivity rate in salivary glands of *Anopheles gambiae*. **Malar J** 12, 224 (2013). doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-224>.

Marrelli M.T., *et al.* *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. **Malar** 6, 127 (2007). doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-127>.

Medeiros-Sousa A.R., *et al.* Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. **Malar J.** 2019, 18: 110. doi: 10.1186/s12936-019-2744-8.

Nascimento J.R. Xenovigilância da Malária: a avaliação de um novo indicador malariométrico baseado em culicídeos não- anofelinos [dissertação- Internet]. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus,2016. Disponível em:<http://www.pos.uea.edu.br/data/area/dissertação/download/25-6.pdf>.

Neves A., *et al.* Malaria outside the Amazon region: natural Plasmodium infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. **Acta Trop.** 2013 Jan;125(1):102-6. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.08.014.

Pina-Costa A., *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [Internet]. 2014 Aug [cited 2021 Feb 12]; 109(5): 618-633.doi:<https://doi.org/10.1590/0074-0276140228>.

Rachou, R.G. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**,10:145-81, 1958.

Rezende H.R., *et al.* Entomological characterization and natural infection of anophelines in na area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espirito Santo State, Brazil. **Neotrop. Entomol.** [Internet]. 2009. doi:<http://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000200017>.

Rocha JA, de Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU. Malaria vectors in areas of Plasmodium falciparum epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 2008 Jun;78(6):872-7.

Simões LR *et al.*; Fatores associados ás recidivas de malária causada por *Plasmodium vivax* no Municipio do Porto Velho, Rondonia, Brasil,2009. **Cad. Saúde Pública.**2014.Rio de Janeiro, v.30,n.7,p.1403-1417..doi:<http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00169312>.

Siregar JE, Faust CL, Murdiyarso LS, Rosmanah L, Saepuloh U, Dobson AP, Iskandriati D. Non-invasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. **Malar J.** 2015 Oct 12; 14:404. doi: 10.1186/s12936-015-0857-2.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol.** 1993 Oct;61(2):315-20. doi: 10.1016/0166-6851(93)90077-b.

Tubaki R.M., *et al.* Biting activity of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera, Culicidae) in domiciliary habitats in the southern Atlantic Forest, Peruibe, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 1993, **37**:569-575.

Velásquez C.M.R., Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos Anopheles (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax*[TESE-Internet] **Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**. Belo Horizonte, 2014. Disponível em:<http://arca.fiocruz.br/Handle/icict/10032>.

Wirtz, R. A., *et al.* Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organization*, 1987.65(1),39 - 45.<https://apps.who.int/iris/handle/10665/264328>.

Yamasaki T, *et al.* Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J MedPrimatol*.2011 40: 392-400.doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2011.00498.x>.

Zavortink T.J. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contrib. Am. Entomol Inst.* (Ann Arbor) 9: 1-54, 1973.doi: 10.5281/zenodo.180118.