

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Influência de determinantes entomológicos e bacterianos no contexto da malária em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira

Tatiane Marques Porangaba de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum

São Paulo

2019

Influência de determinantes entomológicos e bacterianos no contexto da malária em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira

Tatiane Marques Porangaba de Oliveira

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Epidemiologia para obtenção
do título de Doutora em Ciências.**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb
Sallum**

(VERSÃO REVISADA)

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Oliveira, Tatiane Marques Porangaba
Influência de determinantes entomológicos e bacterianos
no contexto da malária em áreas rurais e periurbanas da
Amazônia brasileira / Tatiane Marques Porangaba Oliveira;
orientadora Maria Anice Mureb Sallum. -- São Paulo, 2019.
153 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo, 2019.

1. Malária. 2. Nyssorhynchus darlingi. 3. Plasmodium.
4. Anophelinae. 5. Bactérias. I. Sallum, Maria Anice
Mureb, orient. II. Título.

Aos meus amados pais, Antonio e Ignez, que muitas vezes renunciaram os seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Se hoje estou a concluir mais esta etapa, é porque vocês me ensinaram a nunca desistir dos objetivos, sempre com respeito, honestidade, amor ao próximo e confiança em Deus.

Ao meu amado esposo Jardiel, pelo carinho, companheirismo, apoio incondicional durante esses anos e por sempre me incentivar a buscar novos caminhos e caminhar ao meu lado neles.

Ao meu amado filho André Oliveira que, pela sua alegria contagiante, compreensão, amor e carinho, tem o poder de recarregar minhas energias com apenas um sorriso.

Sem vocês, nenhuma conquista teria sentido.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas que me auxiliaram na realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum, pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação e pelos valiosos ensinamentos durante esses anos.

À Professora Maria Anice Mureb Sallum, Dra. Jan Evelyn Conn, Dr. Eduardo Sterlino Bergo, Professor Gabriel Zorello Laporta, Dr. Leonardo Suveges Moreira Chaves por terem disponibilizado seus conhecimentos científicos, intensa dedicação e tempo que foram fundamentais para a elaboração e realização de dois projetos (FAPESP e NIH) que diretamente nortearam, financiaram e foram fundamentais para a pesquisa da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Processo nº 2014/26229-7) e ao National Institute of Health, USA (grant R01 AI110112) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da tese.

Ao Dr. Sabri Saeed Mohamed Ahmed Al-Sanabani, Dr. Luís Marcelo Aranha Camargo e Dr. Eduardo Massad pelas sugestões dadas no exame de qualificação.

Aos Professores Dr. José Leopoldo Ferreira Antunes e Dr^a. Denise Pimentel Bergamaschi pelos ensinamentos em bioestatística.

A todos os professores da FSP pela dedicação e ensinamentos.

Ao Dr. Sabri Saeed Mohamed Ahmed Al-Sanabani, pelos ensinamentos em NGS.

Aos secretários da Pós-Graduação em Epidemiologia, Matheus e Renilda, por todo o auxílio dado durante o doutorado.

Aos funcionários Denise Sant'Ana e Caio Moreira pelo auxílio nas preparações das atividades de campo e preparações de amostras para os projetos FAPESP e NIH que foram importantes para a pesquisa da tese.

Às amigas Márcia Bicudo, Bruna Demari-Silva e Sandra Nagaki, pela amizade, apoio e por compartilharem comigo momentos de diferentes emoções durante essa etapa.

À bióloga Priscila Sainsonas, pela amizade e auxílio durante o doutorado.

À amiga Mirian Lopes, pela amizade e convivência durante esses anos.

Aos colegas de laboratório Ivy Sá, Leonardo Suveges, Pedro Pedro, Martha Rojas, Jandui Amorim, pela convivência e amizade.

Às amigas do curso Objetivo, Cláudia e Rosa, pela amizade e pelos momentos descontração.

À amiga Christiane Ozaki pela amizade e apoio durante essa etapa.

Aos colegas de trabalho da FSP, pela amizade e convivência.

Aos meus amados irmãos, Marcos Porangaba e Thais Porangaba, pelo apoio, amizade, união e companheirismo não somente nesses quatro anos, mas durante a vida toda. Amo vocês!

À minha querida avó, Maria Baptista, pelo seu apoio e carinho não somente nesta etapa, mas durante minha vida.

À minha querida família Oliveira, Leila, Zezinho, Elaine, Gilvan, Danila, Pedro e Marina, pelos momentos de união, descontração, amizade e apoio durante esta etapa e muitos outros anos.

OLIVERA, T. M. P. **Influência de determinantes entomológicos e bacterianos no contexto da malária em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira.** 2019. Tese - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

RESUMO

Introdução – *Nyssorhynchus darlingi* e outros mosquitos da subfamília Anophelinae atuam como vetores dos parasitos da malária humana. Alterações na paisagem podem alterar a distribuição, abundância e comportamento desses mosquitos. Bactérias presentes no intestino médio de vetores de *Plasmodium* são capazes de modular a infecção por *Plasmodium* spp. no mosquito. **Objetivos** – Ampliar o conhecimento sobre os mosquitos que atuam na dinâmica de transmissão da malária em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira e investigar a diversidade bacteriana associada ao abdômen de *Ny. darlingi* e *Nyssorhynchus braziliensis*. **Métodos** – Capturas de mosquitos foram realizadas em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira. Testes de detecção de *Plasmodium* spp. foram realizados nos mosquitos. Análises de correlação e de regressão foram realizadas entre métricas de paisagem e as variáveis: incidência acumulada de malária, número de *Ny. darlingi*, mosquitos infectados e taxa de picada humana. Sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA foi realizado para explorar a diversidade bacteriana associada ao abdômen de *Ny. braziliensis* e de *Ny. darlingi* naturalmente infectado e não infectado por *Plasmodium* spp. **Resultados** – *Nyssorhynchus darlingi*, *Nyssorhynchus rangeli*, *Nyssorhynchus benarrochi* B e *Nyssorhynchus konderi* B foram encontrados infectados com *Plasmodium*. *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* foram as espécies do parasito encontradas nos vetores. Foram encontradas correlações positivas entre incidência acumulada de malária e as variáveis taxa de picada humana, densidade de borda e número de *Ny. darlingi*. Porcentagem de cobertura florestal e taxa de picada humana apresentaram correlação negativa. O período entre 0 h:00 e 3 h:00 foi o que apresentou maior número de mosquitos infectados. Não houve diferença estatística entre a

diversidade bacteriana de *Ny. darlingi* infectado e não infectado. *Asaia* e *Serratia* estavam presentes em ambas as espécies de *Nyssorhynchus*. *Enterobacter* foi encontrado apenas em abdômen de *Ny. darlingi* não infectado e *Pseudomonas* foi o gênero mais abundante.

Conclusão – Este estudo reporta pela primeira vez a infecção natural por *Plasmodium* em *Ny. konderi* B e *Ny. benarrochi* B em regiões da Amazônia brasileira. Os resultados obtidos sugerem que mudanças na paisagem podem favorecer a ocorrência de novos vetores e consequentemente, aumentar o número de casos de malária em regiões endêmicas. O encontro de maior número de mosquitos infectados após a meia-noite contribui para as medidas de controle do vetor e confirma a importância do uso de mosquiteiros impregnados com inseticida. A presença de *Asaia* e *Serratia* em ambas as espécies de *Nyssorhynchus* e a alta prevalência de *Pseudomonas* em *Ny. darlingi* indicam a necessidade de outros estudos sobre a possível utilização destas bactérias no controle da malária através da paratransgênese. A presença do gênero *Enterobacter* apenas em abdômen de *Ny. darlingi* não infectado sugere que bactérias deste gênero possam oferecer proteção a infecção por *Plasmodium* e outros estudos devem ser realizados para verificar essa hipótese.

Palavras-chave: *Nyssorhynchus darlingi*, Anophelinae, *Plasmodium*, malária, diversidade bacteriana.

OLIVERA, T. M. P. [**Influence of entomological and bacterial determinants in the context of malaria in rural and peri-urban areas of the Brazilian Amazon**]. 2019. Thesis - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ABSTRACT

Introduction - *Nyssorhynchus darlingi* and other mosquitoes of the subfamily Anophelinae act as vectors of human malaria parasites. Landscape changes can alter the distribution, abundance and behavior of these mosquitoes. Bacteria present in the midgut of *Plasmodium* vectors are able to modulate infection by *Plasmodium* spp. in the mosquito. **Objectives** - To broaden the knowledge about mosquitoes that act on the dynamics of malaria transmission in rural and peri-urban areas of the Brazilian Amazon and to investigate the bacterial diversity associated with abdomen of *Ny. darlingi* and *Nyssorhynchus braziliensis*. **Methods** - Mosquito collections were carried out in rural and peri-urban areas of the Brazilian Amazon. Detection tests for *Plasmodium* spp. mosquitoes were carried out. Correlation and regression analyzes were performed between landscape metrics and the following variables: cumulative incidence of malaria, number of *Ny. darlingi*, infected mosquitoes, and human biting rate. Sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene was performed to explore the bacterial diversity associated with abdomen of *Ny. braziliensis* and *Ny. darlingi* naturally infected and not infected by *Plasmodium* spp. **Results** - *Nyssorhynchus darlingi*, *Nyssorhynchus rangeli*, *Nyssorhynchus benarrochi* B and *Nyssorhynchus konderi* B were found infected with *Plasmodium*. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* were the parasite species found in the vectors. Positive correlations were found between cumulative incidence of malaria and the variables human biting rate, edge density and number of *Ny. darlingi*. Percentage of forest cover and human biting rate presented negative correlation. The period from 0 h: 00 to 3 h: 00 was the one with the highest number of infected mosquitoes. There was no statistical difference between bacterial diversity in *Ny. darlingi* infected and uninfected. *Asaia* and

Serratia were present in both species of *Nyssorhynchus*. *Enterobacter* was found only in abdomen of *Ny. darlingi* uninfected and *Pseudomonas* was the genus most abundant.

Conclusion - This study reports for the first time the natural infection by *Plasmodium* in *Ny. konderi* B and *Ny. benarrochi* B in regions of the Brazilian Amazon. The results suggest that changes in the landscape can favor the occurrence of new vectors and, consequently, increase the number of malaria cases in endemic regions. The finding of a greater number of infected mosquitoes after midnight contributes to vector control measures and confirms the importance of insecticide-treated nets. The presence of *Asaia* and *Serratia* in both species of *Nyssorhynchus* and the high prevalence of *Pseudomonas* in *Ny. darlingi* indicate the need for further studies on the possible use of these bacteria in the control of malaria through paratransgenesis. The presence of the *Enterobacter* only in abdomen *Ny. darlingi* uninfected suggests that bacteria of this genus can offer protection to *Plasmodium* infection and other studies should be performed to verify this hypothesis.

Keywords: *Nyssorhynchus darlingi*, Anophelinae mosquitoes, *Plasmodium*, malaria, bacterial diversity.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
1 INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 CICLO DE VIDA DO PLASMÓDIO.....	20
1.2 COMPETÊNCIA E CAPACIDADE VETORA.....	22
1.3 CONTROLE DE VETORES.....	22
1.4 CICLO DE TRANSMISSÃO.....	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVO GERAL	26
4 METODOLOGIA	26
4.1 CAPTURA DE MOSQUITOS.....	27
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
5 REFERÊNCIAS	33

CAPÍTULO 1

Paisagem e mosquitos vetores de <i>Plasmodium</i> spp. em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira.....	38
1 INTRODUÇÃO	39
1.1 MALÁRIA NO BRASIL.....	39
1.2 MALÁRIA DE FRONTEIRA.....	41
1.3 MALÁRIA EM ÁREA DE FRANJA FLORESTAL.....	44
1.4 FATORES AMBIENTAIS E MALÁRIA.....	45
1.5 VETORES DE <i>Plasmodium</i> NA REGIÃO AMAZÔNICA.....	46
1.5.1 <i>Nyssorhynchus darlingi</i>	47
1.5.2 <i>Nyssorhynchus albitarsis</i> s.l.	48
1.5.3 <i>Nyssorhynchus aquasalis</i>	48
2 OBJETIVOS	49
3 METODOLOGIA	49
3.1 CAPTURA DE MOSQUITOS.....	49
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	49
3.3 VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE.....	50
3.4 ENSAIOS DE DETECÇÃO DE <i>Plasmodium</i>	51
3.5 OBTENÇÃO DAS MÉTRICAS DE PAISAGEM.....	52

3.6	NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA.....	54
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
3.7.1	Coeficiente de correlação de Spearman.....	54
3.7.2	Regressão binomial negativa.....	55
3.7.3	Regressão logística binária.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1	MANUSCRITO 1: Human malaria vectors in rural and periurban areas of the Brazilian Amazon.....	55
5	CONCLUSÕES.....	92
6	REFERÊNCIAS.....	93

CAPÍTULO 2

	Diversidade bacteriana associada ao abdômen de <i>Nyssorhynchus darlingi</i> e <i>Nyssorhynchus braziliensis</i>	100
1	INTRODUÇÃO.....	101
1.1	IMPORTÂNCIA E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO MOSQUITO.....	101
1.2	MICROBIOTA INTESTINAL E <i>Plasmodium</i>	103
2	OBJETIVOS.....	104
3	METODOLOGIA.....	105
3.1	EXTRAÇÃO DE DNA.....	105
3.2	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO V4.....	106
3.3	BIBLIOTECA DE DNA E SEQUENCIAMENTO.....	107
3.4	PROCESSAMENTO DOS DADOS SEQUENCIADOS.....	107
3.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	108
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
4.1	MANUSCRITO 2: <i>Asaia</i> (Rhodospirillales: Acetobacteraceae) and <i>Serratia</i> (Enterobacterales: Yersiniaceae) associated with <i>Nyssorhynchus braziliensis</i> and <i>Nyssorhynchus darlingi</i> (Diptera: Culicidae).....	109
4.2	MANUSCRITO 3: Bacterial diversity associated with abdomen of naturally <i>Plasmodium</i> -infected and non-infected <i>Nyssorhynchus darlingi</i>	123
5	CONCLUSÕES.....	145
6	REFERÊNCIAS.....	146
	CURRÍCULO LATTES.....	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial da malária. As áreas amarelas e vermelhas do mapa indicam regiões onde ocorre transmissão do parasito da malária, enquanto as áreas verdes referem-se a locais onde a ocorrência de malária é desconhecida.....	19
Figura 2 – Ciclo do desenvolvimento do <i>Plasmodium</i> spp.	21
Figura 3 – Elementos participantes na dinâmica de transmissão da malária.....	23
Figura 4 – Municípios onde foram realizadas as capturas de mosquitos.....	28
Figura 5 – Pontos de coleta de mosquitos no município de Machadinho D'Oeste.....	30
Figura 6 – Ilustração da armadilha para interceptação de mosquitos.....	30

CAPÍTULO 1

Figura – Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, ano 2018.....	40
---	----

MANUSCRITO 1

Figure 1 – Map of the localities where the collections were carried out.....	82
Figure 2 – Drawing illustrating the areas (peridomicile and forest edge) where the collections were performed.....	83
Figure S1 – Number of Anophelinae mosquitoes and number of infected mosquitoes collected in peridomicile in each municipality and each collection hour.....	84
Figure S2 – Scatter plots showing correlation between cumulative incidence and human biting rate (HBR), edge density (ED), and number of <i>Ny. darlingi</i> (NY_DAR_PER) and between HBR and forest cover (FC).....	87

MANUSCRITO 2

Figure – Composition of bacteria from abdomen of <i>Nyssorhynchus braziliensis</i> and <i>Nyssorhynchus darlingi</i> . Only genera that had a relative abundance of 1% or greater are presented.....	121
---	-----

MANUSCRITO 3

- Figure 1** – Composition of bacterial phyla from *P*-negative and *P*-positive groups. **(A)** *P*-negative group, **(B)** *P*-positive group.....139
- Figure 2** – Abundance of the bacterial genera in *P*-positive and *P*-negative groups. Only genera that had a relative abundance of 1% or greater are presented. Others <1.0 corresponds to genera that had relative abundance <1%. **(A)** *P*-positive group, **(B)** *P*-negative group....139
- Figure 3** – Venn diagram. Number of unique OTUs in *P*-positive and *P*-negative groups. **(A)** *P*-negative group presents 77.5% of the total unique OTUs, **(B)** Almost 23% of all unique OTUs are presents only in *P*-positive group.....140
- Figure 4** – Box plot of Shannon index for *P*-positive and *P*-negative groups. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles; whiskers extend to 5th and 95th percentiles, outliers are represented by dots. **(A)** Samples of the *P*-negative group, **(B)** Samples of the *P*-positive group.....140
- Figure 5** – Beta diversity. Principal Coordinates Analysis based on the unweighted unifrac distance. Blue circles: *Plasmodium* non-infected samples. Red squares: *Plasmodium* infected samples.....141
- Figure S1** – Rarefaction curves of OTUs (97% similarity) of V4 region of 16S rRNA gene sequences from 16 samples. Rarefaction curves were generated in Qiime2 (2019.1 version). Bars correspond to the standard deviation in each depth step after 10 iterations (rarefied tables computed at each sampling depth).....142

LISTA DE TABELAS

Tabela – Período de captura de mosquitos em cada município.....	29
--	----

MANUSCRITO 1

Table 1 – Municipality and locality collection, mosquito collection date, local malaria cases and local population.....	88
--	----

Table 2 – Species of mosquitoes infected by <i>Plasmodium</i> spp. and number of infected mosquitoes by environment (peridomicile and forest fringe) and collection method (HLC, BS, ST).....	89
--	----

Table 3 – Spearman’s rank correlations, non-parametric.....	90
--	----

Table 4 – Binomial negative regression analysis. P value for association between the number of <i>Nyssorhynchus darlingi</i> collected in peridomicile per 12h and 3-hours collection intervals.....	91
---	----

Table 5 – Binomial negative regression analysis. P value for association between number of infected mosquitoes collected in peridomicile per 12h and 3-hours collection intervals.....	91
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados na amplificação da região V4 do gene 16S.....	107
--	-----

MANUSCRITO 2

Table S – Number of sequences of each phylum in <i>Nyssorhynchus braziliensis</i> and <i>Nyssorhynchus darlingi</i>	122
--	-----

MANUSCRITO 3

Table S1 – Period of collection in each municipality.....	143
--	-----

Table S2 – Sequence of the oligonucleotides used to amplify the V4 region of the 16S rRNA gene.....	143
--	-----

Table S3 – ID sample, Municipality of collection and <i>Plasmodium</i> infection of each sample used in this study.....	144
--	-----

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – *Artemisinin-based Combination Therapy*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CF ou FC – cobertura florestal

COI – citocromo *c* oxidase subunidade I

CT – *cycle threshold*

DB ou ED – densidade de borda de fragmentos

DNA – ácido desoxirribonucléico

DW e DIS DRE – distância do ponto de coleta por atração humana até a coleção de água mais próxima

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ENA – *European Nucleotide Archive*

ESA – *European Space Agency*

HBR – *Human Biting Rate* ou taxa de picada humana

HLC – *Human Landing Catch* ou taxa de pouso do mosquito

HRM – *High Resolution Melting*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCRA – Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária

IPA – Índice Parasitário Anual

NGS – *Next-generation Sequencing* ou sequenciamento de segunda geração

NaCl – cloreto de sódio

OTU – *Operational Taxonomic Unit*

PAHO – *Pan American Health Organization*

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PCR TTGE – *PCR with Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis*

PCoA – *Principal Coordinates Analysis* ou análise das coordenadas principais

PERMANOVA – *Permutational Multivariate Analysis of Variance* ou análise multivariada permutacional de variância

SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

ST – *Shannon trap*

TE – Tris EDTA

TEN – Tris EDTA NaCl

UNG - *Uracil N-Glycosylase*

WHO – *World Health Organization* ou Organização Mundial da Saúde

APRESENTAÇÃO

O presente estudo é fruto do desenvolvimento do doutorado no Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum.

A tese é apresentada na forma de coletânea de artigos e está estruturada nos seguintes tópicos: Introdução Geral, Justificativa, Objetivo Geral, Metodologia, Capítulo 1 e Capítulo 2. Cada capítulo é composto pelos tópicos: Introdução, Objetivos, Metodologia, Resultados e Discussão, Conclusões e Referências. Resultados e Discussões são apresentados em formato de artigos. A escolha por capítulos foi proposta para uma melhor abordagem sobre as pesquisas realizadas.

Em Introdução Geral são citados aspectos gerais da malária e transmissão do parasito, apresentando ao leitor uma visão geral dos temas que serão abordados mais especificadamente em cada capítulo. Em Metodologia estão presentes as metodologias iniciais que são comuns aos estudos de ambos os Capítulos, assim, esse tópico refere-se aos métodos de captura e identificação das amostras utilizadas.

O Capítulo 1 aborda as espécies de anofelíneos que atuam como vetores de *Plasmodium* em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira. Neste capítulo é apresentado o manuscrito “Human malaria vectors in rural and periurban areas of the Brazilian Amazon”.

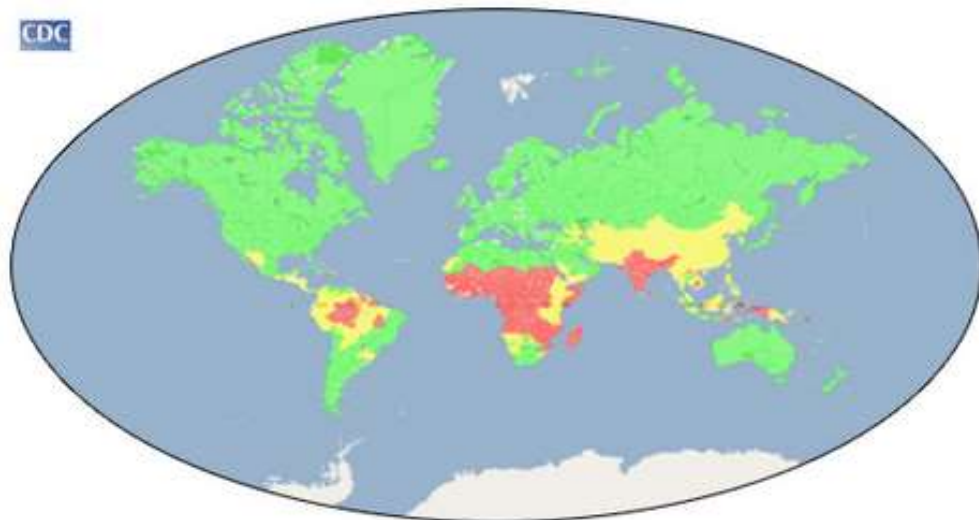
O Capítulo 2 refere-se à diversidade bacteriana associada ao abdômen de vetores de *Plasmodium*. Neste capítulo, os seguintes manuscritos estão presentes “*Asaia* (Rhodospirillales: Acetobacteraceae) and *Serratia* (Enterobacterales: Yersiniaceae) associated with *Nyssorhynchus braziliensis* and *Nyssorhynchus darlingi* (Diptera: Culicidae)” e

“Bacterial diversity associated with abdomen of naturally *Plasmodium*-infected and non-infected *Nyssorhynchus darlingi*”.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A malária é uma parasitose com transmissão endêmica em países tropicais e subtropicais (Figura 1) e é considerada problema de saúde pública mundial. Em 2017, foram estimados 219 milhões de casos da doença no mundo, três milhões a mais que no ano anterior (WHO, 2018).

Figura 1 – Distribuição mundial da malária. As áreas amarelas e vermelhas do mapa indicam regiões onde ocorre transmissão do parasito da malária, enquanto as áreas verdes referem-se a locais onde a ocorrência de malária é desconhecida.



Extraído de: CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*.
(<https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>, acessado em 19 de julho de 2019).

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, filo Apicomplexa (CAVALIER-SMITH, 1993). Dentre as características comuns aos membros deste filo estão o ciclo de vida complexo, dividido em três estágios (esporozoítas, merozoítas e gametócitos) e a presença de um número definido de organelas envolvidas na ligação e invasão da célula hospedeira. Os parasitos da malária humana são transmitidos através da

picada de mosquitos fêmeas pertencentes a algumas espécies da subfamília Anophelinae. A transmissão ocasional do parasito pode ocorrer em casos de transfusão sanguínea, uso de seringas contaminadas, transplante de órgãos e congenitamente de mãe para filho (BARATA et al., 1993; OWUSU-OFORI et al., 2010; OLUPOT-OLUPOT et al., 2018).

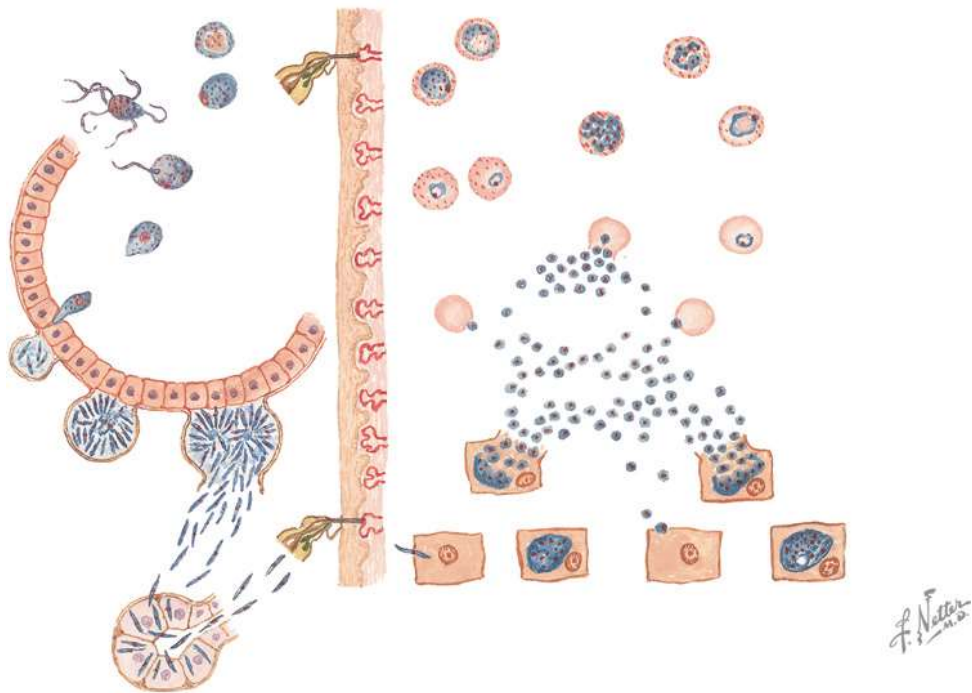
Plasmodium falciparum Welch, *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti), *Plasmodium malariae* Laveran, *Plasmodium ovale curtisi* Sutherland et al., *Plasmodium ovale wallkieri* Sutherland et al. e *Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulligan são os agentes etiológicos da malária humana (WHITE, 2008; SUTHERLAND et al., 2010). *Plasmodium cynomolgi* *cynomolgi* Mayer, *Plasmodium simium* Fonseca e *Plasmodium brasilianum* Gonderand von Berrenberg-Gossler são responsáveis pela malária zoonótica em primatas não humanos e podem ser transmitidos para humanos em regiões da Ásia, Mata Atlântica e América do Sul, respectivamente (DEANE et al., 1966; LALREMRUATA et al., 2015; BRASIL et al., 2017). *Plasmodium falciparum* é responsável por 99,7% dos casos de malária em países da África Subsaariana e *Plasmodium vivax* é prevalente na região das Américas, correspondendo a 74,1% dos casos (WHO, 2018).

1.1 CICLO DE VIDA DO PLASMÓDIO

O ciclo do *Plasmodium* spp. é composto por duas fases (Figura 2). A fase assexuada (esquizogônica) que ocorre no hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário) e a fase sexuada (esporogônica) que ocorre no hospedeiro invertebrado (hospedeiro definitivo). Durante o repasto sanguíneo em indivíduo infectado, anofelíneos fêmeas podem ingerir sangue contendo gametócitos do parasito. No interior do intestino médio do mosquito, os gametócitos se transformam em micro e macrogametócitos e, após a fertilização, ocorre a formação do zigoto. O zigoto se diferencia em oocineto (forma móvel), atravessa a matriz peritrófica, o epitélio intestinal e permanece na membrana basal, transformando-se em

oocisto. Cada oocisto originará milhares de esporozoítas que irão circular pela hemolinfa, alojando-se nas glândulas salivares. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito inocula esporozoítas no hospedeiro vertebrado, iniciando a fase assexual. Os esporozoítas invadem os hepatócitos e após o desenvolvimento e replicações, são liberados merozoítas. Estes invadem os eritrócitos, se transformam em trofozoítas, esquizontes e mais merozoítas são liberados. Após a reprodução assexuada, os gametócitos são liberados na corrente sanguínea. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns merozoítas podem ficar em estágio dormente no fígado. Essa forma dormente é conhecida como hipnozoíta. Por mecanismos ainda não conhecidos, as hipnozoítas podem ser ativadas e provocar um novo ataque malárico, conhecido por recaída. (CIMERMAN e CIMERMAN, 2010; COWMAN et al., 2012; SMITH et al., 2014).

Figura 2 – Ciclo do desenvolvimento do *Plasmodium* spp.



Extraído de: Coleção Netter
(Ilustração médica do Netter usada com a permissão da Elsevier, cedida mediante pagamento para MAMS no. NI0005592. Todos os direitos reservados).

1.2 COMPETENCIA E CAPACIDADE VETORA

Competência e capacidade vetora de anofelíneos estão relacionadas ao potencial de transmissão de *Plasmodium*. Competência vetora fundamenta-se na infectibilidade comprovada do mosquito vetor ao plasmódio, seja por infecção natural ou por experimentação (FORATTINI, 2002). Aproximadamente 70 espécies da subfamília Anophelinae são competentes para transmitir os protozoários que podem causar malária em humanos e 41 são consideradas vetores dominantes (SINKA et al., 2012). Dentre as 70 espécies, vale assinalar que algumas não foram definidas e validadas de acordo com as regras de nomenclatura zoológica. Portanto são consideradas membros de complexos de espécies. Capacidade vetora é definida como o número médio de picadas potencialmente infectantes (GARRET-JONES, 1964) e expressa a velocidade que determinado parasito pode se dispersar em uma população de hospedeiros suscetíveis (FORATTINI, 2002). A capacidade vetora baseia-se na ocorrência do contato eficaz e compreende os parâmetros: densidade populacional de culicídeos vetores, proporção de mosquitos infectados, longevidade do culicídeo, período de incubação extrínseco do parasito e antropofilismo (FORATTINI, 2002; COUHET et al., 2010). De acordo com a capacidade vetora, mosquitos vetores podem ser denominados primários/principais e secundários/auxiliares. Vetores primários atuam na malária endêmica em extensas regiões biogeográficas e vetores secundários participam da transmissão local de *Plasmodium* sob determinadas condições. Alterações ambientais podem modificar o comportamento do vetor e transformar os vetores auxiliares ou apenas que tenham competência vetora, em principais (FORATTINI, 2002).

1.3 CONTROLE DE VETORES

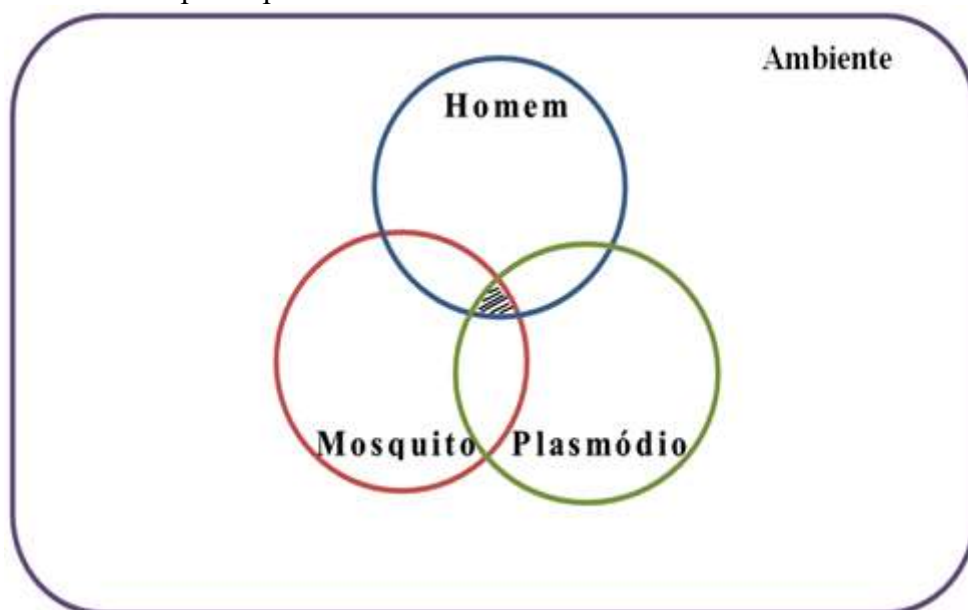
O controle dos mosquitos vetores é essencial para a prevenção e redução dos casos de malária. Para o controle dos mosquitos são utilizados mosquiteiros impregnados com

inseticidas, pulverização intradomiciliar e espacial (*fogging*) com inseticidas e controle das fases iniciais de vida (larvas e pupas) (BAIA-DA-SILVA et al., 2019). Devido à resistência dos vetores aos inseticidas, estratégias genéticas, como transgênese e paratransgênese, podem ser alternativas para o controle dos mosquitos vetores (WILKE e MARRELLI, 2015). Na paratransgênese, microrganismos simbióticos são alterados geneticamente e são capazes de liberar substâncias antipatogênicas no interior do vetor (DURVASULA et al., 1997).

1.4 CICLO DE TRANSMISSÃO

O ciclo de transmissão do *Plasmodium* tende a ser contínuo se condições favoráveis tanto para o desenvolvimento do mosquito e do plasmódio quanto para a exposição do homem às picadas de anofelíneos infectados (Figura 3) estiverem presentes. Neste contexto, o ambiente possui papel fundamental na dinâmica de transmissão da malária. A área preenchida em preto da figura 3 representa o nicho ecológico da doença, ou seja, a interconexão dos determinantes da transmissão.

Figura 3 – Elementos participantes na dinâmica de transmissão da malária.



Fatores físicos, biológicos e antrópicos podem afetar os mecanismos de interação entre mosquito–homem–plasmódio. Dentre os fatores físicos estão o clima e a precipitação pluvial. Estudos mostram que alterações climáticas, como elevação de temperatura e precipitação pluvial, podem alterar tanto a distribuição do vetor, como o desenvolvimento do ciclo do parasito, favorecendo a expansão da área de transmissão da doença (PATZ e OLSON, 2006; LYON et al., 2017). Os fatores biológicos estão relacionados à flora e fauna. A biodiversidade da fauna tem importante relação com a dinâmica de transmissão da malária. Áreas florestadas possuem elevada riqueza e abundância de mosquitos, o que pode ocasionar uma competição alimentar difusa. Essa competição em busca da fonte de alimento pode levar à diminuição do número de picadas infectantes no hospedeiro intermediário (homem). Além disso, a abundância de animais de sangue quente em regiões florestadas aumenta a abundância de fonte alimentar (efeito diluição). Assim, probabilidade de picadas infectantes no homem também diminui. Dessa forma, competição alimentar difusa e efeito diluição em florestas tropicais podem alterar a dinâmica de transmissão da malária, podendo prevenir surtos da doença nessas regiões (LAPORTA et al., 2013). Os fatores antrópicos estão relacionados a aspectos sociais e econômicos. Dependendo das atividades econômicas exercidas pela população e da localização das moradias em relação aos habitats das larvas, as pessoas podem estar mais ou menos expostas ao mosquito vetor. O acesso ao uso de mosquiteiros e telas nas janelas e nas portas, aplicação de inseticidas e melhores moradias dificultam a interação do mosquito–homem (PATZ et al., 2004; CASTRO et al., 2006). Neste contexto, atividades humanas não planejadas e não controladas podem provocar alterações ambientais que contribuem para a proliferação de mosquitos vetores de *Plasmodium* e diminuição da biodiversidade local. Resultados dessas transformações intensificam a interação dos participantes na dinâmica de transmissão da malária (homem-mosquito-plasmódio).

Microrganismos presentes no intestino dos mosquitos também podem influenciar a interação mosquito-parasito (LEFÈVRE et al., 2013). Bactérias da microbiota intestinal podem inibir o desenvolvimento do parasito no vetor (CIRIMOTICH et al., 2011; KALAPPA et al., 2018) por meio da indução da resposta imune do vetor ou secreção de compostos bacterianos (DONG et al., 2009; ROMOLI e GENDRIN, 2018). Assim, essas bactérias podem alterar a competência dos mosquitos vetores por modular a susceptibilidade do vetor ao *Plasmodium* e sua capacidade de transmitir o parasito (DENNISON et al., 2014, DIEME et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é endêmica na Região Amazônica e aproximadamente um quinto da população brasileira vive em áreas de transmissão desta doença (WHO, 2018). Em áreas rurais e periurbanas da Amazônia, a falta de infraestrutura e as modificações ambientais provocadas pelas ações antrópicas, como o desmatamento, podem proporcionar ambiente favorável à proliferação de mosquitos vetores, através da emergência de habitat larvais de mosquitos antropofílicos, e conseqüentemente, uma maior incidência dos casos da doença (BAYOH e LINDSAY, 2003; VITTOR et al., 2006; CHRISTIANSEN-JUCHT et al., 2014; KWEKA et al., 2016). Identificar espécies de mosquitos que atuam como vetores de *Plasmodium* nessas regiões, bem como aspectos da ecologia e biologia, contribuem para o melhor entendimento da dinâmica de transmissão e, conseqüentemente, auxilia na escolha do método de controle que seja mais eficaz.

Fatores que alteram o desenvolvimento do plasmódio nos hospedeiros também influenciam na dinâmica de transmissão da malária, uma vez que podem interromper o ciclo de transmissão do parasito. Bactérias da microbiota intestinal do mosquito podem interferir no ciclo do parasito e modular a susceptibilidade do inseto à infecção por *Plasmodium* (BOISSIÈRE et al., 2012; KALAPPA et al., 2018). Poucos são os estudos sobre a diversidade bacteriana no vetor primário da Região Amazônica, *Nyssorhynchus darlingi* (TERENIUS et al., 2008; BASCUÑÁN et al., 2018; ALONSO et al., 2019).

Assim, este estudo propõe preencher lacunas tanto sobre as espécies de mosquitos que atuam como vetores de *Plasmodium* na Amazônia brasileira, quanto a respeito da diversidade bacteriana associada ao abdômen destes insetos, na dinâmica de transmissão da malária em áreas rurais e periurbanas da Região Amazônica brasileira.

3 OBJETIVO GERAL

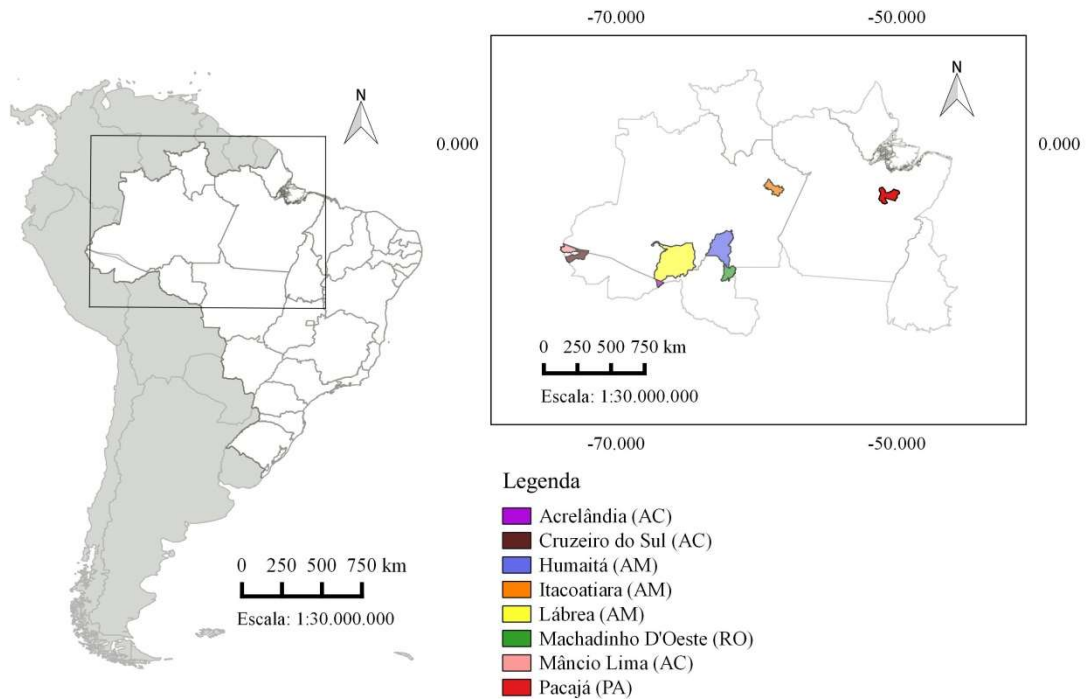
Ampliar o conhecimento sobre fatores entomológicos e bacterianos na dinâmica de transmissão da malária em áreas rurais e periurbanas da Amazônia brasileira.

4 METODOLOGIA

4.1 CAPTURA DE MOSQUITOS

As capturas foram realizadas em áreas rurais e periurbanas nos seguintes municípios: Acrelândia (AC), Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC), Itacoatiara (AM), Lábrea (AM), Humaitá (AM), Pacajá (PA) e Machadinho D'Oeste (RO) (Figura 4). O município de Acrelândia está localizado no leste do estado do Acre e faz divisa com a Bolívia. A população é constituída principalmente por famílias de agricultores e a cidade teve origem a partir de projetos de colonização da década de 1980 (IBGE, 2018). Cruzeiro do Sul está localizado na região da bacia do rio Juruá, no oeste do estado do Acre. O povoamento da região iniciou na segunda metade do século XIX pela migração de nordestinos, os quais tinham como objetivo o trabalho nos seringais da região (IBGE, 2018). Mâncio Lima também está localizado na região da bacia do rio Juruá, no oeste do estado do Acre. Seringueiros e agricultores nordestinos contribuíram para a formação da cidade (IBGE, 2018). Itacoatiara está localizada na região da bacia do Rio Amazonas, no oeste do estado do Amazonas. Lábrea está localizada no sul do estado do Amazonas e a oeste do Rio Madeira. Humaitá é banhada pelo médio rio Madeira. Pacajá está localizada a oeste do Rio Tocantins. A origem do município está relacionada ao Programa de Integração Nacional, cujo objetivo foi incentivar a colonização na Amazônia (IBGE, 2018). Machadinho D'Oeste está localizado na bacia do rio Machado, no norte do estado de Rondônia. O surgimento deste município ocorreu a partir do assentamento do INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária) Machadinho em 1982 (IBGE, 2018).

Figura 4 – Municípios onde foram realizadas as capturas de mosquitos.



Nos municípios de Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, as capturas de mosquitos foram realizadas em áreas periurbanas, enquanto nos outros municípios, as capturas ocorreram em áreas rurais, onde predominam atividades de agricultura de subsistência. Todos os municípios, em que as capturas foram realizadas, são endêmicos para malária.

As capturas de mosquitos foram realizadas entre janeiro de 2015 e novembro de 2016 (Tabela), durante a estação seca ou no período de transição das estações úmida-seca, exceto no município de Acrelândia, as quais foram realizadas durante a estação chuvosa. As capturas ocorreram no período das 18 h00 às 0 h00. Nos municípios de Acrelândia, Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima as capturas ocorreram das 18 h00 às 6 h00.

Tabela – Período de captura de mosquitos em cada município.

Município	Mês	Ano
Acrelândia	Janeiro	2015
Cruzeiro do Sul	Abril, Maio	2015
Humaitá	Julho	2016
Itacoatiara	Novembro	2016
Lábrea	Agosto	2015
Machadinho D'Oeste	Outubro	2015
Mâncio Lima	Maior, Junho	2015
Pacajá	Abril	2016

Em cada município, as capturas foram realizadas em seis pontos que diferem pela porcentagem de cobertura florestal estimada *in loco*. Em cada ponto foi realizado uma captura no peridomicílio (por atração humana) e outra na margem da mata (por armadilha de Shannon). Assim, os mosquitos foram capturados em 48 pontos (8 municípios x 6 pontos) (Figura 5). Em 24 dos 48 pontos, foram realizadas capturas com armadilhas que foram construídas para interceptação de mosquitos, no ambiente do peridomicílio. As armadilhas foram construídas com tela mosquiteira com 2 metros de altura e 12 metros de comprimento. Dessa maneira, a área amostral foi composta por duas superfícies de 24 metros quadrados cada (Figura 6).

Figura 5 – Pontos de captura de mosquitos no município de Machadinho D'Oeste.

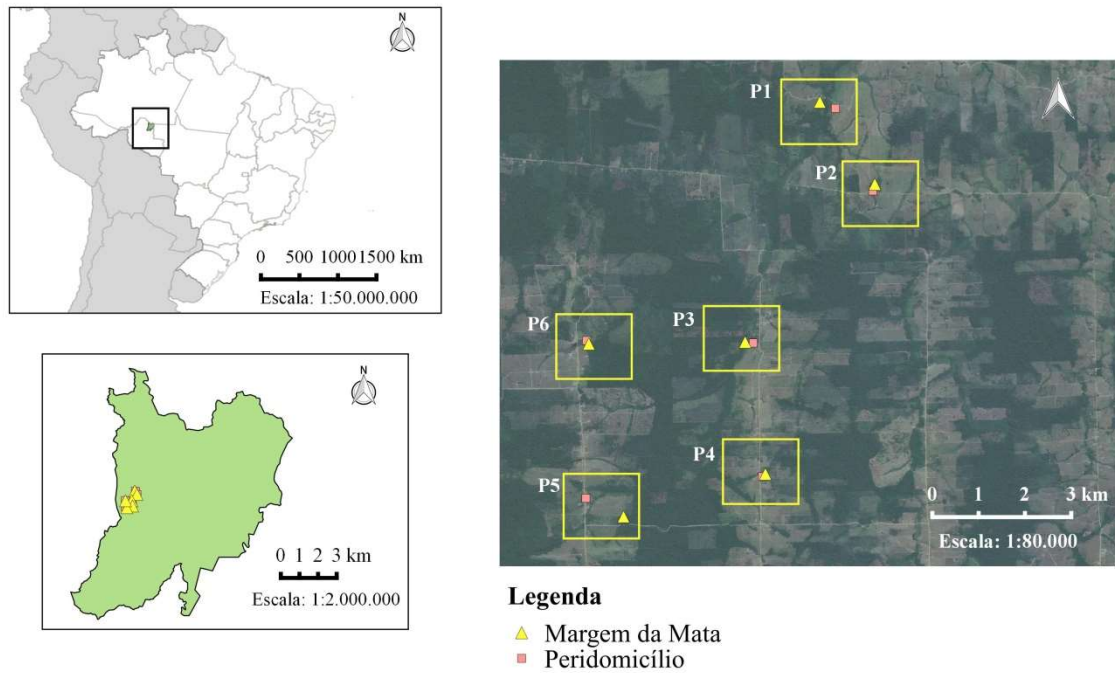
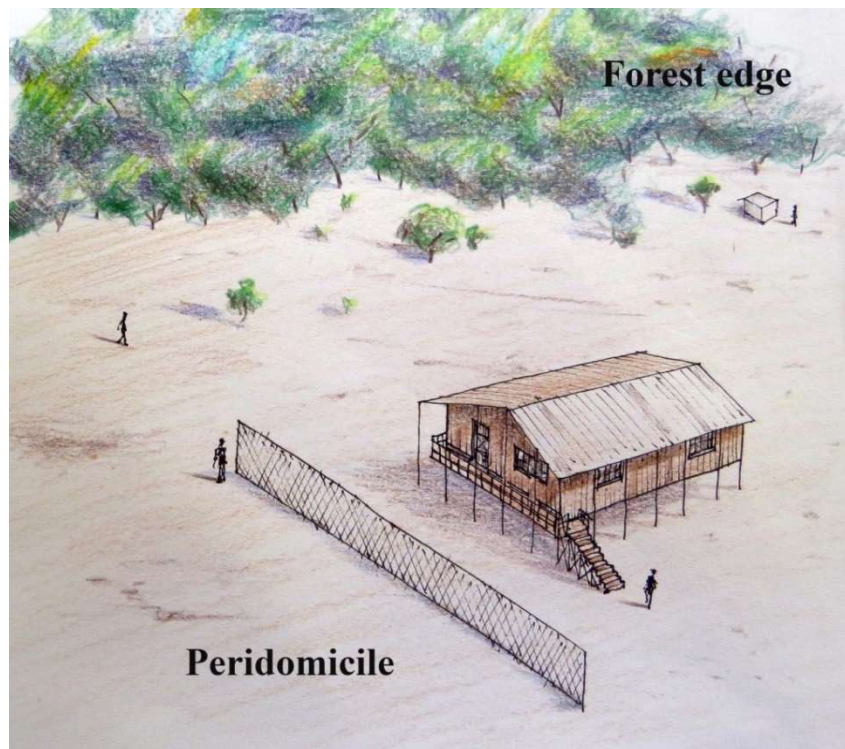


Figura 6 – Ilustração da armadilha para interceptação de mosquitos.



(Ilustração de Jardiel Sampaio de Oliveira. Permissão do artista para uso da imagem).

Após uma hora de captura, os mosquitos capturados foram sacrificados pela exposição a vapores de acetato de etila (C₄H₈O₂) e posteriormente acondicionados em potes de plásticos contendo sílica gel, até a identificação dos espécimes em nível de espécie. Todas as amostras foram separadas por horário, local e método de captura.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras entomológicas foram identificadas pela Prof^a. Maria Anice Mureb Sallum, separadas por Denise Cristina Sant’Ana. Após a identificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C ou em sílica gel, até o processamento das mesmas. Esta tese adotou a nomenclatura taxonômica proposta por FOSTER et al. (2017).

A identificação taxonômica foi realizada por caracteres morfológicos e, quando necessário, foi realizada a identificação molecular através da amplificação e sequenciamento da região *barcode* (658 pares de bases) do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), segundo método descrito em BOURKE et al. (2018). Para a identificação molecular, uma perna de cada mosquito foi macerada em 10 µL de solução 0,9% NaCl (Synth) com auxílio de um pistilo estéril. Em seguida, foram adicionados 10 µL de Chelex-100 5% (BioRad) e, após homogeneização, incubou-se a mistura a 99 °C por 10 min. Centrifugou-se por 5 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C. Para a amplificação da região *barcode* foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para cada reação, foram utilizados 2 µL do DNA extraído, 1X Tampão (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 200 mM dNTP (Amresco), 0,625 U Platinum® Taq DNApolymerase (Invitrogen), 0,1 µM de cada primer (LCO1490 5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’, HCO2198 5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’) (FOLMER et al., 1994) e água ultrapura até

o volume final de 25 μ L. As condições do termociclador consistiram em 94 °C por 3 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (1:5000) (BiotiumInc), visualizados em gel de agarose 1% e depois purificados com polietilenoglicol (20% polietilenoglicol 8 000/ 2,5 M NaCl). Para cada reação de sequenciamento foi utilizado 1 μ L do produto purificado, 0,5 μ L do mix Big Dye® Terminator v3.1 Ready (PE AppliedBiosystems), 1X Tampão de sequenciamento (PE AppliedBiosystems), 3,6 pmol do *primer* F (LCO1490) ou do *primer* R (HCO2198) e água ultrapura até o volume final de 10 μ L. Os produtos do sequenciamento foram purificados com resina Sephadex G50 (GE Healthcare) e a leitura das bases foi realizada no sequenciador AppliedBiosystems™ 3130 (PE AppliedBiosystems, Warrington, England). As sequências foram editadas no software Sequencher v. 5.2.4 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Para verificar a similaridade das sequências obtidas com as já depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizou-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

5 REFERÊNCIAS

ALONSO, D. P.; MANCINI, M. V.; DAMIANI, C.; CAPPELLI, A.; RICCI, I.; ALVAREZ, M. V. N.; BANDI, C.; RIBOLLA, P. E. M.; FAVIA, G. Genome reduction in the mosquito symbiont *Asaia*. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, p. 1–10, 2019.

BAIA-DA-SILVA, D. C.; BRITO-SOUSA, J. D.; RODOVALHO, S. R.; PETERKA, C.; MORESCO, G.; LAPOUBLE, O. M. M.; MELO, G. C.; SAMPAIO, V. S.; ALECRIM, M. G. C.; PIMENTA, P.; LIMA, J. B. P.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M. Current vector control challenges in the fight against malária in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52:e20180542, 2019.

BARATA, L. C. B.; ANDRIGUETTI, M. T. M.; MATOS, M. R. Surto de malária induzida entre usuários de drogas injetáveis. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 9–14, 1993.

BASCUÑÁN, P.; NIÑO-GARCIA, J. P.; GALEANO-CASTAÑEDA, Y.; SERRE, D.; CORREA, M. M. Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. **Microbiome**, v. 6, p. 1–12, 2018.

BAYOH, M. M.; LINDSAY, S. W. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 93, p. 375–381, 2003.

BOISSIÈRE, A.; TCHIOFF, M. T.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; NSANGO, S. E.; SHAHBAZKIA, H. R.; AWONO-AMBENE, P. H.; LEVASHINA, E. A.; CHRISTEN, R.; MORLAIS, I. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum*. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. 1–12, 2012.

BOURKE, B. P.; CONN, J. E.; OLIVEIRA, T. M. P.; CHAVES, L. S. M.; BERGO, E. S.; LAPORTA, G. Z.; SALLUM, M. A. M. Exploring malaria vector diversity on the Amazon Frontier. **Malaria Journal**, v. 17, p.1–17, 2018.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; ALVARENGA, D. A. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; ABREU, F. V. S.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; MITIS, M. C. S.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRITO, C. F. A.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malária caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Global Health**, v. 5, p. 1038–1046, 2017.

CASTRO, M. C.; MONTE-MÓR, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2452–2457, 2006.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. **Microbiology Reviews**, v. 57, n. 4, p. 953–994, 1993.

CHRISTIANSEN-JUCHT, C.; PARHAM, P. E.; SADDLER, A.; KOELLA, J. C.; BASÁÑEZ, M. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 2–10, 2014.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu; 2 ed., 2010.

CIRIMOTICH, C. M.; DONG, Y.; CLAYTON, A. M.; SANDIFORD, S. L.; SOUZA-NETO, J. A.; MULENGA, M.; DIMOPOULOS, G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 332, p. 855–858, 2011.

COUHET, A.; HARRIS, C.; ROBERT, V.; FONTENILLE, D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 130–136, 2010.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961–971, 2012.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; NETO, J. F. Studies on Transmission of Simian Malaria and on a Natural Infection of Man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 5, p. 805–808, 1966.

DENNISON, N. J.; JUPATANAKU, N.; DIMOPOULOS, G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. **Current Opinion in Insect Science**, v. 1, n. 3, p. 6–13, 2014.

DIEME, C.; ROTUREAU, B.; MITRI, C. Microbial Pre-exposure and Vectorial Competence of *Anopheles* Mosquitoes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7:508, p. 1–11, 2017.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. 1–10, 2009.

DURVASULA, R. V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R. B.; RICHARDS, F. F.; BEARD, C. B. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 3274–3278, 1997.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–229, 1994.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Editora da USP; v.2, 864p, 2002.

FOSTER, P. G.; OLIVEIRA, T. M. P.; BERGO, E. S.; CONN, J. E.; SANT'ANNA, D. C.; NAGAKI, S. S.; NIHEI, S.; LAMAS, C. E.; GONZÁLEZ, C.; MOREIRA, C. C.; SALLUM, M. A. M. Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes. **Royal Society Open Science**, v. 4, p. 1–20, 2017.

GARRETT-JONES, C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 30, p. 241–261, 1964.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama> (Acessado em 17 de junho, 2019).

KALAPPA, D. M.; SUBRAMANI, P. A.; BASAVANNA, S. K.; GHOSH, S. K.; SUNDARAMURTHY, V.; URAGAYALA, S.; TIWARI, S.; ANVIKAR, A.; VALECHA, N. Influence of midgut microbiota in *Anopheles stephensi* on *Plasmodium berghei* infections. **Malaria Journal**, v. 17, p. 1–8, 2018.

KWEKA, E.; KIMARO, E. E.; MUNGA, S. Effect of Deforestation and Land Use Changes on Mosquito Productivity and Development in Western Kenya Highlands: Implication for Malaria Risk. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 2016.

LALREMRUATA, A.; MAGRIS, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; KOEHLER, M.; ESEN, M.; KEMPAIAH, P.; JEYARAJ, S.; PERKINS, D. J.; MORDMÜLLER, B.; METZGER, W. G. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**, v. 2, p. 1186–1192, 2015.

LAPORTA, G. Z.; PRADO, P. I. K. L.; KRAENKEL, R. A.; COUTINHO, R. M.; SALLUM, M. A. M. Biodiversity Can Help Prevent Malaria Outbreaks in Tropical Forests. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–12, 2013.

- LEFÈVRE, T.; VANTAUX, A.; DABIRÉ, K. R.; MOULINE, K.; COHUET, A. Non-Genetic Determinants of Mosquito Competence for Malaria Parasites. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6: e1003365, 2013.
- LYON, B.; DINKU, T.; RAMAN, A.; THOMSON, M.C. Temperature suitability for malaria climbing the Ethiopian Highlands. **Environmental Research Letters**, v. 12, n. 6, p. 1–7, 2017.
- OLUPOT-OLUPOT, P.; EREGU, E. I. E.; NAIZULI, K.; IKIROR, J.; ACOM, L.; BURGOINE, K. Neonatal and congenital malaria: a case series in malaria endemic eastern Uganda. **Malaria Journal**, v. 17, n. 171, p. 1–5, 2018.
- OWUSU-OFORI, A. K.; PARRY, C.; BATES, I. Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from Sub-Saharan Africa. **Clinical Infection Diseases**, v. 51, p. 1192–1198, 2010.
- PATZ, J. A.; DASZAK, P.; TABOR, G. M.; AGUIRRE, A. A.; PEARL, M.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N. D.; KILPATRICK, A. M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.; BRADLEY, D. J. Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1092–1098, 2004.
- PATZ, J. A.; OLSON, S. H. Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5635–5636, 2006.
- ROMOLI, O.; GENDRIN, M. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and Plasmodium. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1–8, 2018.
- SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; KABARIA, C. W.; BURKOT, T. R.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 2–11, 2012.
- SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 644–661, 2014.
- SUTHERLAND, C. J.; TANOMSING, N.; NOLDER, D.; OGUIKE, M.; JENNISON, C.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; DO ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A.

P.; PINTO, J.; MICHON, P.; ESCALANTE, A. A.; NOSTEN, F.; BURKE, M.; LEE, R.; BLAZE, M.; OTTO, T. D.; BARNWEL, J. W.; PAIN, A.; WILLIAMS, J.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; SNOUNOU, G.; LOCKHART, P. J.; CHIODINI, P. L.; IMWONG, M.; POLLEY, S. D. Two non-recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **Journal Infection Diseases**, v. 201, p. 1544–1550, 2010.

TERENIUS, O.; OLIVEIRA, C. D.; PINHEIRO, W. D.; TADEI, W. P.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. 16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 172–175, 2008.

VITTOR, A. Y.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; LOZANO, W. S.; PINEDO-CANCINO, V.; PATZ, J. A. The Effect of Deforestation on the Human-biting Rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *falciparum* Malaria in the Peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 3–11, 2006.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 172–173, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> (Accessed on January 27, 2019).

WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1–9, 2015.

CAPÍTULO 1

Paisagem e mosquitos vetores de *Plasmodium* spp. em áreas rurais e periurbanas
da Amazônia brasileira

1 INTRODUÇÃO

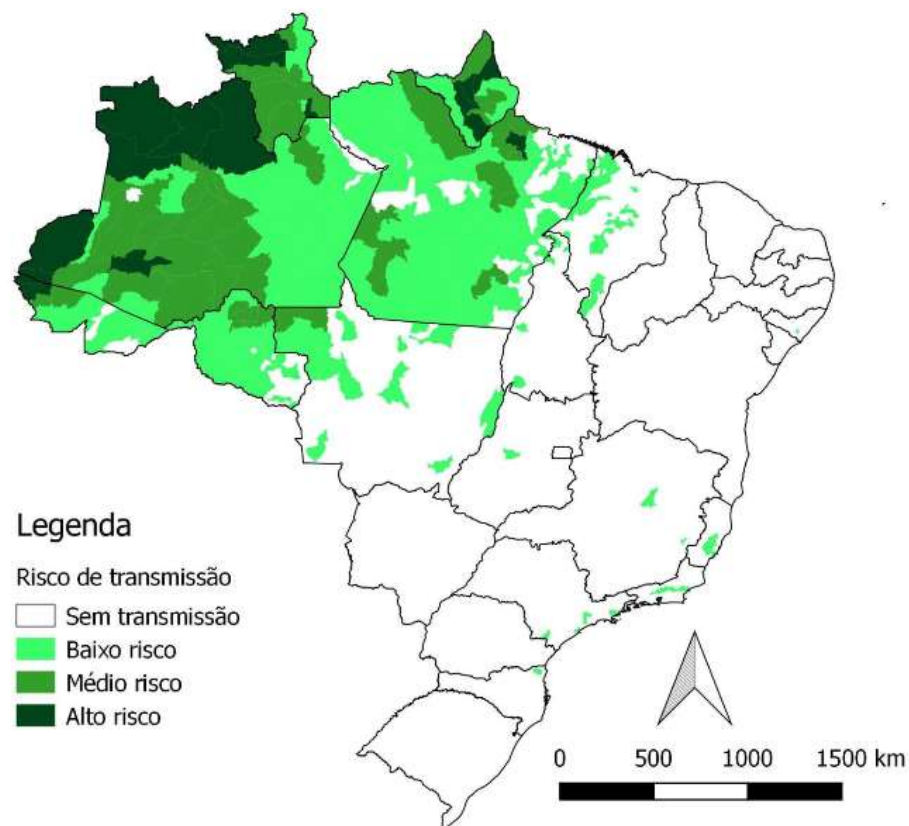
1.1 MALÁRIA NO BRASIL

O primeiro registro de malária no Brasil ocorreu em 1587 e foi identificado como febre terçã e quartã em índios da etnia Tupinambá (Deane, 1986 apud GRIFFING et al., 2015, p. 701). No início do século XX, a malária estava presente em grande parte do território brasileiro. Seis milhões de casos da doença por ano foram estimados neste período. Durante a construção da Ferrovia Madeira-Mamoré em Rondônia, estima-se que dez mil pessoas morreram por causa da malária (GRIFFING et al., 2015). A doença também foi um grave problema de saúde pública nos Estados do Rio de Janeiro, principalmente na região da Baixada Fluminense (HOCHMAN et al., 2002; PINA-COSTA et al., 2014), e em Santa Catarina (OLIVEIRA, 2011). No final da década de 1930, por meio do tráfego marítimo entre as cidades de Dakar e Natal, *Anopheles arabiensis* foi introduzido no nordeste brasileiro (PARMAKELIS et al., 2008). A epidemia da malária no Nordeste, proveniente da disseminação de *An. arabiensis*, ocorreu principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, ocasionando 14 mil mortes em 8 meses (1938-1939) (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A erradicação de *An. arabiensis* no Nordeste foi realizada por meio de esforços brasileiros e americanos e ocorreu em menos de dois anos após a introdução do mosquito. Após 1950, a campanha nacional de erradicação da malária foi bem-sucedida e em 1960, o número de casos da doença diminuiu para aproximadamente 40 mil, sendo a maior parte dos casos concentrada na Região Amazônica. Devido aos incentivos governamentais dos programas de colonização, construção de rodovias e expansão de áreas de garimpo, após 1970, a Região Amazônica recebeu um grande fluxo migratório. O número de casos aumentou nos anos seguintes e em 1999 foram registrados aproximadamente 630 mil no país

(PEREIRA-DA-SILVA e OLIVEIRA, 2002). Migrações humanas, desmatamentos, mineração e exploração de madeira realizada de forma inadequada contribuíram para a manutenção e elevação da incidência de malária na região (SAMPAIO et al., 2015).

Em 2017, foram registrados 189.503 casos de malária no país, sendo 90% devido à infecção por *Plasmodium vivax* e 10% por *Plasmodium falciparum* (WHO, 2018). A maior parte dos casos de malária no Brasil (99,5%) e os maiores valores de Índice Parasitário Anual do país (IPA – número de lâminas positivas ao ano por mil habitantes) ocorrem na Região Amazônica (Figura) (TAUIL e DANIEL-RIBEIRO, 1998; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; FERREIRA e CASTRO, 2016).

Figura – Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, ano 2018.



Extraído de: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS.

(<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/10/IPA-2018.pdf>, acessado em 10 de julho de 2019).

Um conjunto de fatores contribui para que a Região Amazônica seja endêmica para a malária. Dentre estes fatores estão: ambiente propício ao desenvolvimento do mosquito, como altas temperaturas, umidade elevada e baixa altitude; infraestrutura inadequada durante intervenções humanas, como construções de rodovias e hidrelétricas; desmatamentos e precária vigilância epidemiológica e entomológica (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Casos autóctones de malária também ocorrem fora dos limites da Amazônia Legal, principalmente na região sudeste do Estado de São Paulo (MARRELLI et al., 2007; DUARTE et al., 2013; NEVES et al., 2013). Recentemente foi registrado um surto de malária humana causada por *Plasmodium simium* em região de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, tornando essa área um foco de malária zoonótica (BRASIL et al., 2017; GRIGG e SNOUNOU, 2017).

Três são os sistemas de transmissão do *Plasmodium* no Brasil, segundo CARLOS et al. (2019). O primeiro sistema está relacionado à floresta Amazônica. *Nyssorhynchus darlingi* é considerado o vetor primário e *Nyssorhynchus braziliensis*, *Nyssorhynchus nuneztovari* s.l., *Nyssorhynchus oswaldoi* s.l. e *Nyssorhynchus triannulatus* s.l. atuam como vetores secundários, presentes na maioria dos estados da Amazônia. O segundo é o sistema de transmissão da Mata Atlântica. Neste, *Kerteszia bellator* e *Kerteszia cruzii* são considerados os principais vetores. Uma característica deste sistema é o fato dos vetores utilizarem a água retida em bromélias como habitat larval. O terceiro sistema se sobrepõe à costa brasileira, principalmente no nordeste e sudeste, e tem como vetor *Nyssorhynchus aquasalis*.

1.2 MALÁRIA DE FRONTEIRA

Malária de fronteira é o termo utilizado para a transmissão do *Plasmodium* que ocorre em assentamentos na Amazônia e é resultado de um processo que envolve fatores biológicos, ecológicos, comportamentais e socioeconômicos (Sawyer, 1988 apud SILVA-NUNES et al.,

2008, p. 632; CASTRO e SINGER, 2007). A malária de fronteira é conhecida por apresentar uma evolução temporal, caracterizada por três etapas. A primeira etapa (epidêmica) está relacionada com a alta incidência da malária e com a baixa cobertura de controle da doença. Nesta fase, o elevado número de casos é resultado de um conjunto de fatores: uso da terra (agricultura, pecuária, garimpo), baixa imunidade dos novos assentados, condições precárias de moradia, falta de acesso aos serviços de saúde, formação de novos criadouros para *Ny. darlingi* e constante exposição ao vetor. No início do assentamento, o desmatamento é a principal atividade desenvolvida pelos colonos. Em geral, o processo de preparação da terra para cultivo na Amazônia é feito com o corte e a queima das árvores. A qualidade da queima depende dos recursos financeiros e incentivos de crédito que os colonos têm disponível e muitas vezes é realizada queima pobre, acarretando a permanência de árvores altas e mudança nas concentrações dos elementos químicos presentes no solo (SAWYER, 1986; SINGER e CASTRO, 2001). O desmatamento propicia a formação de coleções de água, a diminuição da biodiversidade da fauna e flora e o aumento da luminosidade, favorecendo a criação de novos habitats larvais e conseqüentemente, a proliferação de mosquitos vetores, especialmente de *Ny. darlingi* (VITTOR et al., 2009; BARROS e HONÓRIO, 2015). A baixa imunidade dos novos colonos para a malária associada à abundância do mosquito vetor, constante exposição homem-vetor em áreas de desmatamento e intensa mobilidade de colonos assintomáticos entre os assentamentos, os quais favorecem a dispersão do parasito, acarretam a alta incidência da malária (SILVA-NUNES, 2010). A segunda etapa (transição) é marcada pela diminuição da incidência da malária devido às melhores condições socioeconômicas. A última etapa (endêmica) ocorre após 6-8 anos de assentamento e é caracterizada por um cenário estável, com baixo número de casos de malária, melhores moradias e urbanização (CASTRO et al., 2006; SILVA-NUNES et al., 2008). Nesta etapa, um conjunto de fatores favorece a diminuição da exposição do homem ao vetor, como: moradias mais distantes da

borda da mata, devido ao processo de expansão da fronteira agrícola; melhores moradias, o que favorece a eficiência da pulverização intradomiciliar e conseqüentemente, o controle do mosquito; acesso ao serviço de saúde.

O conceito de malária de fronteira (Sawyer, 1988 apud CASTRO et al., 2006, p. 2452) foi expandido em 3 níveis hierárquicos por CASTRO et al. (2006). O primeiro nível se refere a uma escala individual tendo como fatores de risco: alta densidade de *Ny. darlingi*, como resultado de mudanças ambientais que favorecem a proliferação de habitats larvais; alta morbidade e baixa mortalidade; baixa imunidade dos assentados; intensa exposição humana ao vetor, devido ao conhecimento limitado sobre a transmissão da doença; habitação de baixa qualidade, o que torna ineficaz a pulverização intradomiciliar; deficiente serviço de saúde. O segundo nível representa a comunidade. A malária de fronteira é definida por frágeis instituições privadas e governamentais e alta mobilidade populacional. O terceiro nível é o estadual e nacional, em que a malária de fronteira é caracterizada por novas áreas de assentamento sem um planejamento apropriado.

Apesar de o modelo de malária de fronteira representar uma relação temporal entre o tempo de colonização e a incidência de casos de malária, ILACQUA et al. (2018) verificaram que os maiores valores de IPA (2015-2016) ocorreram em assentamentos rurais com mais de 10 anos de colonização e propõem um modelo alternativo, baseado no modelo de franja florestal (BARROS et al., 2011a; BARROS e HONÓRIO, 2015). Neste modelo, ILACQUA et al. (2018) sugerem que as variáveis da paisagem (ex. fragmentação florestal) conduzem a dinâmica de transmissão da malária e, portanto, a prevenção desta doença seria possível com base nos limiares da paisagem.

1.3 MALÁRIA EM ÁREA DE FRANJA FLORESTAL

Modelo de transmissão do *Plasmodium* em áreas de franjas florestais para explicar a incidência da malária em assentamentos agrícolas da Amazônia foi proposto por BARROS e HONÓRIO (2015). Segundo o modelo proposto, o surgimento de áreas de franjas florestais, devido aos desmatamentos, aumenta o número de criadouros e conseqüentemente de larvas. A presença de humanos nessas áreas aumenta a disponibilidade do repasto sanguíneo nestes vertebrados. Um número maior de picadas favorece a oviposição e, conseqüentemente, um aumento do risco da malária para esses habitantes. Colonos alocados em áreas desflorestadas não são afetados. Assim, a emergência da malária é mais provável em áreas de paisagens fragmentadas com ações antropogênicas.

Modelo de transmissão do *Plasmodium* em assentamentos da Região Amazônica difere de modelos epidemiológicos da malária ribeirinha ou urbana. Nos assentamentos, os casos de malária estão agrupados próximos aos habitats larvais de *Ny. darlingi*. A maior incidência da malária ocorre entre colonos, cuja habitação está a menos de 700 m dos criadouros. Durante a estação seca, há maior número de casos de malária em áreas próximas a rios temporários. Já na estação chuvosa, o número de casos da doença é menor, provavelmente devido ao forte fluxo de corrente e variações nos níveis da água que interferem no desenvolvimento das larvas nos criadouros. A sazonalidade da doença pode ser alterada caso o assentamento esteja localizado próximo a barragens, os quais atuam como habitat permanente para o desenvolvimento das fases iniciais de vida dos vetores. A malária ribeirinha apresenta maior número de casos na estação chuvosa, pois a elevação dos níveis dos rios proporciona o alagamento de regiões florestadas, criando condições para o desenvolvimento larval e conseqüentemente aumentando a densidade de mosquitos *Ny. darlingi* (BARROS et al., 2011b).

1.4 FATORES AMBIENTAIS E MALÁRIA

A epidemiologia da malária é altamente influenciada por fatores ambientais (temperatura, precipitação pluvial), socioeconômicos (habitações, migrações, atividade econômica) e biológicos (imunidade do hospedeiro, ciclo de vida do vetor, agente etiológico) (FLAHAULT et al., 2016; ROSSATI et al., 2016). Temperatura, precipitação pluvial e umidade são fatores que interferem no desenvolvimento do mosquito vetor. Temperaturas altas (acima de 34 °C) ou baixas (abaixo de 16 °C) prejudicam o desenvolvimento larval de *An. gambiae* s.s., acarretando na não emersão do mosquito adulto. Temperaturas amenas (22 °C a 30 °C) favorecem as fases imaturas do vetor, diminuindo o período do ciclo aquático e consequentemente, acarretando número maior de mosquitos em determinado período de tempo (GITHEKO et al., 2000; BAYOH e LINDSAY, 2003). Este intervalo de temperatura também favorece o aumento da longevidade do mosquito adulto e o número de repastos sanguíneos (GITHEKO et al., 2000; CHRISTIANSEN-JUCHT et al., 2014). A temperatura também pode modular o desenvolvimento do parasito no vetor por meio da diminuição do período de incubação extrínseco (GITHEKO et al., 2000; BAYOH e LINDSAY, 2003). A precipitação pluvial e a umidade podem afetar os parâmetros entomológicos de transmissão, com a criação de novos criadouros e longevidade dos mosquitos (WOLFARTH-COUTO et al., 2019).

Alterações na dinâmica de transmissão da malária podem ser provocadas por mudanças ambientais resultantes de ações antrópicas. Desmatamentos na Região Amazônica brasileira são considerados fator de risco para malária, principalmente quando ocorre em áreas menores que 5 km². Cada km² de floresta desmatada nesta região foi acompanhado de um aumento de vinte e sete casos de malária entre 2009-2015 (CHAVES et al., 2018). Alterações microclimáticas e ambientais provocadas pelo desmatamento influenciam a biologia dos mosquitos vetores, alterando a duração do ciclo gonotrófico, a reprodução e sobrevivência dos

adultos, a capacidade e densidade vetora e a sua distribuição (YASUOKA e LEVINS, 2007; KWEKA et al., 2016). Alterações na cobertura do solo e desmatamentos estão associados à emergência de criadouros de *Ny. darlingi* em regiões da Amazônia (VITTOR et al., 2009).

Mosquitos transmissores do *Plasmodium* são anautógenos e, portanto, necessitam de sangue para completar o desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos. Fêmeas de *Ny. darlingi* necessitam mais de um repasto sanguíneo para completar o primeiro ciclo gonotrófico, tendo como preferência humanos a outras fontes (OLIVEIRA et al., 2012). As taxas de picada humana variam conforme a espécie vetor, estação seca/chuvosa, horário e paridade das fêmeas (VITTOR et al., 2006; BARROS et al., 2007). A associação positiva entre a taxa de picada humana de *Ny. darlingi* e o grau de desmatamento da Amazônia Peruana, sugere que esta associação pode estar relacionada a preferência do vetor por paisagens com crescimento secundário e arbustos (VITTOR et al., 2006). A taxa de picada humana também pode ser alterada pela infecção por *Plasmodium. Anopheles gambiae*, quando infectado com o protozoário, apresenta maior número de repastos sanguíneos do que quando não infectado, permitindo de forma mais rápida, a transmissão do parasito entre os hospedeiros humanos (KOELLA et al., 1998).

1.5 VETORES DE *Plasmodium* NA REGIÃO AMAZÔNICA

O número de espécies da subfamília Anophelinae presente na Região Amazônica ainda é subestimado. Recentemente, através de sequências da região *barcode* do gene citocromo *c* oxidase subunidade I, BOURKE et al. (2018) identificaram a presença de 23 a 27 potenciais espécies em áreas endêmicas para a malária na Região Amazônica brasileira, sendo 13 espécies, provavelmente, desconhecidas da ciência.

Dentre as espécies e complexos de espécies encontradas, naturalmente, infectadas na Amazônia brasileira estão *Ny. darlingi*, *Ny. braziliensis*, *Ny. albitarsis* s.l., *Ny. triannulatus*,

Nyssorhynchus oswaldoi s.l., *Nyssorhynchus rangeli*, *Ny. triannulatus* s.l., *Anopheles matogrossensis* e *Anopheles peryassui* (TADEI e DUTARY THATCHER, 2000; CONN et al., 2002; PÓVOA et al., 2006). *Nyssorhynchus darlingi*, *Nyssorhynchus albirtarsis* s.l. e *Nyssorhynchus aquasalis* são considerados os principais vetores de *Plasmodium* na Região Amazônica brasileira (PIMENTA et al., 2015).

1.5.1 *Nyssorhynchus darlingi*

Nyssorhynchus darlingi é altamente antropofílica e com plasticidade para a atividade hemofágica, podendo alterar de endofagia a exofagia e endofilia a exofilia, dependendo da região, estação do ano, e disponibilidade de hospedeiros vertebrados (MORENO et al., 2017; PRUSSING et al., 2018). Possui padrão bimodal de atividade hematofágica, com um pico ao anoitecer e outro ao amanhecer (TADEI e DUTARY THATCHER, 2000). Esta espécie é dependente de regiões florestadas para sobrevivência (formas imaturas e adulto). Fases imaturas de *Ny. darlingi* se desenvolvem em coleções de água com fluxo lento, parcialmente sombreadas, ricas em matéria orgânica e detritos flutuantes (SINKA et al., 2010). A floresta Amazônica primária não fornece condições ideais para habitat larval de *Ny. darlingi*, pois coleções de água possuem elevada acidez e não são parcialmente sombreadas (SINGER e CASTRO, 2001; HIWAT e BRETAS, 2011). Desmatamentos na floresta Amazônica favorecem o surgimento de criadouros para *Ny. darlingi* e, associados a presença humana, criam um ambiente favorável ao desenvolvimento do vetor (HIWAT e BRETAS, 2011). O grau de degradação florestal e tempo de ocupação influenciam na abundância de *Ny. darlingi*, sendo este encontrado em maior densidade em áreas recém ocupadas (TADEI et al., 1998; MOUTINHO et al., 2011).

Em assentamentos agrícolas da Amazônia brasileira em Roraima, larvas de *Ny. darlingi* foram frequentes em coleções hídricas localizadas em franjas florestais (BARROS e

HONÓRIO, 2015), regiões onde a transmissão do *Plasmodium* é mais intensa (SILVA-NUNES et al., 2008). Três fatores determinam a distribuição de *Ny. darlingi* em franjas florestais: disponibilidade de humanos, disponibilidade de coleções de água e preferência por coleções de água parcialmente sombreadas (BARROS et al., 2011a).

1.5.2 *Nyssorhynchus albitarsis* s.l.

Nyssorhynchus albitarsis s.s., *Nyssorhynchus deaneorum*, *Nyssorhynchus janconnae*, *Nyssorhynchus marajoara*, *Nyssorhynchus oryzalimnetes*, *Nyssorhynchus albitarsis* F, *Nyssorhynchus albitarsis* G e *Nyssorhynchus albitarsis* I fazem parte do Grupo Albitarsis (FOLEY et al., 2014). Algumas dessas espécies foram reportadas como participantes da dinâmica de transmissão da malária na América do Sul. *Nyssorhynchus marajoara* é considerado vetor primário em áreas do estado do Amapá (CONN et al., 2002). *Nyssorhynchus janconnae* atua como vetor primário no distrito de Boa Vista (RR) (PÓVOA et al., 2006). Espécimes de campo de *Nyssorhynchus deaneorum* foram encontrados infectados com *P. vivax* e *P. falciparum* em regiões do estado do Acre (BRANQUINHO et al., 1993).

1.5.3 *Nyssorhynchus aquasalis*

É o principal vetor em regiões litorâneas do Brasil (CARLOS et al., 2019). As formas imaturas desta espécie se desenvolvem em águas insalobras e mosquitos adultos podem apresentar comportamento alimentar zoofílico ou antropofílico, dependendo da região (DEANE et al., 1949; CARLOS et al., 2019).

2 OBJETIVOS

- Relatar quais espécies de anofelíneos estão infectadas com *Plasmodium* spp.;
- Identificar quais espécies de *Plasmodium* estão presentes nos mosquitos;
- Estabelecer correlação entre métricas de paisagem e as seguintes variáveis: taxa de picada humana, incidência acumulada de malária, número de *Ny. darlingi* capturado e taxa de positividade dos mosquitos;
- Averiguar se algum intervalo de captura apresenta maior quantidade de *Ny. darlingi* e de mosquitos infectados;
- Verificar se há associação entre presença/ausência de mosquitos infectados com métricas de paisagem e casos de malária.

3 METODOLOGIA

3.1 CAPTURA DE MOSQUITOS

Mosquitos foram capturados nos municípios de Acrelândia, Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Lábrea, Pacajá, Itacoatiara e Machadinho D'Oeste, segundo metodologia descrita no item 4.1 da página 27 desta tese.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Cada anofelíneo fêmea capturado foi bissecionado em cabeça/tórax e abdômen, conforme proposto por FOLEY et al. (2012). O DNA genômico de cabeça mais tórax foi

extraído de cada anofelíneo fêmea conforme descrito em LAPORTA et al. (2015), salvo algumas modificações. Cada cabeça/tórax foi macerada em 500 µL de tampão TEN (2 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 5 mM NaCl) com pérolas de zircônio/sílica 1 mm (Biospec). A solução foi homogeneizada no equipamento BeadBlaster24 (Benchmark) durante 4 ciclos de 40 seg de agitação (4 m/s) e 20 seg de descanso. Ao sobrenadante, adicionou-se 5 µL de SDS 10% (Promega) e 3 µL de proteinase K a 20 mg/mL (Promega). Homogeneizou-se por inversão e incubou-se a 56 °C por 1 h. Foram adicionados 150 µL de NaCl 5 M (Synth) e agitou-se a solução vigorosamente por 15 seg. A mistura foi centrifugada a 20 °C por 10 min a 13000 rpm. Foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado (Synth) ao sobrenadante e homogeneizou-se a mistura por inversão. Incubou-se a solução por 48 h a -20 °C e depois a centrifugou por 10 min a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão e 1 mL de etanol 70% (Synth) foi adicionado ao precipitado. Homogeneizou-se por inversão e a solução foi centrifugada a 20 °C por 5 min a 13000 rpm. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais três vezes. Na última lavagem, descartou-se o sobrenadante e para evaporação completa do etanol, o microtubo foi inserido no concentrador a vácuo (Concentrator 5301 – Eppendorf) por 10 min a temperatura ambiente. Adicionou-se 20 µL do tampão TE (2 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA) ao precipitado e o produto da extração foi acondicionado a -80 °C.

O DNA extraído foi quantificado por fluorescência utilizando o fluorímetro Qubit (Life Technologies) e o kit QubitTMds DNA HS Assay (Life Technologies), conforme instruções do fabricante.

3.3 VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE

Para verificar a presença do protozoário *Plasmodium* spp. nos mosquitos fêmeas, foi realizada a técnica de PCR em tempo real, seguida da tipagem por *High Resolution Melting*

(HRM) das amostras positivas. O fragmento alvo correspondeu a uma região do gene ribossomal 18S.

Antes dos ensaios de detecção qualitativa do parasito, foi realizada a validação do protocolo de PCR em tempo real através da matriz de *primers* e da curva de eficiência da reação. Para a geração da matriz, três concentrações diferentes (100 nM, 300 nM e 500 nM) dos *primers* 1459-M13(5' TGTAACGACGGCCAGTCTGGTTAATTCCGATAAC 3') e 1706-M13 (5' CAGGAAACAGCTATGACCTAACTTCCTTGTGTTAGAC 3') (KIPANGA et al., 2014) foram combinadas. Assim, para cada reação foram utilizados 1X MeltDoctor™ HRM Master Mix (ThermoFisherScientific), 10 ng de DNA de plasmódio, uma das combinações de *primers* citada acima e água ultrapura até o volume final de 20 µL. Todas as reações foram feitas em triplicatas.

A combinação de *primers* que apresentou maior rendimento (menor valor de CT), maior fluorescência (maior delta-Rn) e não apresentou formação de dímeros foi a utilizada no ensaio da curva de eficiência. Este ensaio foi realizado para avaliar a eficiência de amplificação da reação. Assim, para obtenção da curva de eficiência foram realizadas, em triplicata, reações com diluições seriadas de 1:10 do fragmento alvo. O número de cópias do fragmento alvo foi obtido considerando os parâmetros de peso molecular médio de 1 par de base (pb) igual a 649 g/mol e 1 mol igual a $6,022 \times 10^{23}$ moléculas.

3.4 ENSAIOS DE DETECÇÃO DE *Plasmodium*

DNA genômico extraído a partir da cabeça/tórax do mosquito foi utilizado para os ensaios de detecção do plasmódio. As amostras foram testadas em *pools* de 3 indivíduos. Cada *pool* foi composto por 10 ng do DNA genômico de cada espécime, totalizando 30 ng. As amostras pertencentes aos *pools* positivos para plasmódio foram testadas individualmente, utilizando 10 ng de DNA. Para cada reação foram utilizados 1X MeltDoctor™ HRM Master

Mix (ThermoFisherScientific), 30 ng (*pool*) ou 10 ng (individual) de DNA genômico, 500 nM do primer *forward* (1459-M13), 500 nM do primer *reverse* (1706-M13) e água ultrapura até o volume final de 20 µL. Para todos os ensaios de detecção foram utilizados DNA genômico de *P. vivax* e *P. falciparum* como controles positivos e água para o controle negativo. Ensaio com DNA genômico de anofelíneo não infectado e criado em laboratório foram realizados para testar amplificações inespecíficas.

Todos os ensaios acima foram realizados no equipamento StepOnePlus (AppliedBiosystems) nas seguintes condições 50 °C por 2 min, desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguidos por 50 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min e análise de HRM (60 °C a 95 °C com aumento de temperatura de 0,3%). As análises dos ensaios foram realizadas nos softwares StepOnePlus™ Software v2.3 e High ResolutionMelt (HRM) Software v3.0.1.

3.5 OBTENÇÃO DAS MÉTRICAS DE PAISAGEM

Imagens de satélite Sentinel 2A com resolução espacial de 10 metros foram obtidas na Agência Espacial Europeia (ESA - *European Space Agency*). As imagens escolhidas foram aquelas que apresentaram a menor porcentagem de nuvens e que a data de obtenção foi a mais próxima possível da data de captura dos mosquitos.

Baseada na porcentagem de cobertura florestal, uma análise multiescalar foi realizada para delimitar a extensão da paisagem a ser considerada. As paisagens foram delimitadas em formato circular e para cada ponto de captura foram obtidas 10 paisagens, com raios variando de 100 a 1000 metros. O centro desses raios, para cada ponto de captura, corresponde ao local do peridomicílio onde foi realizada a captura por atração humana.

Foi projetada uma rede de drenagem a partir de imagens de satélite e modelos de elevações digitais de terreno. Essa rede foi utilizada para obter a distância dos pontos de capturas (por atração humana) às coleções de água mais próxima (DIS DRE).

As métricas de porcentagem de cobertura florestal da paisagem (CF) e densidade de bordas de fragmentos (DB) foram obtidas. A métrica CF foi calculada pela fórmula:

$$CF = P_i = \frac{\sum_{j=i}^a a_{ij}}{A} (100)$$

Onde P_i corresponde a proporção de cobertura florestal do ponto de captura i , onde $i=1, \dots, 42$, a_{ij} refere-se à área de cada mancha de cobertura florestal ij , onde $j=1, \dots, n$, sendo n o número de manchas florestais no ponto de captura i ; e A corresponde à área total da paisagem em questão.

Para o cálculo da métrica DB foi utilizado a fórmula:

$$DB = \frac{\sum_{k=1}^m e_{ik}}{A} (10000)$$

Onde e_{ik} é o comprimento total da borda que envolve cada mancha k de cobertura florestal da paisagem i , sendo que $k=1, \dots, m$ e m é o número de manchas florestais no ponto de captura i ; e A refere-se à área total da paisagem em questão.

Para este estudo, as métricas de paisagem utilizadas foram as obtidas a partir da paisagem presente no raio de 1 km.

3.6 NÚMERO DE CASOS DE MALÁRIA

Através do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP – Malária), foram obtidos os dados da população e o número de casos de malária das localidades de captura. Número de casos de malária corresponde aos casos notificados no mês de captura de mosquitos e o que antecede a ele.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.7.1 Coeficiente de correlação de Spearman

Como os dados não apresentam distribuição normal, o coeficiente de correlação Spearman (SPEARMAN, 1904), não paramétrico, foi utilizado para verificar a correlação entre as variáveis: taxa de picada humana, número de *Ny. darlingi* capturado, taxa de positividade dos mosquitos e entre os indicadores de paisagem CF, DB e DIS DRE. Também foi averiguada a correlação entre incidência acumulada de malária e os indicadores de paisagem CF e DB. Neste estudo, a taxa de picada humana foi considerada equivalente à taxa de pouso do mosquito na atração humana, já que foi assumido que pouso se deu pela procura de alimento (sangue humano). Assim, a taxa de picada humana é o número de *Ny. darlingi* capturado por atração humana por coletor por noite, para cada ponto. Incidência acumulada de malária refere-se ao período de dois meses e corresponde ao número de casos notificados de malária de cada localidade no mês da captura de mosquitos e no anterior a ele / população da localidade x 1000 habitantes. Número de *Ny. darlingi* capturado corresponde ao total capturado desta espécie por meio de rede e atração humana em cada ponto, em peridomicílio. Taxa de positividade dos mosquitos refere-se ao número de mosquitos infectados de cada ponto / total de anofelíneos capturados em cada ponto x 100. Para as correlações, foram

utilizados os dados das capturas de 6 horas (18 h00 – 24 h00) realizadas no peridomicílio dos 42 pontos. As análises foram realizadas no software STATA/ IC 15.1 (STATA CORP., 2017).

3.7.2 Regressão binomial negativa

Análises de regressão foram realizadas com o intuito de verificar se houve diferença no número de *Ny. darlingi* capturado em peridomicílio e no número de mosquitos infectados durante intervalos de captura (18 h00 – 21 h00; 21 h00 – 0 h00; 0 h00 – 3 h00; 3 h00 – 6 h00). Como os dados das variáveis dependentes apresentaram sobredispersão, foi utilizada a regressão binomial negativa ao invés da regressão de Poisson. Dados das capturas de 12 horas (18 h00 – 6 h00) realizadas no peridomicílio foram utilizados para as análises. As análises foram realizadas no software Stata/IC 15.1 (STATA CORP., 2017).

3.7.3 Regressão logística binária

Análise de regressão logística binária foi realizada para verificar se a presença/ausência de mosquitos infectados pode estar associada às métricas de paisagem (CF, DB e DIS DRE) e casos de malária. Os dados utilizados foram provenientes das capturas de 6 horas (18 h00 – 0 h00) realizadas no peridomicílio de 40 pontos de captura. O software Stata/IC 15.1 (STATA CORP., 2017) foi utilizado para esta análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MANUSCRITO 1

Human malaria vectors in rural and periurban areas of the Brazilian Amazon

Tatiane M. P. de Oliveira¹, Eduardo S. Bergo², Gabriel Z. Laporta³, Leonardo S. M. Chaves¹,
Jan E. Conn^{4,5}, José Leopoldo F. Antunes¹, Maria Anice Mureb Sallum¹.

Em preparação. Manuscrito será submetido para publicação.

Human malaria vectors in rural and periurban areas of the Brazilian Amazon

Tatiane M. P. de Oliveira^{1#}, Eduardo S. Bergo², Gabriel Z. Laporta³, Leonardo S. M. Chaves¹,
Jan E. Conn^{4,5}, José Leopoldo F. Antunes¹, Maria AniceMureb Sallum^{1&}.

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

² Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Araraquara-SP, BR.

³ Setor de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, BR.

⁴ Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, NY, USA.

⁵ Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York, Albany, NY, USA.

#Corresponding author: porangaba@usp.br

& Senior author

Author's email:

Tatiane P. M. Oliveira: porangaba@usp.br

Eduardo S. Bergo: edusteber@uol.com.br

Leonardo S. M. Chaves: leonardosuweges@usp.br

Gabriel Z. Laporta: gabriel.laporta@fmabc.br

Jan E. Conn: jan.conn@health.ny.gov

José Leopoldo F. Antunes: leopoldo@usp.br

Maria A. M. Sallum: masallum@usp.br

Abstract

Background: Areas of rural settlements in the Amazon region are impacted by environmental changes due to continuous deforestation. Anthropogenic alterations in the natural forest landscape can cause habitat loss and fragmentation, leading to ecological changes that can alter the behavior, species composition and spatio-temporal distribution of mosquitoes, including Anophelinae. The complex dynamics of ecological changes linked to deforestation leads to the increase in the abundance and dominance of the vector species, increasing the risk of malaria, especially in peridomestic areas.

Methods: A cross-sectional study was carried out in rural and periurban areas in the Brazilian Amazon. The field localities show different percentages of forest cover (8% and 93%) and they are endemic for malaria. Mosquito field-collections were carried out in the peridomestic and forest edge environments of 42 locations in seven municipalities of three Brazilian Amazon states. Anophelinae females were tested for *Plasmodium* using real-time PCR. Non-parametric correlation test was used to establish associations between forest cover (FC), and edge density (ED) metrics with cumulative incidence of malaria and between FC, ED, and distance (DW) metrics with number of *Nyssorhynchus darlingi*, anopheline positivity rate, and human biting rate (HBR). Negative binomial regression was used to verify if some collection interval had a higher number of infected mosquitoes and greater number of *Ny. darlingi*. Binary logistic regression was used to establish association between the presence / absence of infected mosquitoes with malaria cases and FC, ED, and DW metrics.

Results: Forty-one species of the subfamily Anophelinae were collected. *Nyssorhynchus darlingi* was the most abundant species in the peridomicile environment. Ninety-one mosquitoes were infected with *Plasmodium*, 69 with *P. vivax*, 20 with *P. falciparum* and 2 with mixed infection (*P. vivax* and *P. falciparum*). *Nyssorhynchus darlingi*, *Nyssorhynchus rangeli*, *Nyssorhynchus benarrochi* B and *Ny. konderi* B were found naturally infected.

Positive correlations were established between cumulative incidence of malaria with ED metric, number of *Ny. darlingi*, and HBR. Increase of FC has negative correlation with HBR. In the 12-hour collections, the highest number of infected mosquitoes was found from 0 h:00 until 3 h:00 and the highest number of *Ny. darlingi* collected was between 18 h:00 and 21 h:00. There was no association in the results of the binary logistic regression.

Conclusions: Results of the study confirm that landscape changes caused by human actions and associated with human presence creates ecological conditions that favor the occurrence of Anophelinae vectors of *Plasmodium* in the peridomestic environment. The finding of a greater number of mosquitoes infected was between 0 h:00 and 3 h:00 reinforces the importance of the use of mosquito nets impregnated with insecticide. *Nysorhynchus darlingi*, *Ny. rangeli*, *Ny. benarrochi* B and *Ny. konderi* B was found naturally infected and may play a role in the malaria transmission cycle in rural and periurban areas across the Brazilian Amazon. Further studies are needed to verify potential factors that can be altering the bimodal pattern of activity of *Ny. darlingi* in the regions of Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul and Acrelândia.

Introduction

In 2017, an estimated 219 million malaria cases occurred worldwide, with 435,000 deaths (WHO, 2018). In the Brazilian Amazon Region, after six years of success in decreasing malaria transmission, the incidence of the disease increased from 117,832 in 2016 (Jan-Nov) to 174,522 in 2017 (Jan-Nov) (PAHO, 2018). In 2018, reported cases of malaria began to decline, but even with this reduction of cases, the period from January to June 2018, presented 31% more cases than the same period in the previous year. Between July and December 2018, the number of malaria cases was 18% lower than the same period in 2017 (SV / MSV, 2018). Human malaria can be caused by any of six species of the Apicomplexa protozoa, i.e., *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*,

Plasmodium ovale curtisi and *Plasmodium ovale wallikeri* (WHITE, 2008; SUTHERLAND et al., 2010). Approximately 70 species of the subfamily Anophelinae can participate of the transmission cycle, and 41 are considered dominant vectors, including some species complexes (SINKA et al., 2012). In Brazil, the primary vectors are *Nyssorhynchus darlingi*, *Nyssorhynchus marajoara* and *Nyssorhynchus aquasalis* (CONN et al., 2002; CARLOS et al., 2019), in accordance to the new nomenclature proposed by FOSTER et al. (2017), who elevated the subgenus *Nyssorhynchus* of the genus *Anopheles*.

Similar to other vector-borne diseases, the malaria transmission is influenced by environment factors, including temperature, precipitation and humidity (SILVA-NUNES, 2010; ROSSATI et al., 2016). These factors can affect the development of *Plasmodium* parasites, and thus the metrics of malaria transmission (BAYOH and LINDSAY, 2003; BLANFORD et al., 2013; CHRISTIANSEN-JUCHT et al., 2014). For instance, minor variation in the temperature can either increase or decrease the extrinsic incubation period of *Plasmodium* parasites, affecting the vector competence and vectorial capacity of a population (THOMAS et al., 2018). Considering the dynamics of malaria transmission, the environmental changes caused by distinct land use for agricultural development, beef production and forest commodities exploitation can increase the risk of malaria in endemic areas that are under the impact of human occupation (CEDERBERG et al., 2011; HENDERS et al., 2015). The biological and ecological determinants linked to the increase in mosquito vector abundance remain poorly known. However, the microclimatic and environmental changes caused by deforestation can influence on the ecology of *An. gambiae*, *An. funestus* and *An. arabiensis*, altering their vector capacity, abundance and spatial distribution (YASUOKA and LEVINS, 2007; KWEKA et al., 2016).

Both deforestation and the subsequent changes in the natural forest environment, including in the landscape can favor ecological conditions to dispersion and abundance of *Ny.*

darlingi in areas that are under the impact of anthropogenic changes. The construction of lakes, ponds, microdams, fish ponds have been associated with emergence of new habitats for *Ny. darlingi* in regions of the Amazon (VITTOR et al., 2009). In the Brazilian Amazon, the construction of the dams in hydroelectric power plants has been associated with increase in the Anopheline human biting rate per person per hour (TADEI et al. 1998).

Malaria transmission is more intense in human settlements located in areas neighbouring the forest fringe in the Amazon. Recently, BARROS and HONÓRIO (2015) proposed a model of transmission in areas of agricultural expansion. Accordingly, the ecological and environmental changes linked to the deforestation increase the number of partially shaded larval habitats, and thus the abundance of *Ny. darlingi*. In addition, the presence of a ecotone mosquito species facilitates malaria transmission in areas of forest fringe. The complexity of environmental changes, in addition to the human movement, precarious health facility and inadequacy of human houses in newly human areas facilitate the contact mosquito-humans contact and the emergence of malaria.

This study aims to: (1) report the species more abundant of subfamily Anophelinae that were collected in forest edge and peridomicile areas; (2) investigate the presence of other Anophelinae species that can participate in the transmission of *Plasmodium*; (3) establish correlations between landscape metrics with cumulative incidence of malaria of each locality, number of *Ny. darlingi* in peridomicile, anopheline positivity rate in peridomicile, and human biting rate; (4) verify if some collection interval period presents greater number of *Ny. darlingi*, and infected mosquitoes, and (5) identify association between absence / presence of infected mosquitoes with malaria cases, and landscape metrics.

Material and Methods

Mosquito collection

Females of subfamily Anophelinae were collected in the municipalities of Acrelândia (Acre state), Cruzeiro do Sul (Acre state), Mâncio Lima (Acre state), Itacoatiara (Amazonas state), Lábrea (Amazonas state), Pacajá (Pará state) and Machadinho D'Oeste (Rondônia state), Brazil (Figure 1). The study regions were rural and periurban areas of Brazilian Amazonian that are endemic for malaria.

Field-collections were performed from January 2015 to November 2016, from 18 h:00 to 24 h:00, except for Acrelândia, Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima where collections were from 18 h:00 to 6 h:00 (Table 1). Collections were performed outdoors in the peridomestic and in the forest edge environments of 42 locations. In the peridomestic environment, mosquito females were collected in human landing catches (HLC), and in the forest edge environment in Shannon trap (ST) with light source (SHANNON, 1939). For each one of the 42 locations was chosen a house to performed the HLC. House selection in each location was based in malaria cases of the residents during the collection period, the level of forest cover, land use, and density of edge. In the same locality, the houses chosen for HLC were at least 2.5 km apart.

Collections were carried out by MAMS, ESB, GZL and LSMC. One or two collectors carried out HLC collections each night, depending on availability of collectors during the field trip. In Shannon trap, two collectors worked each six or 12-hour collections. In addition, mosquitoes were sampled with barrier screen (BS) in 21 peridomestic environment of 21 houses (Figure 2). Every hour, mosquitoes were killed with $C_4H_8O_2$ vapors and stored in silica gel separated by date, location, house and hour of collection.

Species identification

Specimens were morphologically identified to species level by MAMS and stored separate for further analysis. Specimens from species complex were molecularly identified

using a 658 base pairs fragment of the barcode region of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI), according to the methodology described in BOURKE et al. (2018). Taxonomic nomenclature adopted in this study is that proposed by FOSTER et al. (2017).

Genomic DNA extraction

Two protocols were adopted for genomic DNA extraction. In one protocol genomic DNA was extracted from whole adult female *Ny. darlingi* using Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Hilden, Germany). In a second protocol, each female mosquito belonging to the subfamily Anophelinae was bisected between the head / thorax and abdomen in accordance to FOLEY et al.'s (2012) protocol. Following, genomic DNA from individual thorax plus head was extracted using a salt precipitation method, according to LAPORTA et al. (2015). DNA was quantified in Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and stored at -80 °C.

***Plasmodium* testing**

For *Plasmodium* real-time PCR testing, two protocols were adopted, as follows. DNA samples from the whole mosquito were tested for *Plasmodium* spp. following BICKERSMITH et al. (2015), with DNA pools of up to five individuals containing equal amounts of gDNA. Mosquito samples with DNA concentrations of <1.0 ng/μL or >15 ng/μL were tested individually and not pooled. In instances where the species of *Plasmodium* could not be detected with the triplex assay, PCR amplification and agarose gel (2%) electrophoresis of PCR products was performed using primer pairs for *P. vivax* and *P. falciparum* (LAPORTA et al., 2015). Each PCR reaction contained 1 X PerfeCTa qPCR ToughMix, Uracil N-glycosylase (UNG), ROX (Quanta Biosciences, USA), 0.3 μM of each primer, ultrapure water, and 2 μL genomic DNA, with a total volume of 20 μL. Cycling

conditions were as follows: 5 min UNG-activation hold at 45 °C and a denaturation step for 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 95 °C denaturation for 15 secs and 60 °C annealing/elongation for 1 min.

In accordance with a second protocol, head plus thorax of each female were tested separate using real-time PCR of the 18S rRNA region, followed by High Resolution Melting (HRM), using a procedure similar to that proposed by MURILLO et al. (2019) for mosquitoes. Efficiency of real-time PCR reaction was verified in triplicate assays, using serial dilution 1:10 of target fragment (*P. vivax* and *P. falciparum*). Genomic DNA from human blood positive for either *P. vivax* or *P. falciparum* was employed as positive control and ultrapure water as negative control for real-time PCR. In addition, head /thoraces DNA of *Ny. darlingi* females from laboratory F1 progenies were employed to test for non-specific amplification. For field-collected mosquitoes, DNA from three females was first tested in pools. Similar to the protocol previously described, DNA pools of up to three females containing equal amounts of gDNA were first tested. Female samples with DNA concentrations less than 3.0 ng were tested individually and not pooled. Each mosquito from positive pools was tested separate. Each real-time PCR had a final volume of 20 µL containing 1 X MeltDoctor™ HRM Master Mix (ThermoFisher Scientific), 10 ng DNA of each female, 500 nM of each primer 1459-M13 (forward 5' TGTAACGACGGCCAGTCTGGTTAATTCCGATAAC 3') and 1706-M13 (reverse 5' CAGGAAACAGCTATGACCTAACTTCCTTGTGTTAGAC 3') (KIPANGA et al., 2014) and ultrapure H₂O. PCR thermal conditions were 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of amplification (95 °C for 15 secs and 60 °C for 1 min) and the melt curve step at the end of the PCR (from 60 °C to 95 °C, with gradual temperature increments 0.3%). Results were analyzed using the StepOnePlus™ Software v2.3 and High Resolution Melt (HRM) v3.0.1 Software.

Data metrics

The following landscape metrics were obtained: forest cover (FC), edge density (ED), and distance from HLC collection site to the closest standing water metric (DW). It was denominated FC, the percentage of forest cover present in the landscape of each circular area of 3.14 km² and ED corresponded to total perimeter of edge of each remaining fragment forest present in the circular area of 3.14 km².

These metrics were calculated from Sentinel 2A satellite images (ESA - European Space Agency). Criteria for the selection of the images were the use of images that showed lower percentage of clouds and that the date of obtaining had been as close as possible to the date of collection. The metrics were calculated from circular images of 1 km radius ($\pi.R^2 = 3.14 \text{ km}^2$) centered on the house that was performed the HLC. Thus, for each of the 42 HLC points, a circular image and the three metrics were obtained. The areas of these images do not overlap.

Malaria cases

Data of number of malaria cases and population at risk of acquiring the disease in each locality were requested by MAMS from Ministry of Health, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) Malária. The number of malaria cases corresponds to the sum reported cases in the month of field-collection and previous month in each locality (Table 1).

Statistical analysis

Correlation tests

Non-parametric test was used because the variables distributions were not normally distributed. So, Spearman's rank correlation, non-parametric, was performed to verify

correlations between FC and ED metrics with cumulative incidence of malaria and between FC, ED, and DW metrics with the following variables: number of *Ny. darlingi*, anopheline positivity rate, and human bite rate (HBR). Cumulative incidence of malaria refers to the two month period and corresponds to the sum of the number of reported cases of each locality in the collection month and the previous one / population of the locality x 1000 habitants. Number of *Ny. darlingi* was overall this specie collected in peridomicile during 18 h:00 and 0 h:00. Anopheline positivity rate refers to total of anophelines positive to *Plasmodium* / total of anophelines collected x 100. The anopheline positivity rate was calculated for each peridomicile collection site. HBR was considered equivalent to the human landing rate, because it was assumed that the human landing was resulted from search for blood meal. So, HBR was the number of *Ny. darlingi* collected in peridomicile by HLC by night by collector. FC corresponded the percentage of forest cover in a circular area of 3.14 Km². ED referred to total perimeter of edge of forest fragments present in the circular area (3.14 km²). DW was the distance between the site of HLC to the nearest water collection in the circular area.

Data from all field locations were employed for Spearman's rank correlation analyses. Data obtained from peridomicile collections between 18 h:00 and 0 h:00 were considered in these analyses. The analyses were performed in Stata / IC 15.1 software.

Number of *Nyssorhynchus darlingi* and infected mosquitoes

Although other mosquito species of the subfamily Anophelinae can act as primary vectors in some regions of the Amazon, such as some *Nyssorhynchus albitarsis* complex species, only *Ny. darlingi* was collected from all locations and therefore, it was used for the analysis described below.

Negative binomial regression was used to determine if there was some difference both in number of *Ny. darlingi* collected and in the number of infected mosquitoes during

collection intervals periods (18 h:00 – 21 h:00; 21 h:00 – 0 h:00; 0 h:00 – 3 h:00; 3 h:00 – 6 h:00). This regression was chosen because of overdispersion of the variables analyzed. These analyses were performed with data from the twelve-hour field collections (18 h:00 to 6 h:00) in peridomicile environment in the Acrelândia, Mâncio Lima, and Cruzeiro do Sul municipalities. The analyses were performed in Stata / IC 15.1 software.

Binary logistic regression

Binary logistic regression was performed to analyze the association between the presence / absence of mosquitoes infected with FC, ED, and DW metrics and malaria cases. This analysis was performed with collection data performed in peridomicile between 18 h:00 and 0 h:00 in 40 field locations. Analyzes were performed in Stata / IC 15.1 software.

Results

Anopheline collection and *Plasmodium* identification

In total 6,962 anopheline specimens were collected in seven rural communities with active malaria transmission. In the forest fringe, 1,496 mosquitoes were collected, whereas 5,466 were in the peridomestic environment, being 4,365 females from HLC, and 1,101 from barrier screen. Forty-one species of subfamily Anophelinae were collected in a total.

In peridomicile, species more abundant were *Ny. darlingi* (90.29%), *Ny. oryzalimnetes* (2.03%) and *Ny. braziliensis* (1.87%). In forest edge environment, *Ny. konderi* B (27.27%), *Ny. triannulatus* (24.47%) and *Ny. darlingi* (21.39%) were predominant. Of the 6,962 specimens collected, thirteen were from the genus *Chagasia* and were not tested for *Plasmodium*.

Of the 6,949 anopheline female tested to *Plasmodium*, sixty-nine mosquitoes were positives for *P. vivax*, 20 for *P. falciparum* and 2 for *P. vivax* + *P. falciparum*. *Nyssorhynchus*

darlingi, *Ny. rangeli*, *Ny. benarrochi* B and *Ny. konderi* B were found naturally infected (Table 2). *Plasmodium vivax* infection was found in field-collected females in the seven municipalities, while *P. falciparum* was detected in *Ny. darlingi* collected in Mâncio Lima, Lábrea and MachadinhoD'Oeste. The mixed infections were found in females collected in Acrelândia and Mâncio Lima. Of the infected mosquitoes, seventy-two were collected by HLC, seventeen by barrier screen and two by Shannon trap (Table 2). Number of infected females in each collection period is in Figure S1.

Correlation tests

Outliers were removed from the correlation analyzes. In the peridomicile environment, the statistical correlations were positive to: cumulative incidence of malaria and ED metric ($r= 0.398$; $p=0.010$), cumulative incidence of malaria and number of *Ny. darlingi* ($r=0.554$; $p<0.001$), and cumulative incidence of malaria and HBR ($r=0.502$; $p<0.001$). In contrast, the correlation between FC metric and HBR was negative ($r=-0.331$; $p=0.035$). Others correlation tested were not statistically significant, as shown in Table 3. Figure S2 (Supplementary Material) shows the dispersion graph of the variables that presented significance level lower than 5% in the correlation analyzes.

Number of *Nyssorhynchus darlingi* and infected mosquitoes

Results of negative binomial regression analyses of 1,496 females of *Ny. darlingi* obtained in the 12-hour peridomiciliary collections carried out in Acrelândia, Mâncio Lima and Cruzeiro do Sul showed statistically significant difference in count these mosquitoes among 3-h collection time periods. Using the data collected in period from 18 h:00 to 21 h:00 as reference, the lowest number of *Ny. darlingi* was collected between 3 h:00 and 6 h:00 ($p<0.001$) (Table 4).

Regarding to infected mosquitoes, results of negative binomial regression showed significant difference ($p < 0.05$) in the number of infected mosquitoes at different collection intervals, when collection was performed in a peridomicile for 12 hours (Acrelândia, Mâncio Lima and Cruzeiro do Sul) (Table 5). The number of infected mosquitoes was significantly higher between 0 h:00 and 3 h:00 than in the period 18 h:00 and 21 h:00 ($p = 0.045$).

Binary logistic regression

Anophelinae data obtained in 40-field collections were employed for the logistic regression analysis. Of the 42 collection regions, two locations of the municipality of Itacoatiara (Amazonas state) were not used in this analysis because no Anophelinae mosquito was collected. Results of the logistic regression analysis showed no association between presence / absence of infected mosquitoes and malaria cases and neither with FC, ED and DW metrics ($p > 0.05$).

Discussion

Multiple determinants can influence on the dynamics of malaria transmission, such as disease control with the use of fast diagnostic and specific anti-malarial drugs for those infected people. In addition, interventions such as vector control, changes in the environmental, biological (vector, parasite cycle, intermediate host immunity) and socioeconomic factors (habitation, economic activity) (COHEN et al., 2017).

Differences in the anopheline species and in the number of mosquito collected in the studied areas are in accordance to findings from other studies (PATZ et al., 2004; HUTCHINGS et al., 2011) and suggest that environmental changes caused by anthropogenic changes in the natural environment can interfere in the species abundance. These changes linked to human presence can create ecological conditions that favor presence of some

mosquito vector species, mainly those highly anthropophilic species (HUTCHINGS et al., 2011). In this context, the peridomicile environment in Amazonian rural and periurban areas possess conditions to support the various components of malaria cycle, i.e., entomological, reservoirs, and parasites components. Our results show that 78.5% of the mosquitoes were collected in peridomiciliary environment and of these, 90.3% were *Ny. darlingi*, confirming that altered landscapes favor the abundance of the primary vector.

Some species / species complexes considered *Plasmodium* vectors in the Amazon region (*Anopheles matogrossensis*, *Nyssorhynchus braziliensis*, *Ny. darlingi*, *Nyssorhynchus triannulatus*, *Nyssorhynchus oswaldoi* s.l., *Nyssorhynchus albitarsis* s.l., *Nyssorhynchus deaneorum*, *Nyssorhynchus rangeli* and *Anopheles peryassui*) were collected in disturbed environments. This result suggests that ecological and climate conditions in forest fragmented areas favors occurrence of species involved in the dynamics of malaria transmission (BARROS and HONÓRIO, 2015).

Nyssorhynchus darlingi, *Nyssorhynchus rangeli*, *Nyssorhynchus benarrochi* B and *Nyssorhynchus konderi* B were found naturally infected with *P. vivax* and/or *P. falciparum*. *Nyssorhynchus darlingi* acts as the primary vector in neotropical regions (SINKA et al., 2010) while *Ny. benarrochi* acts as a vector in Eastern Peru (FLORES-MENDONÇA et al., 2004). Although *Ny. benarrochi* be considered vector in Peru, in Brazil, this species is considered zoophilic and there is no record of natural infection by *Plasmodium*. In this study, the two *Ny. benarrochi* B specimens that were infected with *P. vivax* were found in a moderately conserved peridomiciliary region (approximately 65% of forest cover). Anthropogenic alterations in this region probably have altered the population of wild animals, resulting in the search for human blood meals for this species (LAPORTA et al., 2013). Thus, this study suggests that *Ny. benarrochi* B plays an important role in the *Plasmodium* transmission in areas of Pacajá municipality, because only this species was found infected with *Plasmodium*

in this locality, just as occurred in del Putumayo (Colombia), where *Ny. benarrochi* B was the only positive species for *P. vivax* (ORJUELA et al., 2013). *Nyssorhynchus rangeli* was already found infected with *Plasmodium* sp. in the state of Amapá (PÓVOA et al., 2001), but because it is predominantly zoophilic and has low density, it is not considered a significant vector in the Amazon region, acting as a vector in Southern Colombia (QUIÑONES et al., 2006). *Nyssorhynchus konderi* B belongs to Oswaldoi-Konderi Complex. Species of this complex have already been reported with *Plasmodium* infection, as *Nyssorhynchus oswaldoi* B and *Nyssorhynchus konderi* sp. nr (PÓVOA et al., 2001, QUIÑONES et al., 2006; RUIZ-LOPES et al., 2013). This study is the first report of natural infection *Ny. konderi* B with *Plasmodium*. The infected specimen was collected in the forest edge of a conserved region (approximately 84% of forest cover), where *Ny. konderi* B was the most prevalent species (304/506) and *Ny. darlingi* was not collected. This result shows that *Ny. konderi* B participate of the dynamic of malaria transmission in Acrelândia, and confirms that species of the Oswaldoi Complex can act as main malaria vector in the Acre state (BRANQUINHO et al., 1993, 1996).

The negative correlation found between the increase of FC and decrease of HBR in the rural and periurban areas of Amazonian corroborates with the results of other studies conducted in Iquitos, Peru (VITTOR et al., 2006). A complexity of interrelated processes occurs in areas of the Amazonian tropical forest environment that are impacted by various anthropogenic use of land. For instance, road construction, selective logging, legal and illegal mining, agriculture and cattle ranch demand deforestation and can cause degradation of natural habitats, habitat loss, habitats splits and also creates new ecological niches that can be readily occupied by opportunistic species (TADEI and DUTARY THATCHER, 2000). Along the process of human occupation of forest environment, the occurrence of successive ecological and environmental changes can favor the increase in abundance of mosquito

malaria vector species, augmenting the human exposure to mosquito bites, including *Ny. darlingi* (TADEI et al., 1998, CASTRO et al. 2006a). This species is highly favored by changes in natural forest environment, specially when humans and domestic animals are present as sources of blood. Recently, MORENO et al. (2017) demonstrated that *Ny. darlingi* can blood-feed on several vertebrates in addition to humans, and that approximately 65%-85% of female tested had fed on Galliformes-chickens and turkeys in Lupuna, Cahuide and Santa Emilia communities, Iquitos, Peru. This was an unexpected result because partly contradicts the widely accepted idea that associates *Ny. darlingi* as highly antropophilic for explaining his status as primary vector of human *Plasmodium* spp. The simplicity of explanation regarding the vector status of the species can be readily debated by the fact that other interrelated factors can also determine the importance of this species in *Plasmodium* propagation. For instance, its abundance and dominance in outdoors and indoors environments of rural landscapes, human behavior that increases exposure to mosquito bites, among several other components of transmission demonstrated by CASTRO et al. (2006 a, b). Within this ecological system, environmental condition and landscape can sustatin the major components of malaria risk and relationships between them, determining the vulnerability of the malaria endemic areas (COHEN et al. 2017).

Results of analysis showed that cumulative incidence of malaria in rural and periurban areas were positively correlated with HBR, number of females of *Ny. darlingi* and ED metric. The positive correlation between ED metric and cumulative incidence of malaria suggests that forest fragmentation is a risk factor for acquiring malaria in rural and periurban areas in the Amazon, corroborating with other previous studies realized in the Amazon (PATZ et al., 2004; SILVA-NUNES et al., 2008; CHAVES et al., 2018). In addition, our findings regarding the proportion of mosquitoes found naturally infected with *P. vivax* and *P. falciparum*

corroborates that *Ny. darlingi* is the primary vector of human *Plasmodium* in the peridomicile landscape of rural and periurban areas of the Brazilian Amazon.

It was expected in this study a positive correlation between DW metric and number of *Ny. darlingi*, since more number of mosquitoes are expected in regions close to the larval habitats of the vector (BARROS et al., 2011; HIWAT and BRETAS, 2011). We suggest that the non-correlation between these measurements may be due to: 1) DW was measured through satellite images from the date closest to collection and perhaps this period (between collection and image obtained) may have been sufficient for the creation or disappearance of breeding sites; 2) seasonal variation in the population of *Ny. darlingi*. The field collections were carried out during the transition of wet-dry season and in the dry season, a period when *Ny. darlingi* is decreasing in most Amazonian areas with presence of the species; 3) distance of human dwellings from the forest edge and larval habitats were variable, both because of the dry season and also level of deforestation.

In 12-hours peridomiciliary collections, despite of the greater number of female mosquitoes have been collected in the first collection period (18 h:00 – 21 h:00), it was in the third period (0 h:00 – 3 h:00) that the highest number of mosquitoes infected was collected. Seventy-three percent of the infected mosquitoes (30/41) found in Mâncio Lima, Acrelândia and Cruzeiro do Sul were collected between 0 h:00 and 6 h:00. BARROS et al. (2007) showed that in the collection interval 18 h:00 – 22 h:00 there was the prevalence of young females (nulliparas), while the period 2 h:00 – 6 h:00 the older females had the prevalence. The age of the females was related to the number of dilations of the ovaries, because occurs a dilatation in each gonotrophic cycle. As gonotrophic cycle is related to blood meal, because the female needs the blood for the maturation of the eggs, it is expected that females with higher number of dilations had performed more blood meals and, therefore, higher likelihood to be infected with *Plasmodium* spp. Thus, one hypothesis to explain the high number of

infected mosquitoes after midnight could be the highest density of old females in the period 2 h:00 – 6 h:00. This data is important for malaria control measures in the studied areas since it suggests that the likelihood of a mosquito infecting a human in peridomicile can be higher during 0 h:00 and 6 h:00 than crepuscular period.

In this study was not observed the bimodal pattern of *Ny. darlingi* activity in areas of the municipalities of Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul and Acrelândia. Despite a high number of *Ny. darlingi* collected during 18 h:00 and 21 h:00, between 5 h:00 and 6 h:00 the amount of *Ny. darlingi* collected was lower than the others periods time (Figure S1). As several factors can alter the behavior of mosquito hematophagy (density of the anopheline species in relation to other culicids, presence of other vertebrates, distance from the house to the edge of the forest) (TADEI and DUTARY THATCHER, 2000), other studies should be conducted to see what factors are contributing to change in this behavior in these areas.

There was no statistical association among presence/absence of infectious mosquitoes and landscape metrics and malaria cases at significance level lower than 5%. Lack of association may be due to: (1) small sample size represented by 40 rural locations of seven municipalities; (2) the malaria cases included in the analysis was from the locality of collection, including the field location. Ideally, in the analysis only the malaria cases reported in the area (3.14 km²) around the house where HLC was carried out should be included, not of areas of the localities defined by the SIVEP malaria (SIVEP-MALARIA/SVS/MS).

This cross-sectional study corroborates with other ecological studies showing that changes in landscape affects the behavior of anophelines, favoring the increase of the number of vectors of *Plasmodium* spp. in regions of forest fragments and, consequently, creating favorable conditions to the dynamics of malaria transmission. In this study the presence of two infected species, *Ny. benarrochi* B and *Ny. konderi* B, that had not yet been found to naturally infected with *Plasmodium* in regions of Amazonia, were verified. These zoophilic

species can have altered their behavior due to landscape changes and, in the presence of humans, searched for human blood meals. In addition, it was verified that, in 12-hours peridomicile collections, the highest number of infected mosquitoes was collected after midnight, indicating that although the crepuscular period is the most biting activity by *Ny. darlingi*, the period between 0 h:00 and 3 h:00 presented greater risk for *Plasmodium* transmission. These results contribute to the actions of vector control measures. Although spraying of chemicals in peridomiciliary environments can supply the population of mosquitoes in the interval of time that they are found in greater abundance, the use of impregnated mosquito nets is fundamental to minimize the number of infectious bites during the period of greatest number of mosquitoes infected (0 h:00 and 3 h:00). In general, results of this study increase knowledge about (1) the species the most abundant of subfamily Anophelinae present in regions altered by landscape changes, (2) species that are acting as *Plasmodium* vectors in rural and periurban areas and (3) the period of greatest concentration of *Ny. darlingi* and infected anophelines in peridomicile in areas of the municipalities Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Acrelândia.

References

- BARROS, F. S. M.; ARRUDA, M. E.; VASCONCELOS, S. D.; LUITGARDS-MOURA, J. F.; CONFALONIERI, U.; ROSA-FREITAS, M. G.; TSOURIS, P.; LIMA-CAMARA, T. N.; HONORIO, N. A. Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, p. 54–68, 2007.
- BARROS, F. S. M.; ARRUDA, M. E.; GURGEL, H. C.; HONÓRIO, N. A. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, 643–658, 2011.
- BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A. Deforestation and Malaria on the Amazon Frontier: Larval Clustering of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Determines Focal Distribution of Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 939–953, 2015.
- BAYOH, M. M.; LINDSAY, S. W. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 93, 375–381, 2003.
- BICKERSMITH, S.A.; LAINHART, W.; MORENO, M.; CHU, V. M.; VINETZ, J. M.; CONN, J. E. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 573–576, 2015.
- BLANFORD, J. I.; BLANFORD, S.; CRANE, R. G.; MANN, M. E.; PAAIJMANS, K. P.; SCHREIBER, K. V.; THOMAS, M.B. Implications of temperature variation for malaria parasite development across Africa. **Scientific Reports**, 3:1300, 2013.
- BOURKE, B. P.; CONN, J. E., OLIVEIRA, T. M. P.; CHAVES, L. S. M.; BERGO, E. S.; LAPORTA, G. Z.; SALLUM, M. A. M. Exploring malaria vector diversity on the Amazon Frontier. **Malaria Journal**, v. 17, p.1–17, 2018.
- BRANQUINHO, M. S.; LAGOS, C. B. T.; ROCHA, R. M.; NATAL, D.; BARATA, J. M. S.; COCHRANE, A. H.; NARDIN, E.; NUSSENZWEIG, R. S.; KLOETZEL, J. K. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 391–394, 1993.

BRANQUINHO, M. S.; ARAÚJO, M. S.; NATAL, D.; MARRELLI, M. T.; ROCHA, R. M.; TAVEIRA, F. A. L.; KLOETZEL, J. K. *Anopheles oswaldoi* a potencial malaria vector in Acre, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 233, 1996.

CARLOS, B. C.; RONA, L. D.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, 2019.

CASTRO, M. C.; MONTE-MÓR, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2452–2457, 2006a.

CASTRO, M. C.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Spatial patterns of malaria in the Amazon: implications for surveillance and targeted interventions. **Health & Place**, v. 13, p. 368–380, 2006b.

CEDERBERG, C.; PERSSON, U. M.; NEOVIUS, K. MOLANDER, S.; CLIFT, R. Including carbon emissions from deforestation in the carbon footprint of Brazilian beef. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 1773–1779, 2011.

CHAVES, L. S. M.; CONN, J. E.; LÓPEZ, R. V. M.; SALLUM, M. A. M. Abundance of impacted forest patches less than 5km² is a key driver of the incidence of malaria in Amazonian Brazil. **Scientific Reports**, 8:7077, 2018.

CHRISTIANSEN-JUCHT, C.; PARHAM, P. E.; SADDLER, A.; KOELLA, J. C.; BASÁÑEZ, M. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s. **Parasites & Vectors**, v. 7:489, 2014.

COHEN, J. M.; MENACH, A. L.; POTHIN, E.; EISELE, T. P.; GETHING, P. W.; ECKHOFF, P. A.; MOONEN, B.; SCHAPIRA, A.; SMITH, S. L. Mapping multiple components of malaria risk for improved targeting of elimination interventions. **Malaria Journal**, 16:459, 2017.

CONN, J. E.; WILKERSON, R. C.; SEGURA, M. N. O.; DE SOUZA, R. T. L.; SCHLICHTING, C. D.; WIRTZ, R. A.; PÓVOA, M. M. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 66, p. 18–22, 2002.

FLORES-MENDONZA, C.; FERNÁNDEZ, R.; ESCOBEDO-VARGAS, K. S.; VELA-PÉREZ, Q.; SCHOELER, G. B. Natural *Plasmodium* Infections in *Anopheles darlingi*

and *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) from Eastern Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 489–494, 2004.

FOLEY, D. H.; HARRISON, G.; MURPHY, J. R.; DOWLER, M.; RUEDA, L. M.; WILKERSON, R. C. Mosquito bisection as a variable in estimates of PCR-derived malaria sporozoite rates. **Malaria Journal**, v. 11: 145, 2012.

FOSTER, P. G.; OLIVEIRA, T. M. P.; BERGO, E. S.; CONN, J. E.; SANT'ANNA, D. C.; NAGAKI, S. S.; NIHEI, S.; LAMAS, C. E.; GONZÁLEZ, C.; MOREIRA, C. C.; SALLUM, M. A. M. Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes. **Royal Society Open Science**, v. 4, 2017.

HENDERS, S.; PERSSON, U. M.; KASTNER, T. Trading forests: land-use change and carbon emissions embodied in production and exports of forest-risk commodities. **Environmental research Letters**, v. 10: 125012, 2015.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites & Vectors**, v. 4:177, 2011.

HUTCHINGS, R. S. G.; SALLUM, M. A. M.; HUTCHINGS, W. Mosquito (Diptera: Culicidae) Diversity of a Forest-Fragment Mosaic in the Amazon Rain Forest. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 173–187, 2011.

KIPANGA, P. N.; OMONDI, D.; MIREJI, P. O.; SAWA, P.; MASIGA, D. K.; VILLINGER, J. High-resolution melting analysis reveals low *Plasmodium* parasitaemia infections among microscopically negative febrile patients in western Kenya. **Malaria Journal**, v. 13:429, 2014.

KWEKA, E.; KIMARO, E. E.; MUNGA, S. Effect of Deforestation and Land Use Changes on Mosquito Productivity and Development in Western Kenya Highlands: Implication for Malaria Risk. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. 4:238, 2016.

LAPORTA, G. Z.; PRADO, P. I. K. L.; KRAENKEL, R. A.; COUTINHO, R. M.; SALLUM, M. A. M. Biodiversity Can Help Prevent Malaria Outbreaks in Tropical Forests. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–12, 2013.

LAPORTA, G. Z.; BURATTINI, M. N.; LEVY, D.; FUKUYA, L. A.; OLIVEIRA, T. M. P.; MASELLI, L. M. F.; CONN, J. E.; MASSAD, E.; BYDŁOWSKI, S. P.; SALLUM, M. A. M. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? **Malaria Journal**, v. 14: 181, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Situação epidemiológica da malária. (http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.%20c%20-%20malaria_CIT_30_ago_2018_cassiopeterka.pdf. Accessed on March 14, 2019).

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Datasus. Sivep Malária. Sistema Eletrônico do Serviço de Informações ao Cidadão (e-SIC). (<https://esic.cgu.gov.br/sistema/site/index.aspx>.2018).

MORENO, M.; SAAVEDRA, M. P.; BICKERSMITH, S. A.; PRUSSING, C.; MICHALSKI, A.; TONG RIOS, C.; VINETZ, J. M.; CONN, J. E. Intensive trapping of blood-fed *Anopheles darlingi* in Amazonian Peru reveals unexpectedly high proportions of avian blood-meals. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 11(2): e0005337, 2017.

MURILLO, E.; MUSKUS, C.; AGUDELO, L. A.; VÉLEZ, I. D.; RUIZ-LOPES, F. A new high-resolution melting analysis for the detection and identification of *Plasmodium* in human and *Anopheles* vectors of malaria. **Scientific Reports**, 9:1674, 2019.

ORJUELA, L. I.; HERRERA, M.; ERAZO, H.; QUIÑONES, M. L. Especies de *Anopheles* presents en el departamento del Putumayo y su infección natural con *Plasmodium*. **Biomédica**, v. 33, p. 42–52, 2013.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological Alert: Increase of malaria in the Americas. 30 January 2018, Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2018.

PATZ, J. A.; DASZAK, P.; TABOR, G. M.; AGUIRRE, A. A.; PEARL, M.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N. D.; KILPATRICK, A. M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.; BRADLEY, D. J. Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, 2004.

PÓVOA, M. M.; WIRTZ, R. A.; LACERDA, R. N. L.; MILES, M. A.; WARHURST, D. Malaria Vectors in the Municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 179–184, 2001.

QUIÑONES, M. L.; RUIZ, F.; CALLE, D. A.; HARBACH, R. E.; ERAZO, H. F.; LINTON, Y-M. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 617–623, 2006.

ROSSATI, A.; BARGIACCHI, O.; KROUMOVA, V.; ZARAMELLA, M.; CAPUTO, A.; GARAVELLI, P. L. Climate, environment and transmission of malária. **Le Infezioni in Medicine**, n. 2, p. 93–104, 2016.

RUIZ-LOPEZ, F.; WILKERSON, R. C.; PONSONBY, D. J.; HERRERA, M.; SALLUM, M. A. M.; VELEZ, I. D.; QUIÑONES, M. L.; FLORES-MENDONZA, C.; CHADEE, D. D.; ALARCON, J.; ALARCON-ORMASA, J.; LINTON, Y-M. Systematics of the OswaldoiComplex (Anopheles, Nyssorhynchus) in South America. **Parasites & Vectors**, 6:324, 2013.

SHANNON, R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, p. 131–148, 1939.

SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRANTE, R. S.; SILVA, N. S.; JUNCANSES, C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M.U. Malaria on the Amazonian Frontier: Transmission Dynamics, Risk Factors, Spatial Distribution, and Prospects for Control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 624–635, 2008.

SILVA-NUNES, M. Impacto de alterações ambientais na transmissão da malária e perspectivas para o controle da doença em áreas de assentamento rural da Amazônia Brasileira. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 603–622, 2010.

SINKA, M. E.; RUBIO-PALIS, Y.; MANGUIN, S.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. G.; BOECKEL, T. V.; KABARIA, C. W.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & Vectors**, 3:72, 2010.

SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; KABARIA, C. W.; BURKOT, T. R.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 69, 2012.

SUTHERLAND, C. J.; TANOMSING, N.; NOLDER, D.; OGUIKE, M.; JENNISON, C.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; DO ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A. P.; PINTO, J.; MICHON, P.; ESCALANTE, A. A.; NOSTEN, F.; BURKE, M.; LEE, R.; BLAZE, M.; OTTO, T. D.; BARNWEL, J. W.; PAIN, A.; WILLIAMS, J.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; SNOUNOU, G.; LOCKHART, P. J.; CHIODINI, P. L.; IMWONG, M.; POLLEY, S. D. Two non-recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1544–1550, 2010.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 325–35, 1998.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 87-94, 2000.

THOMAS, S.; RAVISHANKARAN, S.; JUSTIN, N. A. J. A.; ASOKAN, A.; KALSINGH, T. M. J.; MATHAI, M. T.; VALECHA, N.; MONTGOMERY, J.; THOMAS, M. B.; EAPEN, A. Microclimate variables of the ambient environment deliver the actual estimates of the extrinsic incubation period of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*: a study from a malaria endemic urban setting, Chennai in India. **Malaria Journal**, 17:201, 2018.

VITTOR, A. Y.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; LOZANO, W. S.; PINEDO-CANCINO, V.; PATZ, J. A. The Effect of Deforestation on the Human-biting Rate of *Anopheles darlingi*, the primary Vector of *Falciparum* Malaria in the Peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 3–11, 2006.

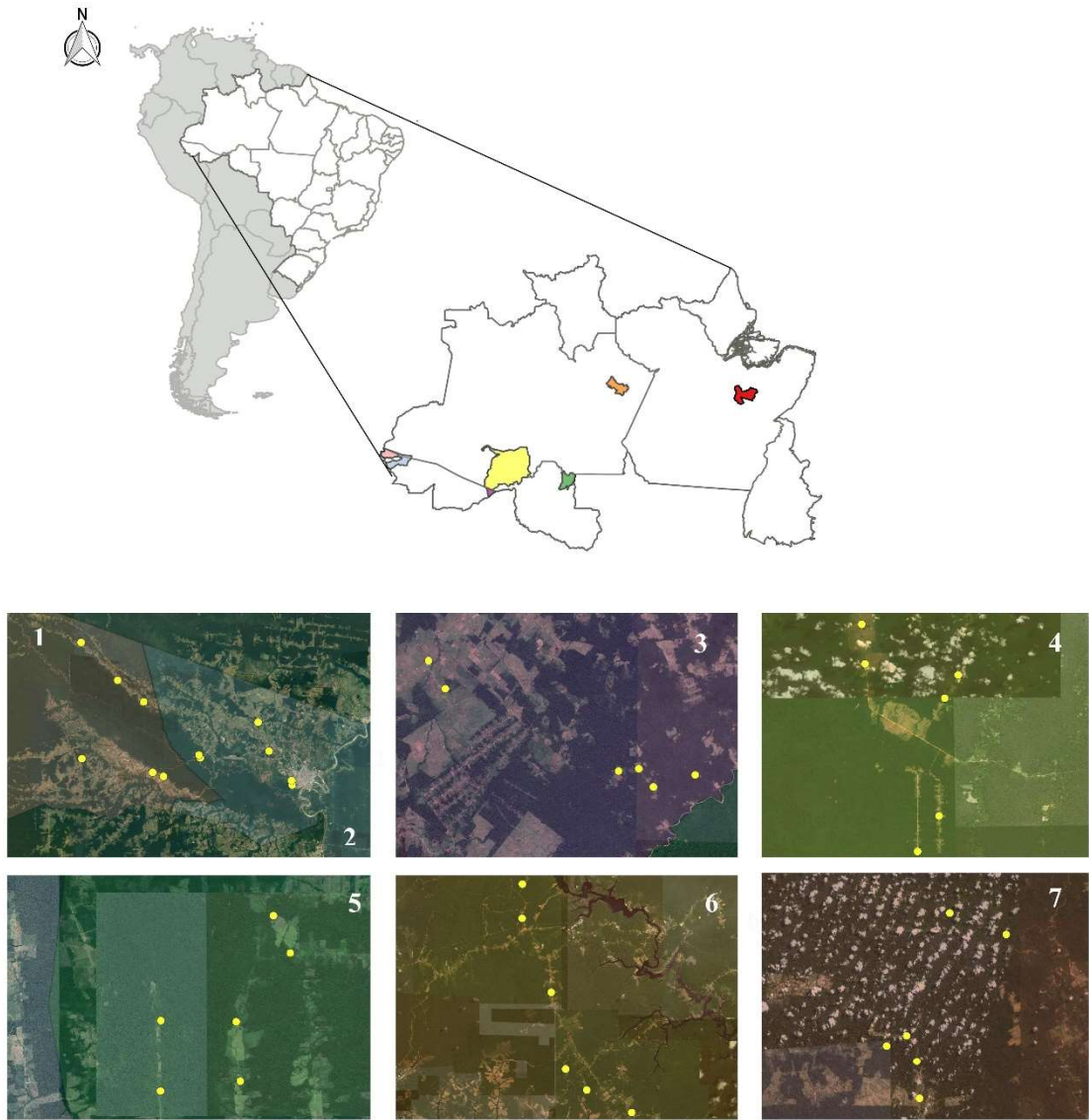
VITTOR, A. Y.; PAN, W.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; SÁNCHEZ-LOZANO, W.; PINEDO, V. V.; SALAS-COBOS, E.; FLORES, S.; PATZ, J. A. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 5–12, 2009.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 172–173, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. (<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> Accessed on January 27, 2019).

YASUOKA, J.; LEVINS, R. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 450–460, 2007.

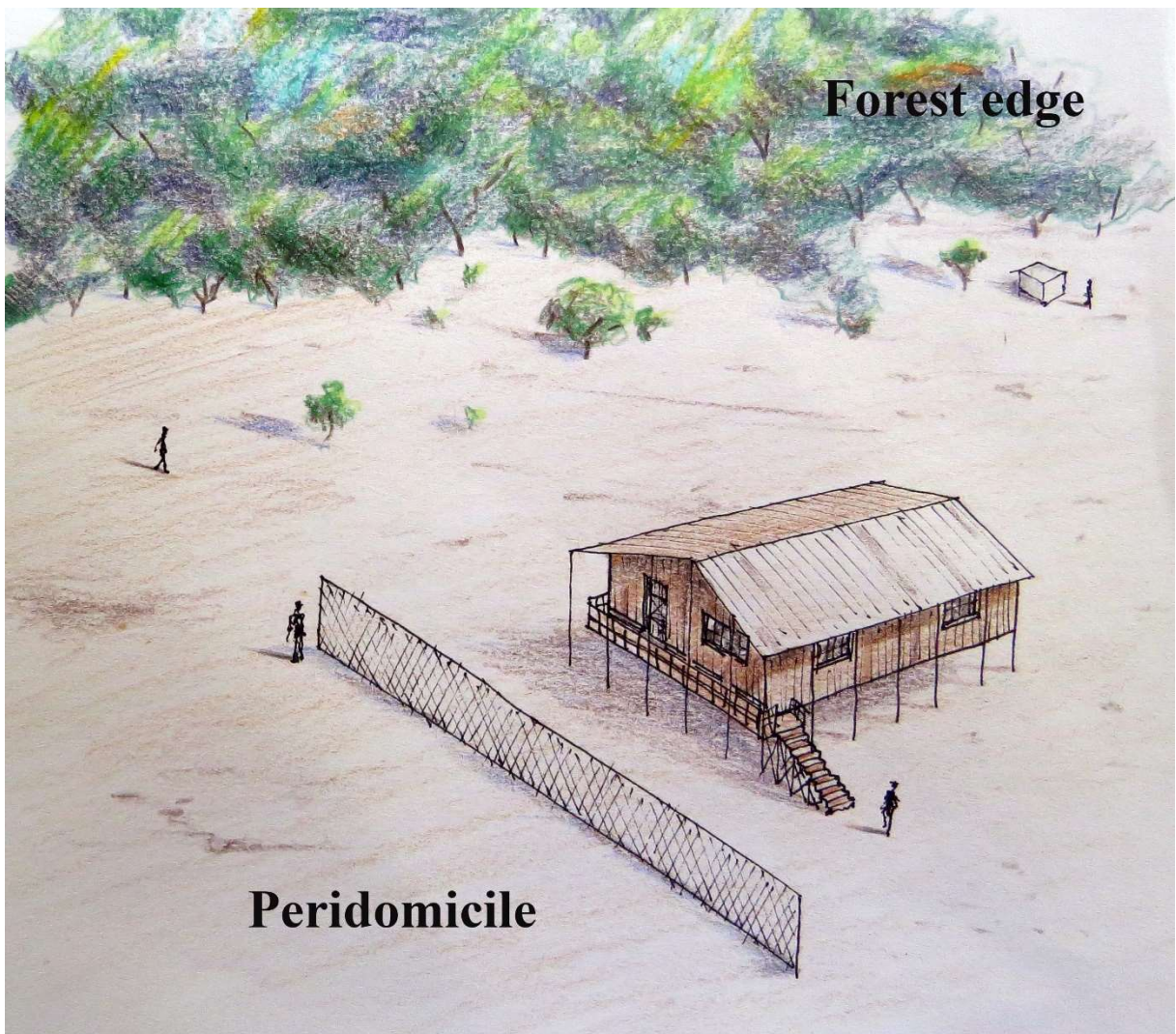
Figure 1 – Map of the localities where the collections were carried out.



Legend

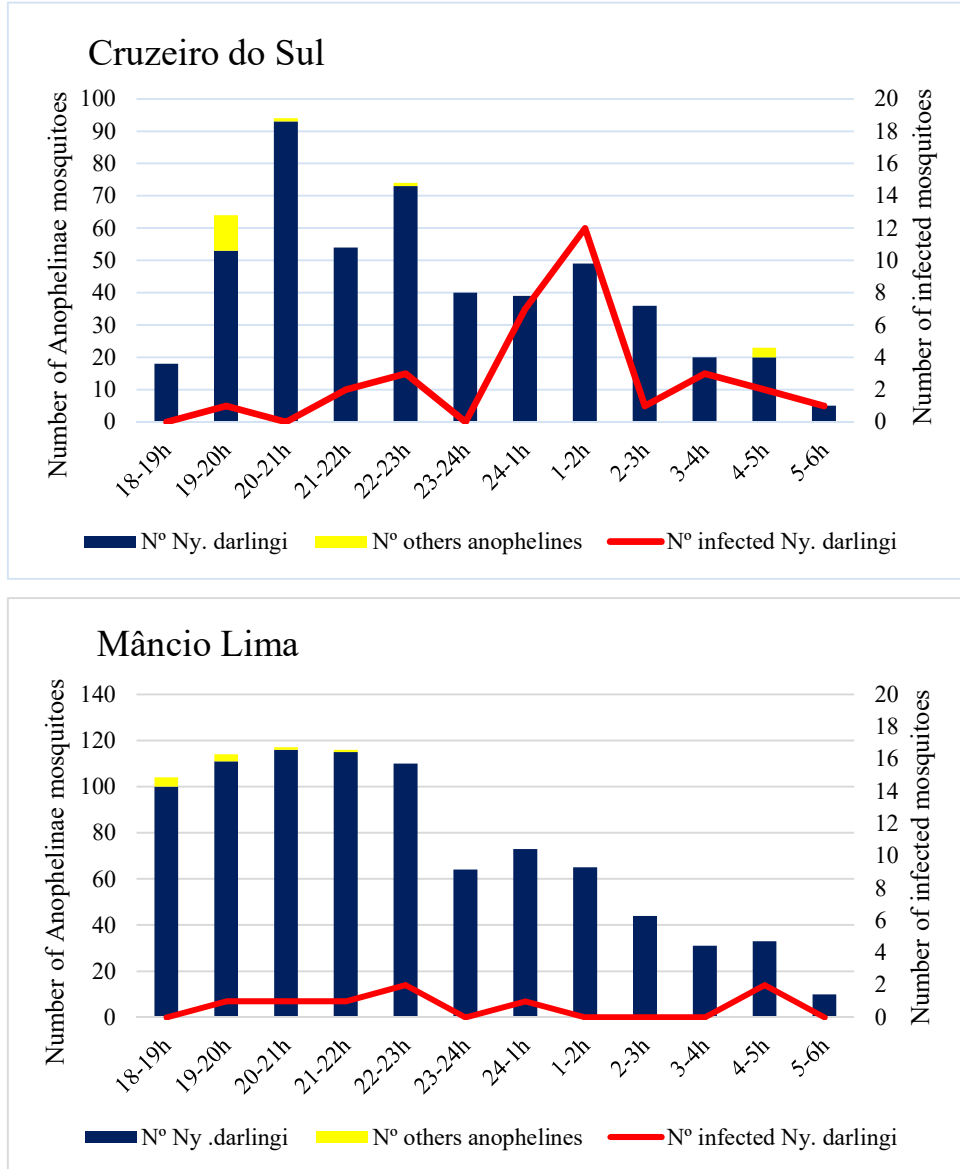
- Collection points
- Mâncio Lima (Image 1)
- Cruzeiro do Sul (Image 2)
- Acrelândia (Image 3)
- Lábrea (Image 4)
- Machadinho D'Oeste (Image 5)
- Itacoatiara (Image 6)
- Pacajá (Image 7)

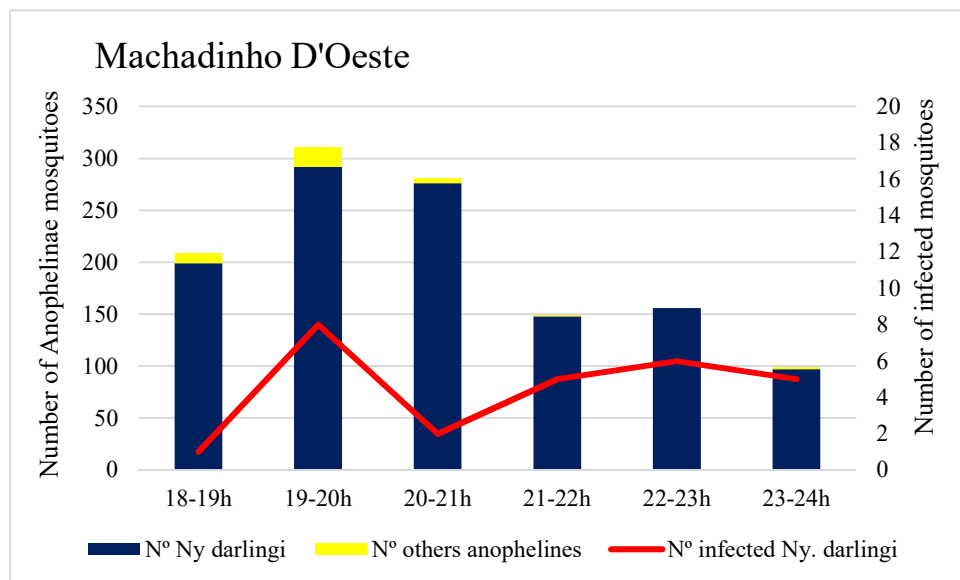
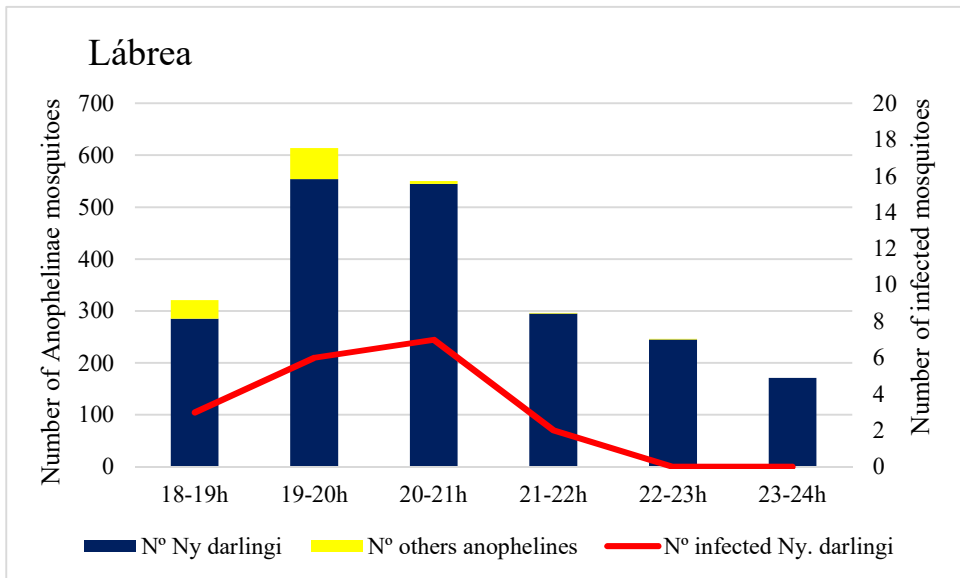
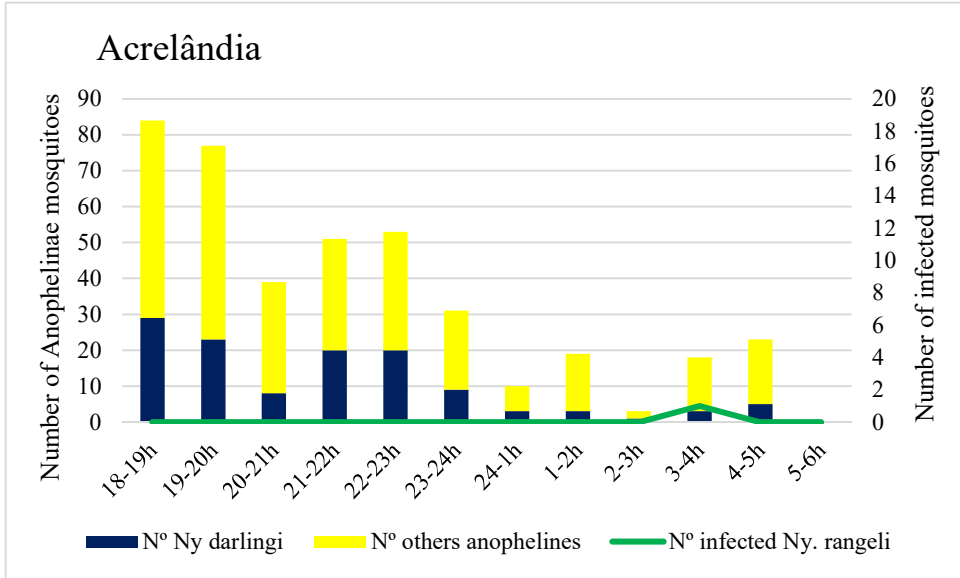
Figure 2 – Drawing illustrating the areas (peridomicile and forest edge) where the collections were performed.



(Illustration by Jardiel Sampaio de Oliveira. Permission of the artist to use the image).

Figure S1 – Number of Anophelinae mosquitoes and number of infected mosquitoes collected in peridomicile in each municipality and each collection hour.





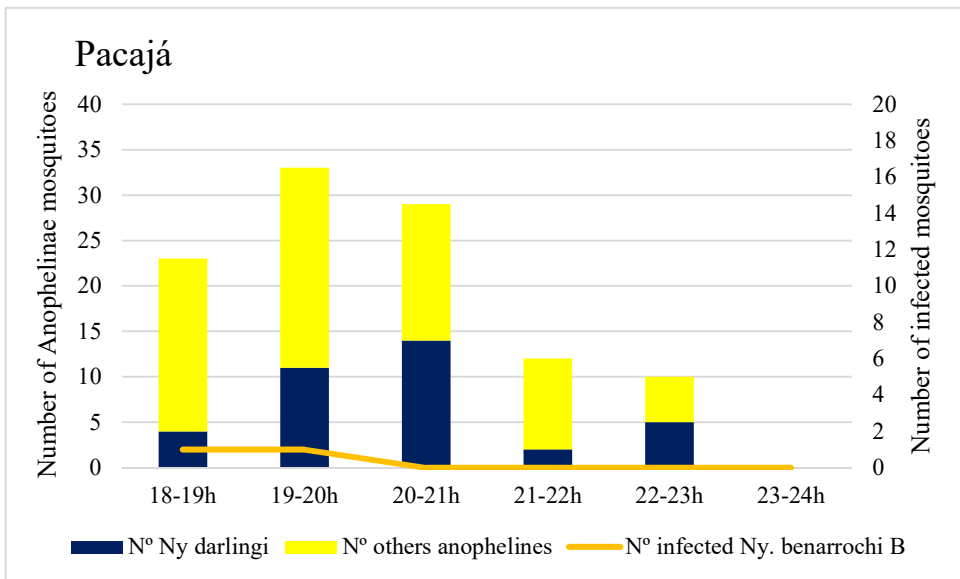
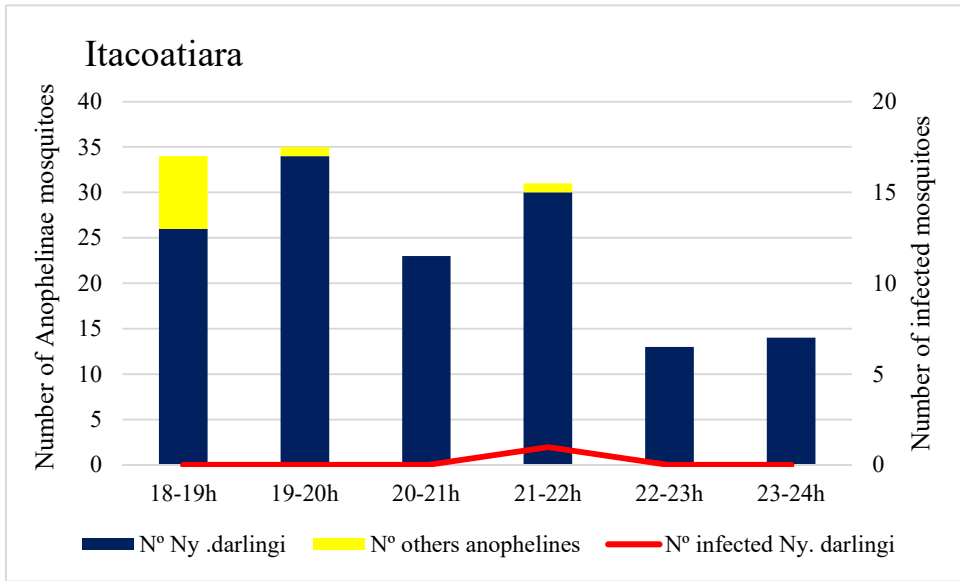
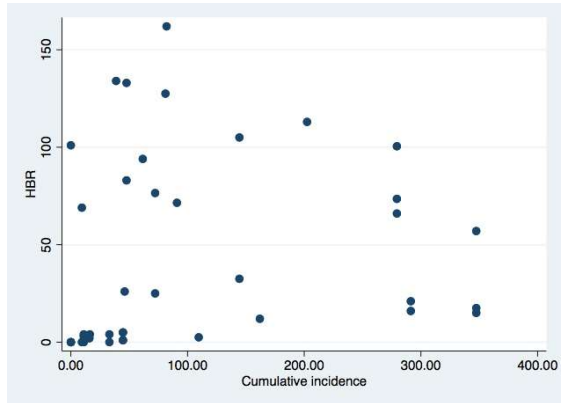
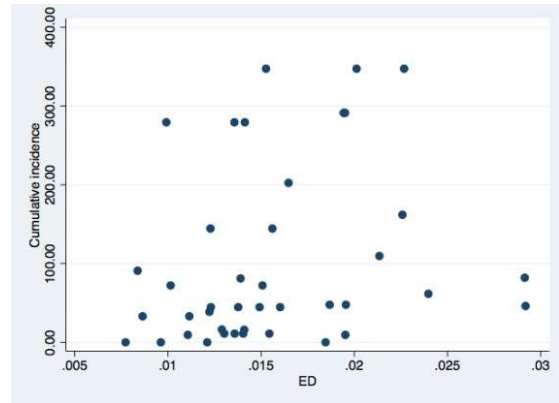


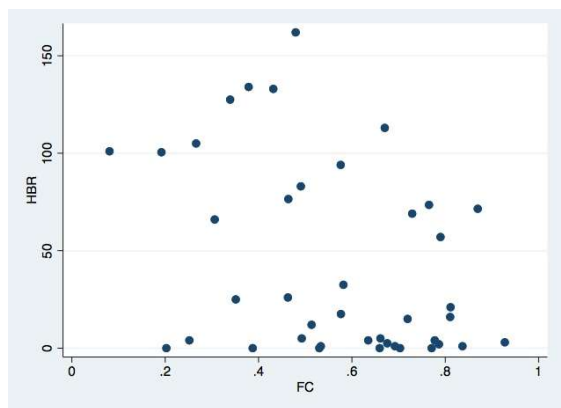
Figure S2 – Scatter plots showing correlation between cumulative incidence and human biting rate (HBR), edge density (ED), and number of *Ny. darlingi* (NY_DAR_PER) and between HBR and forest cover (FC).



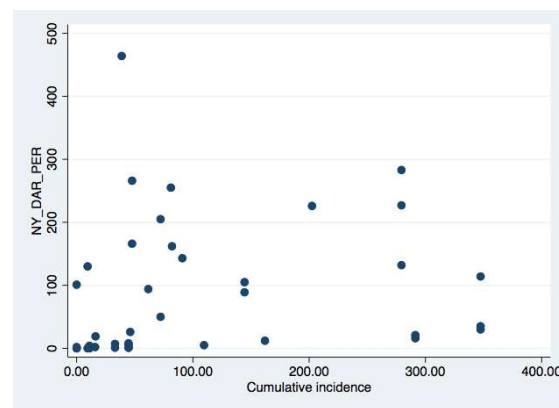
($r=-0.502$; $p<0.001$)



($r=0.398$; $p=0.010$)



($r=-0.331$; $p=0.035$)



($r=0.554$; $p<0.001$)

Table 1 – Municipality and locality collection, mosquito collection date, local malaria cases and local population.

ID_SIVEP	Municipality	Locality	Geographical coordinates	Collection date	Malaria cases*	Population**
376	Machadinho D'Oeste	Linha 09 - Galo Velho	-62.28651; -9.25393	Oct, 2015	13	90
374	Machadinho D'Oeste	Linha TB 13 - Galo Velho	-62.23010; -9.19352	Oct, 2015	9	111
373	Machadinho D'Oeste	Linha TB 14 - Galo Velho	-62.23746; -9.1773	Oct, 2015	5	129
371	Machadinho D'Oeste	Linha 10 - Galo Velho	-62.25361; -9.22343	Oct, 2015	13	180
21	Lábrea	Apairal - [P.A. Umari]	-64.68121; -7.49551	Aug, 2015	19	68
16	Lábrea	Boa Água - [P.A. Umari]	-64.67678; -7.40466	Aug, 2015	33	163
138	Lábrea	PA Pacia	-64.69773; -7.52299	Aug, 2015	26	286
37	Cruzeiro do Sul	Canela Fina	-72.73613; -7.549	Apr, May, 2015	69	426
8	Cruzeiro do Sul	Cohab	-72.68872; -7.63188	Apr, May, 2015	58	1258
76	Cruzeiro do Sul	Humaitá	-72.818; -7.59963	Apr, May, 2015	37	127
42	Cruzeiro do Sul	Igarapé Preto	-72.72075; -7.58997	Apr, May, 2015	52	634
22	Cruzeiro do Sul	Saboeiro	-72.68797; -7.63788	Apr, May, 2015	138	2239
71	Mâncio Lima	Colônia Normando	-72.98579; -7.60064	May, Jun, 2015	8	73
2	Mâncio Lima	Guarani	-72.88555; -7.62012	May, Jun, 2015	56	1174
52	Mâncio Lima	Paraná Pentecoste	-72.89831; -7.52012	May, Jun, 2015	189	544
110	Acrelândia	Reserva Porto Dias	-66.78937; -10.00262	Jan, 2015	6	544
127	Acrelândia	Reserva Porto Luiz	-66.95565; -9.94523	Jan, 2015	0	209
332	Pacajá	Invasão (Cururuí)	-50.32755; -3.57966	Apr, 2016	5	112
343	Pacajá	Cururuí – Núcleo G	-50.29803; -3.62746	Apr, 2016	2	123
334	Pacajá	Cururuí – Núcleo F	-50.27081; -3.45995	Apr, 2016	3	189
375	Itacoatiara	Ramal do Incra	-59.11822; -3.07098	Nov, 2016	1	106
374	Itacoatiara	Ramal do Minério	-59.18300; -2.86279	Nov, 2016	11	333
93	Itacoatiara	Estr. Vila de Novo Remanso I	-59.07305; -3.09364	Nov, 2016	0	268

SIVEP - Malária

* Malaria cases - cases of malaria in the month of collection and the previous one.

** Population - number of inhabitants in the year the collection was performed.

Table 2 – Species of mosquitoes infected by *Plasmodium* spp. and number of infected mosquitoes by environment (peridomicile and forest fringe) and collection method (HLC, BS, ST).

	<i>P. vivax</i>			<i>P. falciparum</i>			<i>P. vivax + P. falciparum</i>		
	Peridomicile		Forest fringe	Peridomicile		Forest fringe	Peridomicile		Forest fringe
	HLC	BS	ST	HLC	BS	ST	HLC	BS	ST
<i>Ny. darlingi</i>	60	6	0	9	10	1	1	0	0
<i>Ny. rangeli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ny. benarrochi</i> B	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ny. konderi</i> B	0	0	0	0	0	0	0	0	1

HLC: Human landing catch; BS: Barrier screen; ST: Shannon trap.

Table 3 – Spearman’s rank correlations, non-parametric.

	FC	ED	DW	Cumulative incidence of malaria
Cumulative incidence of malaria (n=41)	(r=0.099; p=0.534)	(r=0.398; p=0.010*)	-	-
Number of <i>Ny. darlingi</i> (n=41)	(r=-0.286; p=0.069)	(r=0.026; p=0.872)	(r=0.234; p=0.142)	(r=0.554; p<0.001*)
Anopheline positivity rate (n=39)	(r=0.033; p=0.842)	(r=-0.025; p=0.881)	(r=0.274; p=0.091)	(r=0.237; p=0.147)
HBR (n=41)	(r=-0.331; p=0.035*)	(r=0.096; p=0.549)	(r=0.249; p=0.117)	(r=0.502; p<0.001*)

n corresponds to number of observations without outliers and that were used to correlation analyses. FC: percentage forest cover; ED: edge density; DW: distance between the site of HLC to the nearest water collection. * Significance level (p) less than 5%.

Table 4 – Binomial negative regression analysis. P value for association between the number of *Nyssorhynchus darlingi* collected in peridomicile per 12h and 3-hours collection intervals.

Time period	Incidence	Std. Err.	IRR	p value
18 h:00 – 21 h:00	0.368		1.00	
21 h:00 – 0 h:00	0.338	0.295	0.92	0.787
0 h:00 – 3 h:00	0.209	0.184	0.57	0.081
3 h:00 – 6 h:00	0.085	0.076	0.23	<0.001*

* Significance level (p) less than 5%.

Table 5 – Binomial negative regression analysis. P value for association between number of infected mosquitoes collected in peridomicile per 12h and 3-hours collection intervals.

Time period	Incidence	Std. Err.	IRR	p value
18 h:00 – 21 h:00	0.073		1.00	
21 h:00 – 0 h:00	0.195	2.695	2.67	0.332
0 h:00 – 3 h:00	0.512	6.800	7.00	0.045*
3 h:00 – 6 h:00	0.220	3.011	3.00	0.274

* Significance level (p) less than 5%.

5 CONCLUSÕES

Este estudo sugere que alterações de paisagem em áreas endêmicas para a malária estão relacionadas a mudanças no comportamento hematofágico dos anofelíneos e aumento dos casos de malária. As espécies *Ny. benarrochi* B e *Ny. konderi* B foram encontradas infectadas com *Plasmodium*. Estas espécies de comportamento zoofílico podem ter alterado o seu comportamento hematofágico devido a mudanças ambientais e, na presença de humanos, procuraram por refeições de sangue humano. Resultados das análises mostram que o aumento da cobertura florestal tem correlação negativa com taxa de picada humana em peridomicílio e que o aumento da densidade de borda tem correlação positiva com incidência acumulada de malária, sugerindo que desmatamentos em regiões endêmicas da Amazônia brasileira podem favorecer a dinâmica de transmissão da malária. O encontro de maior número de mosquitos infectados após a meia-noite contribui para ações de controle do vetor e enfatiza a importância do uso de mosquiteiros impregnados com inseticida.

6 REFERÊNCIAS

BARROS, F. S. M.; ARRUDA, M. E.; VASCONCELOS, S. D.; LUITGARDS-MOURA, J. F.; CONFALONIERI, U.; ROSA-FREITAS, M. G.; TSOURIS, P.; LIMA-CAMARA, T. N.; HONORIO, N. A. Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 32, p. 54–68, 2007.

BARROS, F. S. M.; ARRUDA, M. E.; GURGEL, H. C.; HONÓRIO, N. A. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, p. 643–658, 2011a.

BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A.; ARRUDA, M. E. Temporal and spatial distribution of malaria within an agricultural settlement of the Brazilian Amazon. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 159–169, 2011b.

BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A. Deforestation and Malaria on the Amazon Frontier: Larval Clustering of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Determines Focal Distribution of Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 939–953, 2015.

BAYOH, M. M.; LINDSAY, S. W. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 93, p. 375–381, 2003.

BOURKE, B. P.; CONN, J. E., OLIVEIRA, T. M. P.; CHAVES, L. S. M.; BERGO, E. S.; LAPORTA, G. Z.; SALLUM, M. A. M. Exploring malaria vector diversity on the Amazon Frontier. **Malaria Journal**, v. 17, p.1–17, 2018.

BRANQUINHO, M. S.; LAGOS, C. B. T.; ROCHA, R. M.; NATAL, D.; BARATA, J. M. S.; COCHRANE, A. H.; NARDIN, E.; NUSSENZWEIG, R. S.; KLOETZEL, J. K. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 391–394, 1993.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; ALVARENGA, D. A. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; ABREU, F. V. S.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; MITIS, M. C. S.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRITO, C. F. A.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malária caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de

Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Global Health**, v. 5, p. 1038–1046, 2017.

CARLOS, B. C.; RONA, L. D.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, p. 1–13, 2019.

CASTRO, M. C.; MONTE-MÓR, R. L.; SAWYER, D. O.; SINGER, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2452–2457, 2006.

CASTRO, M. C.; SINGER, B. H. Meio ambiente e saúde: metodologia para análise especial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v. 24, n. 2, p. 247–262, 2007.

CHAVES, L. S. M.; CONN, J. E.; LÓPEZ, R. V. M.; SALLUM, M. A. M. Abundance of impacted forest patches less than 5 km² is a key driver of the incidence of malaria in Amazonian Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–11, 2018.

CHRISTIANSEN-JUCHT, C.; PARHAM, P. E.; SADDLER, A.; KOELLA, J. C.; BASÁÑEZ, M. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s.. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 2–10, 2014.

CONN, J.E.; WILKERSON, R.C.; SEGURA, M. N. O.; SOUZA, R. T. L.; SCHILCHTING, C. D.; WIRTZ, R. A.; PÓVOA, M. M. Emergence of neotropical malaria vectors facilitated by human migration and changes in land use. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 18–22, 2002.

DEANE, L.; VERNIN, C. S.; DAMASCENO, R. G. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de Provas de precipitina. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 2, n. 3, p. 793–808, 1949.

DUARTE, A. M. R. C.; PEREIRA, D. M.; PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; URBINATTI, P. R.; RIBEIRO, A. F.; MELLO, M. H. S. H.; MATOS, M. O.; MUCCI, L. F.; FERNANDES, L. N.; NATAL, D.; MALAFRONTTE, R. S. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1–6, 2013.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 284, p. 1–18, 2016.

FLAHAULT, A.; CASTANEDA, R. R.; BOLON, I. Climate change and infectious diseases. **Public Health Reviews**, v. 37, n. 21, p. 1–3, 2016.

FOLEY, D. H.; HARRISON, G.; MURPHY, J. R.; DOWLER, M.; RUEDA, L. M.; WILKERSON, R. C. Mosquito bisection as a variable in estimates of PCR-derived malaria sporozoite rates. **Malaria Journal**, v. 11, p. 1–7, 2012.

FOLEY, D. H.; LINTON, Y. M.; RUIZ-LOPEZ, J. F.; CONN, J. E.; SALLUM, M. A.; PÓVOA, M. M.; BERGO, E. S.; OLIVEIRA, T. M.; SUCUPIRA, I.; WILKERSON, R. C. Geographic distribution, evolution, and disease importance of species within the Neotropical *Anopheles albitarsis* Group (Diptera, Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 1, p. 168–181, 2014.

GITHEKO, A. K.; LINDSAY, S. W.; CONFALONIERI, U. E.; PATZ, J. A. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1136–1147, 2000.

GRIFFING, S. M.; TAUIL, P. L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L.A. historical perspective on malaria control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 701–718, 2015.

GRIGG, M. J.; SNOUNOU, G. *Plasmodium simium*: A Brazilian focus of anthropozoonotic vivax malaria? **Lancet Global Health**, v. 5, p. 961–962 2017.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1–13, 2011.

HOCHMAN, G.; MELLO, M. T. B.; SANTOS, P. R. E. Malaria in pictures: images from Brazil's Public Health campaigns in the first half of the Twentieth Century. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 9, p. 233–273, 2002.

ILACQUA, R. C.; CHAVES, L. S. M.; BERGO, E. S.; CONN, J. E.; SALLUM, M. A. M.; LAPORTA, G. Z. A method for estimating the deforestation timeline in rural settlements in a scenario of malaria transmission in frontier expansion in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 9: e170522, 2018.

KIPANGA, P. N.; OMONDI, D.; MIREJI, P. O.; SAWA, P.; MASIGA, D. K.; VILLINGER, J. High-resolution melting analysis reveals low *Plasmodium* parasitaemia infections among microscopically negative febrile patients in western Kenya. **Malaria Journal**, v. 13, p. 2–8, 2014.

KOELLA, J. C.; SORENSEN, F. L.; ANDERSON, R. A. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. **The Royal Society**, v. 265, p. 763–768, 1998.

KWEKA, E.; KIMARO, E. E.; MUNGA, S. Effect of Deforestation and Land Use Changes on Mosquito Productivity and Development in Western Kenya Highlands: Implication for Malaria Risk. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. 4, 2016.

LAPORTA, G. Z.; BURATTINI, M. N.; LEVY, D.; FUKUYA, L. A.; OLIVEIRA, T. M. P.; MASELLI, L. M. F.; CONN, J. E.; MASSAD, E.; BYDŁOWSKI, S. P.; SALLUM, M. A. M. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? **Malaria Journal**, v. 14, p. 1–12, 2015.

MARRELLI, M. T.; MALAFRONTI, R. S.; SALLUM, M. A. M.; NATAL, D. *Kerteszia* subgenus associated with the Brazilian Atlantic forest: current knowledge and future challenges. **Malaria Journal**, v. 6, p. 1–8, 2007.

MORENO, M.; SAAVEDRA, M. P.; BICKERSMITH, S. A.; PRUSSING, C.; MICHALSKI, A.; TONG RIOS, C.; VINETZ, J. M.; CONN, J. E. Intensive trapping of blood-fed *Anopheles darlingi* in Amazonian Peru reveals unexpectedly high proportions of avian blood-meals. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 11, n. 2: e0005337, 2017.

MOUTINHO, P. R.; GIL, L. H. S.; CRUZ, R. B.; RIBOLLA, P. E. M. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. **Malaria Journal**, v. 10, p. 1–12, 2011.

NEVES, A.; URBINATTI, P. R.; MALAFRONTI, R. S.; FERNANDES, A.; PAGANINI, W. S.; 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 Tropica**, v. 125, p. 102–106, 2013.

OLIVEIRA, E. S. D. O combate à malária em Florianópolis e suas implicações ambientais. **Tempos Históricos**, v. 15, p. 405–429, 2011.

OLIVEIRA, C. D.; TADEI, W. P.; ABDALLA, F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARINOTTI, O. Multiple blood meals in *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 2, p. 351–358, 2012.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v.9, n. 115, p. 2–15, 2010.

PARMAKELIS, A.; RUSSELLO, M. A.; CACCONI, A.; MARCONDES, C. B.; COSTA, J.; FORATTINI, O. P.; SALLUM, M. A. M.; WILKERSON, R. C.; POWEL, J. R. Short report: Historical analysis of a near disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p. 176–178, 2008.

PEREIRA-DA-SILVA, L. H.; OLIVEIRA, V. E. G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 49–63, 2002.

PIMENTA, P. F. P.; ORFANO, A. S.; BAHIA, A. C.; DUARTE, A. P. M.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.; MELO, F. F.; PESSOA, F. A. C.; OLIVEIRA, G. A.; CAMPOS, K. M. M.; VILLEGAS, L. M.; RODRIGUES, N. B.; NACIF-PIMENTA, R.; SIMÕES, R. C.; MONTEIRO, W. M.; AMINO, R.; TRAUB-CSEKI, Y. M.; LIMA, J. B. P.; BARBOSA, M. G. V.; LACERDA, M. V. G.; TADEI, W. P.; SECUNDINO, N. F. C. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23–47, 2015.

PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S. M.; ARAUJO, M. P.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A. C. F. S.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–634, 2014.

PÓVOA, M. M.; SOUZA, R. T. L.; LACERDA, R. N. L.; ROSA, E. S.; GALIZA, D.; SOUZA, J. R.; WIRTZ, R. A.; SCHLICHTING, C. D.; CONN, J. E. The importance of *Anopheles albitalarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 163–168, 2006.

PRUSSING, C.; MORENO, M.; SAAVEDRA, M. P.; BICKERSMITH, S. A.; GAMBOA, D.; ALAVA, F.; SCHLICHTING, C. D.; EMERSON, K. J.; VINETZ, J. M.; CONN, J. E. Decreasing proportion of *Anopheles darlingi* biting outdoors between long-lasting insecticidal net distributions in peri-Iquitos, Amazonian Peru. **Malaria Journal**, v. 17:86, 2018.

ROSSATI, A.; BARGIACCHI, O.; KROUMOVA, V.; ZARAMELLA, M.; CAPUTO, A.; GARAVELLI, P. L. Climate, environment and transmission of malaria. **Le Infezioni in Medicina**, n. 2, p. 93–104, 2016.

SAMPAIO, V. S.; SIQUEIRA, A. M.; ALECRIM, M. G. C.; MOURÃO, M. P. G.; MARCHESINI, P. B.; ALBUQUERQUE, B. C.; NASCIMENTO, J.; FIGUEIRA, E. A. G.; ALECRIM, W. D.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G. Malaria in the state of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 4–11, 2015.

SAWYER, D. R. Malaria on the Amazon frontier: economic and social aspects of transmission and control. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 342–345, 1986.

SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTTE, R. S.; SILVA, N. S.; JUNCANSES, C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M.U. Malaria on the Amazonian Frontier: Transmission Dynamics, Risk Factors, Spatial Distribution, and Prospects for Control. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 624–635, 2008.

SINGER, B.H.; CASTRO, M. C. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 954, p. 184–222, 2011.

SILVA-NUNES, M. Impacto de alterações ambientais na transmissão da malária e perspectivas para o controle da doença em áreas de assentamento rural da Amazônia Brasileira. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 603–622, 2010.

SINKA, M. E.; RUBIO-PALIS, Y.; MANGUIN, S.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. G.; BOECKEL, T. V.; KABARIA, C. W.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–26, 2010.

SPEARMAN, C. The Proof and Measurement of Association between Two Things. **The American Journal of Psychology**, v. 15, n. 1, p. 72-101, 1904.

STATA CORP. *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC, 2017.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 59, n. 2, p. 325–35, 1998.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 87-94, 2000.

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

VITTOR, A. Y.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; LOZANO, W. S.; PINEDO-CANCINO, V.; PATZ, J. A. The Effect of Deforestation on the Human-biting Rate of *Anopheles darlingi*, the primary Vector of Falciparum Malaria in the Peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 3–11, 2006.

VITTOR, A. Y.; PAN, W.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; SÁNCHEZ-LOZANO, W.; PINEDO, V. V.; SALAS-COBOS, E.; FLORES, S.; PATZ, J. A. Linking Deforestation to Malaria in the Amazon: Characterization of the Breeding Habitat of the Principal Malaria Vector, *Anopheles darlingi*. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 5–12, 2009.

WOLFARTH-COUTO, B.; DA SILVA, R. A.; FILIZOLA, N. Variability in malária cases and the association with rainfall and rivers water levels Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. 1–14, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> (Accessed on January 27, 2019).

YASUOKA, J.; LEVINS, R. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 450–460, 2007.

CAPÍTULO 2

Diversidade bacteriana associada ao abdômen de *Nyssorhynchus darlingi* e
Nyssorhynchus braziliensis

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO MOSQUITO

Comunidades microbianas (bactérias, fungos, vírus e protozoários) são encontradas no intestino, nas glândulas salivares e nos órgãos reprodutores de mosquitos. Bactérias da microbiota possuem uma relação simbiótica com o mosquito e contribuem para a digestão, nutrição, reprodução e resistência a patógenos (DOUGLAS, 2011; WANG et al., 2011; MINARD et al., 2013; SHARMA et al., 2013). Elas participam do processo de síntese da matriz peritrófica (RODGERS et al., 2017), atuam como barreira natural através do estímulo à resposta imune (DONG et al., 2009) e, em anofelíneos, podem interferir no desenvolvimento do ciclo do *Plasmodium* (BOISSIÈRE et al., 2012).

A composição das comunidades bacterianas nos mosquitos difere-se nos diferentes tecidos do organismo do inseto (glândulas salivares, ovários e intestinos) e nos estágios de desenvolvimento (larva e adulto) (CHAVSHIN et al., 2014; TCHIOFFO et al., 2016). Comunidades bacterianas presentes na água de criadouros apresentam maior diversidade do que as comunidades das microbiotas de larvas e pupas. (WANG et al., 2011; BASCUÑÁN et al., 2018). O criadouro é fundamental para a constituição da comunidade bacteriana nos diferentes tecidos de mosquitos emergentes (TCHIOFFO et al., 2016). Localidade e sazonalidade influenciam diretamente a formação de criadouros e conseqüentemente, alteram a diversidade da microbiota (AKORLI et al., 2016). Devido à reorganização do intestino durante a metamorfose, a microbiota intestinal de mosquitos adultos emergentes apresenta menor diversidade bacteriana quando comparado às formas imaturas (WANG et al., 2011).

As bactérias da microbiota intestinal são adquiridas por transmissão vertical, no criadouro, durante o desenvolvimento larval, e na alimentação dos mosquitos adultos, a qual inclui a ingestão de açúcares e de sangue de vertebrados (GIMONNEAU et al., 2014;

TCHIOFFO et al., 2016; AKORLI et al., 2016). Logo após um repasto sanguíneo, há um aumento da proliferação bacteriana da microbiota intestinal em até 40 vezes e uma diminuição da sua diversidade. O restauro da homeostasia bacteriana ocorre após 48h, quando 98% das bactérias são eliminadas juntamente com o *bolus* sangue (PUMPUNI et al., 1996; RODGERS et al., 2017).

Dentre as bactérias que constituem a microbiota intestinal dos mosquitos, estão bactérias habitantes do solo (ex. *Bacillus*, *Lysobacter*) e associadas a plantas (ex. *Asaia*, *Delftia*) e animais (ex. *Staphylococcus*, *Acinetobacter*) (NGO et al., 2016). Em geral, os filos mais abundantes são Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (GIMONNEAU et al., 2014; NGO et al., 2015). Apesar de existirem diversos estudos sobre diversidade bacteriana da microbiota intestinal de mosquitos que atuam como vetores de *Plasmodium* em regiões da África e da Ásia, pouco é conhecido sobre a microbiota do vetor primário Amazônico, *Nyssorhynchus darlingi* (TERENIUS et al., 2008; BASCUÑÁN et al., 2018).

Bactérias simbióticas da microbiota de mosquitos são candidatas na atuação do controle da malária através da paratransgênese. O conceito de paratransgênese é definido como o uso de microrganismos simbioses geneticamente modificados que liberam moléculas efetoras antipatogênicas. Bactérias candidatas a essa técnica precisam possuir algumas características: (1) serem de fácil cultivo e manipulação genética; (2) serem transmitidas de geração em geração; (3) serem capazes de expressar moléculas antipatogênicas; (4) terem a capacidade de se espalharem na população; (5) terem uma relação estável com o hospedeiro invertebrado (WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015). *Asaia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Thorsellia* são possíveis candidatas à paratransgênese em mosquitos vetores de *Plasmodium* (VILLEGAS e PIMENTA, 2014; MANCINI et al., 2016; RAHARIMALALA et al., 2016).

Metodologias de cultivo-dependente e independente são utilizados para determinar a diversidade de bactérias presentes em determinado tecido do mosquito (NGO et al., 2015; GIMONNEAU et al., 2014). Como nas técnicas de cultivo independente é possível estudar bactérias ainda não cultiváveis, essas técnicas permitem um estudo mais amplo da microbiota. Análises de regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA são utilizadas para estudo de diversidade bacteriana através de técnicas de PCR convencional seguida por clonagem, PCR-TTGE e Sequenciamento de Segunda Geração (TERENIUS et al., 2008; GIMONNEAU et al., 2014; NGO et al., 2016; BASCUÑÁN et al., 2018).

1.2 MICROBIOTA INTESTINAL E *Plasmodium*

A cada etapa de desenvolvimento do *Plasmodium* no vetor, a população do parasito é reduzida. Estima-se que dos milhares de gametócitos ingeridos durante um repasto sanguíneo, apenas cinco sobrevivem para oocistos (SMITH et al., 2014). Apesar dos mecanismos de modulação não estarem bem elucidados, sabe-se que bactérias presentes no intestino médio dos mosquitos vetores de *Plasmodium* são capazes de modular a infecção do patógeno no mosquito, ou através da produção de compostos bacterianos, ou pela indução da resposta imune do vetor (DONG et al., 2009; BAHIA et al., 2014; ROMOLI e GENDRIN, 2018). Assim, estudos mostram que bactérias da microbiota intestinal podem inibir o ciclo de desenvolvimento do parasito no vetor (CIRIMOTICH et al., 2011; BANDO et al., 2013; TCHIOFFO et al., 2013, 2016; GENDRIN et al., 2015; KALAPPA et al., 2018).

Anopheles gambiae quando expostos a um isolado bacteriano do gênero *Enterobacter*, tornam-se menos susceptíveis à infecção por *P. falciparum* pelo fato da bactéria inibir o desenvolvimento do ciclo do parasito por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (CIRIMOTICH et al., 2011). Já *Serratia marcescens* pode interferir no ciclo do *Plasmodium* durante a invasão do oocineto no epitélio intestinal do mosquito (BANDO et al., 2013).

Apesar da cepa de *Wolbachia*, comum em outros artrópodes, não estar presente naturalmente em anofelíneos (BALDINI et al. 2014, 2018), infecções somáticas dessa cepa em *An. gambiae* mostram uma redução significativa do número de oocistos de *Plasmodium falciparum* (HUGHES et al., 2011).

Estudos verificando a sensibilidade dos mosquitos à infecção por *Plasmodium*, após alteração da microbiota, também já foram relatados. *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi* após serem tratados com antibióticos, apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *P. falciparum* e *Plasmodium berghei*, respectivamente (DONG et al., 2009; KALAPPA et al., 2018), indicando que a sensibilidade observada é resultante da ausência das bactérias no intestino médio. Antibióticos ingeridos durante o repasto sanguíneo também são capazes de interferir na microbiota do mosquito e conseqüentemente, aumentar a susceptibilidade do vetor à infecção por parasitos da malária (GENDRIN et al., 2015).

2 OBJETIVOS

- Citar os gêneros bacterianos associados ao abdômen de *Nyssorhynchus darlingi* e *Nyssorhynchus braziliensis*;
- Relatar as diferenças entre a diversidade bacteriana presente em abdômen de *Ny. darlingi* infectado e não infectado por *Plasmodium*;
- Verificar se gêneros bacterianos candidatos a paratransgênese estão associadas ao abdômen de *Ny. darlingi* e *Ny. braziliensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Mosquitos foram capturados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Lábrea, Machadinho D'Oeste e Humaitá, conforme metodologia descrita no tópico 4.1 da página 27 desta tese. Após a bisseção dos mosquitos em cabeça/tórax e abdômen foi realizada a extração de DNA. Extrações de DNA de cabeça mais tórax foram realizadas segundo metodologia descrita em LAPORTA et al. (2015). O produto dessa extração foi utilizado nos ensaios de detecção de *Plasmodium* spp.

Abdomens foram lavados duas vezes em etanol 70% e água ultrapura. As extrações foram realizadas individualmente para cada abdômen, através do kit de extração DNeasy Power Soil (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, ou pelo protocolo descrito em LAPORTA et al. (2015), salvo modificações. Cada abdômen foi macerado em 500 µL de tampão TEN (2 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 5 mM NaCl) com pérolas de zircônio/sílica 1 mm (Biospec). A solução foi homogeneizada no equipamento BeadBlaster24 (Benchmark) durante 4 ciclos de 40 seg de agitação (4 m/s) e 20 seg de descanso. Ao sobrenadante, adicionou-se 5 µL de SDS 10% (Promega) e 3 µL de proteinase K a 20 mg/mL (Promega). Homogeneizou-se por inversão e incubou-se a 56 °C por 1 h. Foram adicionados 150 µL de NaCl 5M (Synth) e agitou-se a solução vigorosamente por 15 seg. A mistura foi centrifugada a 20 °C por 10 min a 13000 rpm. Foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado (Synth) ao sobrenadante e homogeneizou-se a mistura por inversão. Incubou-se a solução por 48 h a -20 °C e depois a centrifugou por 10 min a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado por inversão e 1 mL de etanol 70% (Synth) foi adicionado ao precipitado. Homogeneizou-se por inversão e a solução foi centrifugada a 20 °C por 5 min a

13000 rpm. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais três vezes. Na última lavagem, descartou-se o sobrenadante e para evaporação completa do etanol, o microtubo foi inserido no concentrador a vácuo (Concentrator 5301 – Eppendorf) por 10 min a temperatura ambiente. Adicionou-se ao precipitado, 20 µL do tampão TE (2 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA) e o produto da extração foi acondicionado a -80 °C.

Em ambos os protocolos, foram realizadas extrações de abdômen de anofelíneos infectados e não infectados. Após as extrações, o DNA foi quantificado por fluorescência com o kit Qubit™ ds DNA HS Assay (Life Technologies), conforme instruções do fabricante.

3.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO V4

Amostras de DNA extraído e quantificado foram enviadas à empresa BPI (Biotecnologia, Pesquisa e Inovação) para geração da biblioteca e sequenciamento. Fragmento do gene 16S rRNA foi amplificado com pares de *primers* que compreendem a região hipervariável V4 (CAPORASO et al., 2011). Os *primers forward* e *reverse* utilizados possuem a sequência do adaptador Illumina, a sequência específica para anelamento com a região 16S rRNA e uma sequência estabilizadora. Cada primer reverse utilizado contém uma sequência *barcode* única, o que permite diferenciar as amostras após o sequenciamento.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 20 µL, contendo 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USL), 0,3 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) (Tabela), 2 µL de DNA genômico e água ultrapura. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 29 ciclos de 94 °C por 45 seg, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 seg e uma extensão final de 72 °C por 10 min. As reações foram realizadas em triplicata e em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (AppliedBiosystems). Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com Gel Red (Uniscience).

Tabela – Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados na amplificação da região V4 do gene 16S.

Primer	Sequência do primer (5' – 3')
Forward	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATxxxxxxxxxxxx ⁽¹⁾ AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT

Nota:

⁽¹⁾Refere-se à sequência do barcode.

3.3 BIBLIOTECA DE DNA E SEQUENCIAMENTO

Para a remoção de fragmentos muito pequenos e restos de *primers*, os produtos de PCR foram purificados utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter). Após a purificação, a quantificação por PCR em Tempo Real com o Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal) foi realizada em termociclador QuantStudio 3 Real Time (AppliedBiosystems), segundo instruções do fabricante.

Todas as amostras foram normalizadas a 3 nM e um pool equimolar de DNA foi gerado. Esse pool foi utilizado para a realização do sequenciamento de nova geração (NGS). O sequenciamento foi conduzido no sistema IlluminaMiSeq (Illumina® Sequencing) com o kit MiSeqReagent Micro v2 (300 ciclos).

3.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS SEQUENCIADOS

As leituras *paired-end* geradas pelo sequenciamento Illumina foram pareadas considerando uma sobreposição mínima de 20 pb. Para o pareamento foi utilizado o comando *join_paired_ends.py* no programa QIIME v.1.9 (CAPORASO et al., 2010). Após o pareamento, as sequências foram filtradas com base no comprimento (230 pb) e taxa de erros do sequenciamento. Após filtragem (*fastq_filter*), descarte de *singletons* (*sortbysize*) e

remoção de sequências quiméricas, foi realizado o agrupamento das sequências em OTUs (*OperationalTaxonomicUnits*) (*cluster_otus*) pelo programa USEARCH v.11 (EDGAR, 2010, 2013). Similaridade de pelo menos 97% entre as sequências foi o critério adotado para a formação das OTUs. O banco de dados SILVA v.128 (99% *consensus*) (PRUESSE et al., 2007) foi utilizado para atribuição da taxonomia.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para verificar a diversidade bacteriana associada ao abdômen de cada amostra (diversidade α), foram obtidos valores de riqueza (OTUs observadas) e o índice de diversidade Shannon-Wiener. Riqueza consiste somente no número de espécies/OTUs observadas em cada amostra. Já os índices de diversidade levam em consideração tanto a riqueza de espécies quanto a equabilidade. Assim, o índice de Shannon-Wiener pondera a abundância relativa de cada espécie na amostra. Teste Wilcoxon-Mann-Whitney (WILCOXON, 1945; MANN e WHITNEY, 1947) foi realizado para verificar se algum grupo (infectado e não infectado) apresentou maior diversidade bacteriana. Valores de riqueza e índice Shannon-Wiener foram obtidos por meio do programa QIIME 2 (BOLYEN et al., 2018). Para o teste Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado o software STATA/IC 15.1 (STATA CORP., 2017).

Diversidade β também foi estimada. Esse índice foi utilizado para averiguar se a diversidade bacteriana associada ao abdômen de mosquitos infectados se difere da diversidade bacteriana associada ao abdômen de mosquitos não infectados. O cálculo da diversidade β entre os grupos infectado e não infectado foi realizado utilizando a distância Unifrac não ponderada (LOZUPONE e KNIGHT, 2005) com profundidade de amostragem de 1500 sequências. Distância Unifrac não ponderada é uma medida qualitativa que compara

comunidades biológicas por meio de informações filogenéticas. O programa QIIME 2 (BOLYEN et al., 2018) foi utilizado para cálculo desse índice de diversidade.

Análise de coordenadas principais (PCoA) e análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001) foram realizadas por meio do software QIIME 2 (BOLYEN et al., 2018). PCoA foi obtido por meio da distância Unifrac não ponderada e PERMANOVA foi utilizada para verificar se as distâncias entre as amostras em um grupo são mais semelhantes entre si do que quando comparadas com as amostras de outro grupo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MANUSCRITO 2

***Asaia* (Rhodospirillales: Acetobacteraceae) and *Serratia* (Enterobacterales: Yersiniaceae) associated with *Nyssorhynchus braziliensis* and *Nyssorhynchus darlingi* (Diptera: Culicidae)**

Tatiane M. P. Oliveira¹, Sabri S. M. A. Al-Sanabani², Maria Anice M. Sallum¹

Manuscrito submetido ao Journal of Medical Entomology.

T. M. P. Oliveira
Departamento de Epidemiologia
Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira César
São Paulo, SP, CEP 01246-904
Phone: +55 11 3061-7876
E-mail: porangaba@usp.br

***Asaia* (Rhodospirillales: Acetobacteraceae) and *Serratia* (Enterobacterales:
Yersiniaceae) associated with *Nyssorhynchus braziliensis* and *Nyssorhynchus darlingi*
(Diptera: Culicidae)**

Tatiane M. P. Oliveira¹, Sabri S. Sanabani², Maria Anice M. Sallum¹

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

² LIM-3, Hospital das Clínicas FMUSP, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Author's email:

Tatiane P. M. Oliveira: porangaba@usp.br

Sabri S. Sanabani: sabyem_63@yahoo.com

Maria Anice M. Sallum: masallum@usp.br

Abstract

Midgut transgenic bacteria can be used to express and deliver anti-parasite molecules in malaria vector mosquitoes to reduce transmission. Hence, it is necessary to know the symbiotic bacteria of the microbiota of the midgut to identify those that can be used to interfering in the vector competence of a target mosquito population. The bacterial communities associated with abdomen of *Nyssorhynchus braziliensis* (Chagas) (Diptera: Culicidae) and *Nyssorhynchus darlingi* (Root) (Diptera: Culicidae) were identified using Illumina NGS sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene. Wild females were collected in rural and periurban communities in the Brazilian Amazon. Proteobacteria was the most abundant group identified in both species. *Asaia* (Rhodospirillales: Acetobacteraceae) and *Serratia* (Enterobacterales: Yersiniaceae) were detected in *Ny. braziliensis* for the first time, and its presence was confirmed in *Ny. darlingi*.

Keywords: Vectors, Malaria, Amazon

1. Introduction

Although the malaria burden has decreased worldwide, the disease still imposes an enormous suffering for human populations in the majority of endemic countries. In addition, the disease continuously threatens the public health, and cause a negative impact in the socioeconomic growth of poor communities (Gallup and Sachs 2001, Shretta et al. 2017). In addition, a recent study by Haakenstad et al. (2019) demonstrated that in 2016, US\$ 4.3 billion was spent on malaria worldwide, and that will reach US\$ 6.6 billion annually in 2020. Although the intensive worldwide controlling effort, sustaining achievement in malaria control will require an enormous effort from endemic countries, and international funding support for the programs (Shretta et al. 2017, Haakenstad et al. 2019).

Currently, the main pillars for malaria control relies on the commodities targeting anopheline vector species, and detection and treatment of *Plasmodium* spp. human infection (Baird 2017, Shretta et al. 2017). However, increasing artemisinin combination therapies (ACTs) threatens *Plasmodium falciparum* (Welch) malaria control (Menard and Dondorp 2017). Controlling strategies targeting on Anophelinae vector species are primarily focused on decreasing human exposure to mosquito bites by the use of insecticide-treated bed nets, and insecticide indoor residual spraying (Baird 2017, Shretta et al. 2017, WHO 2018). The effectivity of vector control technologies is threatened by the emergence of mosquito resistance to insecticides (Baird 2017).

New technological commodities, such as the genetic manipulation of organisms (Bilgo et al. 2018), are being developed for controlling vector-borne diseases. The employment of transgenic bacteria from the adult mosquito midgut is a potential tool to be employed for decreasing vector competence and vectorial capacity of vector species involved in a pathogen transmission (Villegas and Pimenta 2014, Kotnis and Kuri 2016). The symbiotic bacteria (Damiani et al. 2010), viruses (Ren et al. 2008), and fungi (Fang et al. 2011), which are present in a large array of mosquito species, are potential tools for blocking a pathogen dispersion into a mosquito. In this context, the paratransgenesis of microbial organisms by genetically manipulating the insect endosymbiotic bacteria is a promising approach (Durvasula et al. 1997, Wang and Jacobs-Lorena 2013, Bilgo et al. 2018). Among the symbiotic bacteria found in anopheline vector species, the *Asaia* (Rhodospirillales: Acetobacteraceae), *Pantoea* (Enterobacterales: Erwiniaceae), *Serratia* (Enterobacterales: Yersiniaceae), *Pseudomonas* (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae) and *Thorsellia* (Enterobacterales: Thorselliaceae) bacteria are candidates for paratransgenesis (Villegas and Pimenta 2014, Mancini et al. 2016, Raharimalala et al. 2016).

Asaia bacteria was found in field-collected specimens of *Anopheles stephensi* (Liston), *Anopheles gambiae* (Giles), *Anopheles funestus* (Giles), *Anopheles coustani* (Laveran), *Anopheles maculipennis* (Meigen), *Anopheles superpictus* (Grassi), *Anopheles fluviatilis* (James), *Anopheles dthali* (Patton), *Aedes albopictus* (Skuse), *Aedes aegypti* (Linnaeus), species of the *Culex pipiens* complex (Favia et al. 2007, Crotti et al. 2009, Manguin et al. 2013, Rami et al. 2018), and recently in *Nyssorhynchus darlingi* (Root) (Alonso et al. 2019). Species of the *Asaia* can colonize mosquito salivary gland, midgut, and male and female reproductive apparatus (Favia et al. 2007). Bacteria of the genus *Serratia* can be employed for malaria control (Koosha et al. 2018). The genetically modified AS1 isolate of the *Serratia* was able to inhibit the development of *P. falciparum* in *An. gambiae* through the secretion of anti-*Plasmodium* proteins molecules. Currently, the *Serratia* was found in *Anopheles albimanus* (Wiedemann) (Gonzalez-Ceron et al. 2003), *Anopheles stephensi* (Rani et al. 2009), and *Ny. darlingi* (Arruda et al. 2017).

Recent findings clearly show the importance of mosquito microbiota and the potential of the organisms to reduce the vector competence of a mosquito population by interfering in the sexual life cycle of *P. falciparum* and *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti) (Gonzalez-Ceron et al. 2003, Cirimotich et al. 2011). However, the bacterial diversity of the microbiota of a few species have been investigated. Additional studies can provide important information regarding microbiota of primary and secondary Anophelinae species, including those of Neotropical Region (Terenius et al. 2008, Arruda et al. 2017, Bascuñán et al. 2018, Alonso et al. 2019). This study aims to provide further information about the bacteria associated with abdomen of field-collected females of *Ny. darlingi*, the primary vector, and *Nyssorhynchus braziliensis* (Chagas), the secondary vector species involved in the malaria transmission cycle in the Amazon river basin.

2. Materials and methods

Mosquito female of *Ny. braziliensis* was collected in the municipality of Humaitá (Amazonas State) in VII-2016, and *Ny. darlingi* was collected in Cruzeiro do Sul (Acre State) in IV-2015. Females were bisected in head/thorax and abdomen. Genomic DNA of the abdomen of female of *Ny. braziliensis* was extracted employing Laporta et al.'s (2015) protocol. The PowerSoil DNA kit (MO BIO Laboratories™) was employed for DNA extraction of *Ny. darlingi* abdomen, following the manufacturer's instructions.

The V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified according to Caporaso et al. (2011). Sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina) with MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles), according to the manufacturer's instructions. The PANDAseq v.2.9 software (Masella 2012) was used to assemble the forward and reverse reads using default parameters. The UCHIME algorithm (Edgar 2011) was employed to detect and remove any recombinant sequences from the Illumina sequence data. A minimum of 97% cutoff of sequence similarity identity was used to define the taxonomic classification of each read. The EzBioCloud (Yoon et al. 2017), with Mothur algorithm, was used to calculate the diversity indices of bacterial communities, whereas the Shannon diversity index was employed to characterize species diversity in the Illumina sequence data set.

3. Results and discussion

The abdomen of forty-seven anopheline females were sequenced to obtain information of the V4 region of the 16S rRNA gene (unpublished data). In the current study, the microbiota associated with the abdomen of two females are reported. After quality filtering, 32,008 reads were clustered into OTUs at 97% similarity threshold. The results from the rarefaction curve analysis showed that the sequencing depth adopted was adequate to detect all bacteria OTUs in both female specimens. Fifty-eight bacterial OTUs of eight phyla were

identified in *Ny. braziliensis*, and 79 OTUs of six phyla were detected in *Ny. darlingi*. Proteobacteria was the phylum dominant in all samples (Supp. Table). At the genus level, *Escherichia* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae) was the dominant group in the abdomen of *Ny. braziliensis* and *Ny. darlingi* (Figure). *Escherichia* and *Enterobacteriaceae_uc* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae) were the most abundant genera detected in *Ny. braziliensis*. The mean value of the Shannon diversity index was 3.14 for *Ny. braziliensis* and 3.96 for *Ny. darlingi*.

Our results revealed low relative abundance of the genera *Asaia* (0.03%) and *Serratia* (0.09%) in *Ny. braziliensis*, whereas in *Ny. darlingi* both genera were found in higher abundance (*Asaia* - 3.35%, *Serratia* - 1.02%). The presence of *Asaia* and *Serratia* have been previously reported in *Ny. darlingi* (Arruda et al. 2017, Alonso et al. 2019), whereas they were identified in *Ny. braziliensis* for the first time. The presence of bacteria in other Anopheline species (Gonzalez-Ceron et al. 2003, Lindh et al. 2005, Favia et al. 2007, Rani et al. 2009, Manguin et al. 2013, Arruda et al. 2017, Rami et al. 2018) show that they are capable of colonizing a wide range of mosquito because they share stable symbiotic relationship with these vector species. However, further investigations will be necessary to fill gaps on knowledge of the relationships between mosquito species and their associated symbiotic bacteria before these organisms can be employed for a paratransgenic approach to control vector borne diseases. Genetically manipulated bacteria can be employed for distinct approach, i.e., to interfere with mosquito reproduction, and oogenesis and embryogenesis processes. In addition, they can be manipulated to express effector molecules to reduce vector competence or cause pathogenic effect in a mosquito population as discussed by Wilke and Marrelli (2015), including Neotropical vector species.

Acknowledgments

Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant no. 2014/26229-7].

Data statement

Sequencing data generated for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena/>) (Access numbers: ERS3411567 and ERS3411575).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Alonso, D. P., M. V. Mancini, C. Damiani, A. Cappelli, I. Ricci, M. V. N Alvarez, C. Bandi, P. E. M. Ribolla, and G. Favia. 2019.** Genome reduction in the mosquito symbiont *Asaia*. *Genome Biol. Evol.* 11(1): 1–10.
- Arruda, A., G. S. Ferreira, N. C. D Lima, A. D Santos Júnior, M. G. F Custódio, N. Benevides-Matos, L. S. Ozaki, R. G. Stabeli, and A. A. A. Silva. 2017.** A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J. Microbiology Methods.* 141: 115–117.
- Baird, J. K. 2017.** Malaria control by commodities without practical malariology. *BMC Public. Health.* 17: 590.
- Bascuñán, P., J. P. Niño-García, Y. Galeano-Castañeda, D. Serre, and M. M. Correa. 2018.** Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. *Microbiome.* 6(1): 148.

- Bilgo, E., A. Vantaux, A. Sanon, S. Ilboudo, R. K. Dabiré, M. Jacobs-Lorena, and A. Diabate. 2018.** Field assessment of potential sugar feeding stations for disseminating bacteria in a paratransgenic approach to control malaria. *Malar. J.* 17: 367.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, and P. J. Turnbaugh. 2011.** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (Suppl 1): 4516–4522.
- Cirimotich, C.M., Y. Dong, A. M. Clayton, S. L. Sandiford, J. A. Souza-Neto, M. Mulenga, and G. Dimopoulos. 2011.** Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science.* 332(6031): 855–858.
- Crotti, E., C. Damiani, M. Pajoro, E. Gonella, A. Rizzi, I. Ricci, I. Negri, P. Scuppa, P. Rossi, P. Ballarini, N. Raddadi, M. Marzorati, L. Sacchi, E. Clementi, M. Genchi, M. Mandrioli, C. Bandi, G. Favia, A. Alma, and D. Daffonchio. 2009.** *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Appl. Environ. Microbiol.* 11(12): 3252–3264.
- Damiani, C., I. Ricci, E. Crotti, P. Rossi, A. Rizzi, P. Scuppa, A. Capone, U. Ulissi, S. Epis, M. Genchi, N. Sagnon, I. Faye, A. Kang, B. Chouaia, C. Whitehorn, G. W. Moussa, M. Mandrioli, F. Esposito, L. Sacchi, C. Bandi, D. Daffonchio, and G. Favia. 2010.** Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial. Ecololgy.* 60(3): 644–654.
- Durvasula, R. V., A. Gumbs, A. Panackal, O. Kruglov, S. Aksoy, R. B. Merrifield, F. F. Richards, and C. B. Beard. 1997.** Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(7): 3274–3278.
- Edgar, R. C. 2011.** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27(16): 2194–2200.

- Fang, W., J. Vega-Rodríguez, A. K. Ghosh, M. Jacobs-Lorena, A. Kang, and R. J. St. Leger. 2011.** Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*. 331(6020): 1074–1077.
- Favia, G., I. Ricci, C. Damiani, N. Raddadi, E. Crotti, and M. Marzorati. 2007.** Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(21): 9047–9051.
- Gallup, J. L., and J. D. Sachs. 2001.** The economic burden of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64: 85–96.
- Gonzalez-Ceron, L., F. Santillan, M. H. Rodriguez, D. Mendez, and J. E. Hernandez-Avila. 2003.** Bacterial in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J. Med. Entomol.* 40(3): 371–374.
- Haakenstad, A., A. C. Harle, G. Tsakalos, A. E. Micah, T. Tao, M. Anjomshia, J. Cohen, N. Fullman, S. I. Hay, T. Mestrovic, S. Mohammed, S. M. Mousavi, M. R. Nicon, D. Pigott, K. Tran, C. J. L. Murray, and J. L. Dieleman. 2019.** Tracking spending on malaria by source in 106 countries, 2000–16: an economic modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 19: 703–716.
- Koosha, M., H. Vatandoost, F. Karimian, N. Choubdar, and M. A. Oshaghi. 2018.** Delivery of a Genetically Marked *Serratia* AS1 to Medically Important Arthropods for Use in RNAi and Paratransgenic Control Strategies. *Microb. Ecol.* 78(1): 185–194.
- Kotnis, B., and J. Kuri. 2016.** Evaluating the usefulness of paratransgenesis for malaria control. *Math Biosci.* 277:117–25.
- Laporta, G. Z., M. N. Burattini, D. Levy, L. A. Fukuya, T. M. P. Oliveira, L. M. F. Maselli, J. E. Conn, E. Massad, S. P. Bydlowski, and M. A. M. Sallum. 2015.** *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malar. J.* 14: 181.

- Lindh, J. M., O. Terenius, and I. Faye. 2005.** 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 7217–23.
- Mancini, M. V., R. Spaccapelo, C. Damiani, A. Accoti, M. Tallarita, E. Petraglia, P. Rossi, A. Cappelli, A. Capone, G. Peruzzi, M. Valzano, M. Picciolini, A. Diabaté, L. Facchinelli, I. Ricci, and G. Favia. 2016.** Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study. *Parasit. Vectors.* 9: 140.
- Manguin, S., C. T. Ngo, K. Tainchum, W. Juntarajumnong, T. Chareonviriyaphap, A. L. Michon, and E. Jumas-Bilak. 2013.** Bacterial biodiversity in midguts of *Anopheles* mosquitoes, malaria vectors in Southeast Asia, pp. 549–576. In: S. Manguin (ed), *Anopheles* mosquitoes-New insights into malaria vectors. InTech Open Access, Croatia.
- Masella, A. P. 2012.** PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics.* 13: 31.
- Menard, D., and A. Dondorp. 2017.** Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7(7): a025619.
- Raharimalala, F. N., S. Bokraa, T. Bawin, S. Boyer, and F. Francis. 2016.** Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitol. Res.* 115(4): 1391–1399.
- Rami, A., A. Raz, S. Zakeri, and N. D. Djadid. 2018.** Isolation and identification of *Asaia* sp. in *Anopheles* spp. mosquitoes collected from Iranian malaria settings: steps toward applying paratransgenic tools against malaria. *Parasit. Vectors.* 11(1): 367.
- Rani, A., A. Sharma, R. Rajagopal, T. Adak, and R. K. Bhatnagar. 2009.** Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and

culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* - an Asian malarial vector. BMC Microbiol. 9: 96.

Ren, X., E. Hoiczky, and J. L. Rasgon. 2008. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog. 4(8): e1000135.

Shretta, R., B. Zelman, M. L. Birger, A. Haakenstad, L. Singh, Y. Liu, and J. Dieleman. 2017. Tracking development assistance and government health expenditures for 35 malaria-eliminating countries: 1990–2017. Malar. J. 16: 251.

Terenius, O., C. D. Oliveira, W. D. Pinheiro, W. P. Tadei, A. A. James, and O. Marinotti. 2008. 16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. J. Med. Entomol. 45(1): 172–175.

Villegas, L. M., and P. F. P. Pimenta. 2014. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 109(5): 672–684.

Wang, S., and M. Jacobs-Lorena. 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. Trends. Biotechnol. 31(3): 185–193.

Wilke, A. B. B., M. T. Marrelli. 2015. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. Parasit. Vectors. 8: 1–9.

World Health Organization. World Malaria Report 2018. 2018. [updated 2019 January 27; cited 2019 Jan 27]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>.

Yoon, S. H., S. M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, and J. Chun. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67(5): 1613–1617.

Figure – Composition of bacteria from abdomen of *Nyssorhynchus braziliensis* and *Nyssorhynchus darlingi*. Only genera that had a relative abundance of 1% or greater are presented.

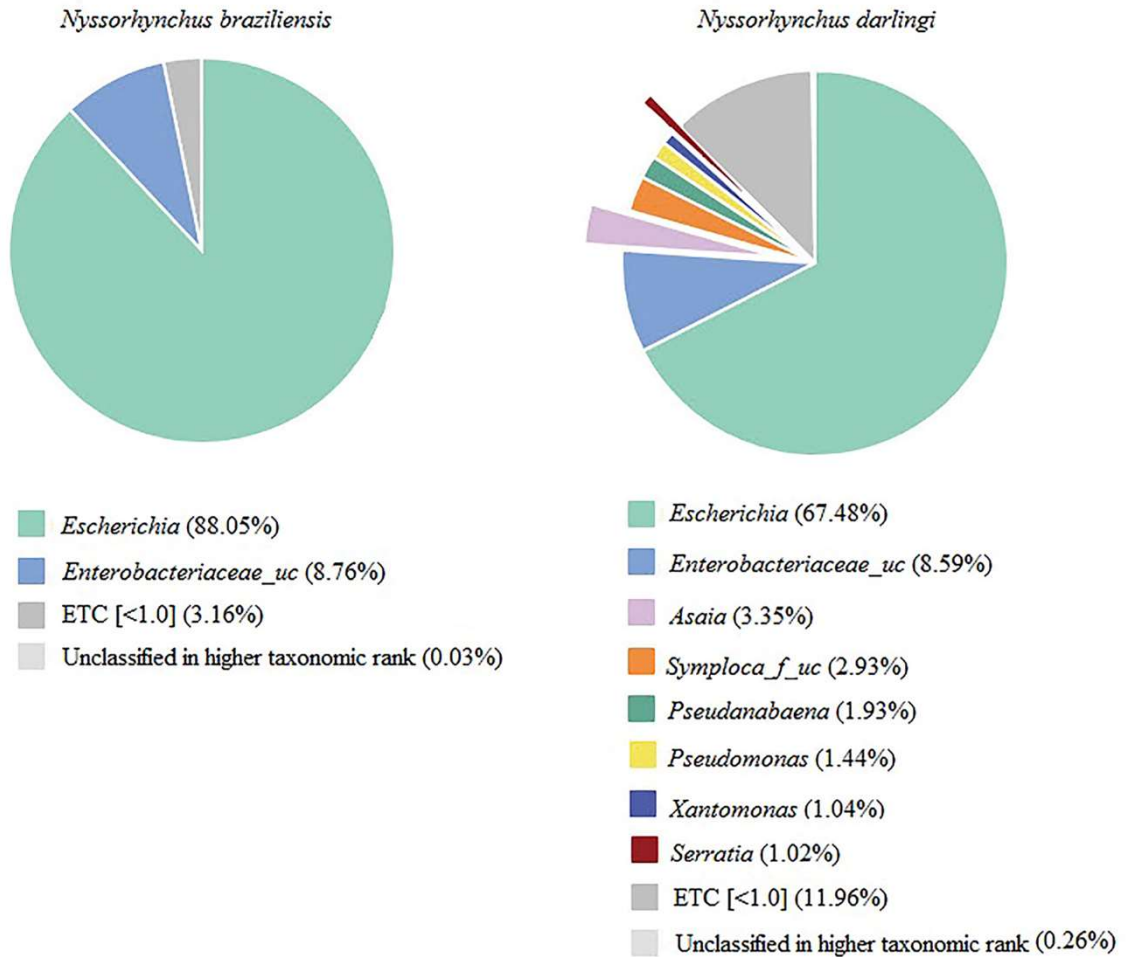


Table S – Number of sequences of each phylum in *Nyssorhynchus braziliensis* and *Nyssorhynchus darlingi*.

Phylum	<i>Nyssorhynchus braziliensis</i>	<i>Nyssorhynchus darlingi</i>
Acidobacteria	47	0
Actinobacteria	105	47
Bacteroidetes	12	80
Cyanobacteria	26	754
Deinococcus-Thermus	30	0
Firmicutes	189	312
Gemmatimonadetes	23	0
Proteobacteria	47699	7123
Verrucomicrobia	0	20

4.2 MANUSCRITO 3

Bacterial diversity associated with abdomen of naturally *Plasmodium*-infected and non-infected *Nyssorhynchus darlingi*

Tatiane M. P. Oliveira^{1#}, Sabri S. M. A. Al-Sanabani², Maria Anice M. Sallum¹

Manuscrito submetido à revista Frontiers in Genetics.

Running title: *Nyssorhynchus darlingi* abdominal bacteria

**Bacterial diversity associated with abdomen of naturally
Plasmodium-infected and non-infected *Nyssorhynchus darlingi***

Tatiane M. P. Oliveira^{1*}, Sabri S. Sanabani², Maria Anice M. Sallum¹

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

² LIM-3, Hospital das Clínicas FMUSP, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

***Correspondence:**

Tatiane M. P. Oliveira

porangaba@usp.br

Abstract

Background: The bacterial community present in the abdomen of Anophelinae mosquitoes can influence the mosquito susceptibility to *Plasmodium* infection. Bacterial culture, Temporal Temperature Gradient Electrophoresis, and Next Generation Sequencing of 16S rRNA gene have been employed to explore the bacterial diversity in mosquitoes.

Methods: We investigate the abdominal bacterial community composition of naturally *Plasmodium*-infected (*P*-positive, n = 9) and non-infected (*P*-negative n= 7) *Nyssorhynchus*

darlingi from the Brazilian Amazon Region through massive parallel sequencing of the bacterial V4 variable region of the 16S rRNA gene.

Results: Results of analysis showed bacterial richness of *Ny. darlingi* encompassed 379 OTUs of Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroides phyla that constitute the majority of the abdominal bacteria in both groups (*Plasmodium*-negative and *Plasmodium*-positive). *Escherichia / Shigella* and *Pseudomonas* were more abundant in the *Plasmodium*-positive and *Plasmodium*-negative groups, respectively. *Enterobacter* was found only in *P*-negative group. Seven genera were described for the first time to occur in *Ny. darlingi*. All statistical indices of abundance and diversity revealed no significant difference between *Plasmodium*-positive and *Plasmodium*-negative.

Conclusions: This study expanded knowledge about bacterial composition in *Ny. darlingi* and revealed that *Plasmodium*-positive and *Plasmodium*-negative groups shared a common core of bacteria. Further investigations will be necessary to determine if *Enterobacter* present in *Ny. darlingi* can constrain *Plasmodium* infection.

Key words: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, malaria, vector, Amazon.

Introduction

Malaria is one of the world's most common and deadly tropical diseases. Recent data from the World Health Organization (WHO) estimated 219 million clinical cases and 435,000 estimated deaths from 87 malaria-endemic countries with ongoing malaria transmission in 2017 (WHO, 2018). Brazil, Nicaragua and Venezuela registered increased the malaria incidence in 2017.

Brazil has the second highest rate of malaria case incidence and mortality rates in South America after Venezuela. Of note, the country reported a 76.8% reduction in malaria

incidence during 2000–2014 (Ferreira and Castro, 2016). The last two years has witnessed a significant jump in clinical cases from 124,000 in 2016 to 189,000 in 2017 (WHO, 2018). Malaria infections in Brazil were predominantly caused by *Plasmodium vivax*, accounting for > 84 % of all diagnosed cases (Ferreira and Castro, 2016). Most of the cases occur in the Amazon Region, where the primary vector is *Nyssorhynchus darlingi*.

Among the interventions used to control mosquito populations is the use of insecticides. Although there are some insecticides that are highly effective at reducing mosquito population, they may cause damage to human health and environment, and increase anopheline resistance to the chemicals (Silva et al., 2016; WHO, 2018). Since 2010, sixty-eight countries have reported mosquito resistance to at least one class of insecticide and 57 to two or more classes (WHO, 2018). Transgenic mosquito resistant to *Plasmodium* infection has been proposed to control the development of *Plasmodium* ookinete/oocysts in the midgut (Durvasula et al., 1997; Wang and Jacobs-Lorena, 2013).

Studies showed that the colonization with commensal gut microbiota of *Anopheles* species are capable of altering vector competence, as well as inhibiting the development of the parasite cycle (Bando et al., 2013; Baldini et al., 2018). For instance, Cirimotich et al. (2011) isolated an *Enterobacter* sp. strain (Esp_Z) from the gut of wild *Anopheles arabiensis* that confer resistant to infection of *P. falciparum* in *Anopheles gambiae*. Other studies reported *Serratia marcescens* blocking of the development of ookinete of *P. falciparum* in *An. gambiae* (Bando et al. 2013, Bahia et al. 2014). Thus, in addition to the modulation of *Plasmodium* infection in vector, some symbiotic bacteria appear to be an alternative for blocking *Plasmodium* development in mosquito by decreasing the vector competence of the vectors population.

Most of the literatures on the interaction between insect and microbes focused on a variety of vectors, however, little is known about the bacterial communities associated with

the abdomen of primary Neotropical vector (Terenius et al., 2008; Bascuñán et al., 2018; Alonso et al., 2019). This study compared the bacterial community associated with the abdomen of non-infected and *Plasmodium* naturally infected *Ny. darlingi*. The aim was to determine whether *Plasmodium* infection causes a remarkable disruption of the profile of bacterial abundance and diversity in *Ny. darlingi*. To address this, the bacterial community profile was compared by the β -diversity index.

Materials and methods

Mosquito collections

Females of *Ny. darlingi* were collected in the municipalities of Cruzeiro do Sul (Acre state), Mâncio Lima (Acre state), Lábrea (Amazonas state), and Machadinho D'Oeste (Rondônia state), Brazilian Amazon (Supplementary Table S1). Field-collections were conducted in peridomicile by human landing catches. Mosquitoes were killed with ethyl acetate (C₄H₈O₂) and immediately preserved in silica gel until species identification. Following identification, females were preserved in -80 °C.

***Plasmodium* testing**

Each *Ny. darlingi* female collected was dissected between head/thorax and abdomen. DNA of head/thorax was extracted according to Laporta et al. (2015) used for *Plasmodium* testing. *Plasmodium* detection was performed by using real-time PCR of the 18S rRNA region followed by high-resolution melting (HRM). For each reaction in a total volume of 20 μ L, 1X MeltDoctor™ HRM Master Mix (ThermoFisher Scientific), 10 ng DNA, 500 nM of each primer 1459-M13 (forward 5 'TGTA AACGACGGCCAGTCTGGTTAATTCCGATAAC 3') and 1706-M13 (reverse 5 'CAGGAAACAGCTATGACCTAAACTTCCTTGTGTTAGAC 3') (Kipanga et al., 2014)

and ultrapure H₂O, were added. The cycling program used consisted of 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. The reaction was then followed by HRM curve analysis collected by increasing the temperature from 60 °C to 95 °C with gradual temperature increments 0.3%. Results were analyzed using the StepOnePlus™ Software v2.3 and HRM v3.0.1 Software.

Sequencing of V4 region of the 16S rRNA

Abdomens of *Ny. darlingi* were surface rinsed twice in 70% ethanol and ultrapure water. Genomic DNA of each abdomen was extracted individually by the DNeasy PowerSoil kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions or by salt precipitation method, according to Laporta et al. (2015).

The V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified according to Caporaso et al. (2011). Briefly, each reaction was performed in a final volume of 20 µL consisting of 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USL), 0.3 µM of each primer (Supplementary Table S2), 2 µL of genomic DNA and ultrapure water. The thermocycling conditions were 94 °C for 3 min followed by 29 cycles of 94 °C for 45 sec, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and 30 sec and a final extension of 72 °C for 10 min. The reactions were carried out in triplicate. PCR products were visualized by 2% agarose gel electrophoresis stained with Red Gel (Uniscience). PCR products were purified by Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) and then quantified by Real-Time PCR with KAPA (KAPA Biosystems KK4824) essentially according to the manufacturer's recommendations. All samples were normalized to 3 nM and an equimolar pool of DNA was prepared. Next-generation sequencing of the V4 region was performed on Illumina MiSeq sequencer (Illumina® Sequencing) using a MiSeq Reagent Micro v2 kit (300 cycles).

Processing of sequences and taxonomic attribution

Illumina paired ends reads were assembled in QIIME v.1.9 (Caporaso et al., 2010) with a minimum overlap of 20 base pairs (*join_paired_ends.py*). Sequences were filtered based on length (230 base pairs) and sequencing error rates. USEARCH v.11 (Edgar, 2010, 2013) was used to filter sequences (*fastq_filter*), discard singletons (*sortbysize*), remove chimeras and cluster sequences in Unique Operational Taxonomic Units (OTUs) (*cluster_otus*). The taxonomic classification of each read was assigned against the Silva v.128 (Pruesse et al., 2007) at a 97% threshold of pairwise sequence similarity using QIIME v.1.9. All OTUs that had less than 5 sequences were removed from the analysis.

Diversity index and statistical analysis

Shannon-Weaver (H) and Observed OTUs (S) were used to describe the bacterial diversity (alpha diversity) of each specimen and of each group (*P*-positive and *P*-negative). Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare the results for both groups. The dissimilarity analysis (beta-diversity) between samples of the groups *P*-positive and *P*-negative was performed using unweighted Unifrac distance and sampling depth of 1,500 sequences. Unweighted Unifrac distance is a qualitative measure that uses phylogenetic information to compare biological communities. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of unweighted UniFrac distances of bacterial communities was conducted to measure distance among communities. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) was used to test if distances between the samples in one group are more similar to each other than the samples in other group. The rarefied results were used to carry out all above-mentioned analyses.

Results

Sequencing data output

Twenty-four abdomen samples were employed for the Illumina sequencing. Sixteen samples (66.6%) were successfully amplified and sequenced for the 250-bp 16S rRNA genomic region. Nine were infected with *Plasmodium* (Supplementary Table S3), and seven were not infected with *Plasmodium*.

MiSeq Illumina platform generated 2,505,232 raw reads (R1 and R2); mean values were 1,379,570 for the *P*-positive, and 1,125,662 for *P*-negative samples. After assembly and filtration of sequences from chloroplasts, archaea, mitochondria and unassigned OTUs, 273,064 sequences were obtained. These sequences were assigned to 379 unique OTUs; 85 were found only in *P*-positive group, 165 in *P*-negative samples, and 129 were identified in both groups. Two sequenced samples had sequence number lower than the depth used for the rarefaction and therefore were not used in the diversity analyzes.

Bacterial composition

Of the 379 OTUs obtained, a total of 333 were identified to genus level. Additionally, 35 OTUs could only be identified as far as family level, 4 OTUs could only be identified to order, 6 to class level and only one to phylum level.

The 248,770 sequences detected in the *P*-negative group were assigned to 294 OTUs and sorted into 12 phyla, among which Proteobacteria (90.1%), Firmicutes (6.6%) and Bacteroidetes (1.15%) were the most abundant and accounts for 98 % of the sequence reads. The most abundant bacterial phyla of the 214 OTUs within the *P*-positive group were Proteobacteria (80.3%), Firmicutes (8.7%), Bacteroidetes (6.7%) and Actinobacteria (2.7%) (Figure 1). Gammaproteobacteria was the most dominant class in both groups but its families had different tendencies. Within the phylum Proteobacteria, the *Pseudomonodaceae* were dominant in the *P*-negative samples and, *Enterobacteriaceae* the *P*-positive group (Figure 2).

Venn diagram was employed for counting the number of common and unique OTU observed at the genus level in both groups with sequence similarity of 97%. As shown in Figure 3, the OTU numbers were 294 in the *P*-negative and 214 in the *P*-positive group. The proportion of unique OTU was 43.54% in the *P*-negative and 22.43% in the *P*-positive group. Moreover, the common OTU in both groups was 34.04% indicating that they have a common bacterial core.

The genera *Pseudomonas* and *Escherichia / Shigella* were the most abundant genera in *P*-positive and *P*-negative groups. Considering the genera that had relative abundance with more than 1%, *Prevotella 9*, *Shingomonas* and *Bacteroides* were found in *P*-positive group and *Delftia*, *Methylobacterium* and *Bacillus* were found in *P*-negative. According to results of the previous studies about microbiota of Anophelinae mosquitoes, the genera *Escherichia / Shigella*, *Prevotella 9*, *Shingomonas*, *Bacteroides*, *Delftia*, *Methylobacterium* and *Bacillus* had never been associated with microbiome of *Ny. darlingi*.

PCoA, alpha and beta diversity

Rarefaction curve was performed with sampling depth of 1,500 sequences. The results from the rarefaction curve analysis showed sufficient sequencing depth to detect all OTUs in our samples (Supplementary Figure S1). To address the bacterial diversity we used the Shannon's diversity index, also known as Shannon-Weaver index, which considers the richness and relative abundance of OTUs. The results showed no significant difference between the *P*-negative (2.74 ± 0.70) and *P*-positive (2.72 ± 1.32) groups (Figure 4).

The beta diversity distances between both groups were measured using the Principal Coordinate Analysis (PCoA). The plot of PCoA depicted in Figure 5 demonstrated good clustering of samples obtained from the two groups but yielded less defined clustering of *P*-negative versus *P*-positive samples. The PERMANOVA analysis did not detect any

difference in the bacterial composition between the *P*-positive and *P*-negative groups ($p > 0.05$).

Discussion

Among the alternative methods for malaria vectors control is the use of symbiotic bacteria of the vector's midgut microbiota, because some of them are able to protect the mosquito from *Plasmodium* infection (Cirimotich et al., 2011; Bando et al., 2013; Bahia et al., 2014). However, further investigation will be necessary to depict the mosquito microbiota and identify potential candidate bacteria to be employed as a potential method to interrupt *Plasmodium* development in the mosquito.

In this study, bacterial communities associated with abdomen of *Ny. darlingi* naturally infected and not infected by *Plasmodium* were addressed. In addition, bacterial diversity was compared according to the status of malaria infection in the mosquito (*P*-negative and *P*-positive groups). Techniques of PCR and Next-Generation Sequencing were used to identify the bacteria community associated with mosquito abdomen. The fact of seven non-engorged samples did not amplify to 16S rRNA gene can be related to low abundance of bacteria in these samples. This result is corroborated by others studies, such as investigation conducted by Terenius et al. (2008) that employed 16S rRNA sequences of six mosquitoes.

Bacteria of adult mosquito abdomen comprises three dominant phyla Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. This result presents similarity to other studies performed with Anophelinae mosquitoes (Ngo et al., 2016; Tchioffo et al., 2016) and suggests that bacteria of these phyla may have importance in the physiology of Anophelinae mosquitoes. The value of observed OTUS was higher than those found in other conventional molecular studies (Terenius et al., 2008). Of the 379 OTUS, only 7 OTUs show abundance above 2%, suggesting that there are few dominant bacteria.

Minard et al. (2013) reported that female adult mosquitoes are colonized mainly by Gammaproteobacteria. Results of the current study corroborate the results obtained by Minard and collaborators, and showed Gammaproteobacteria as the most class of bacteria in the females analyzed (16 / 16 samples). The Gammaproteobacteria includes the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*.

Enterobacteriaceae was found in abundance in infected *An. gambiae*, indicating that bacteria of this family can contribute to the development of *Plasmodium* in the mosquito (Boissière et al., 2012). Although *Enterobacteriaceae* has been the most abundant family in the *P*-positive group, there was no significant difference when compared to the *P*-negative group ($p > 0.05$). The difference in the results of the studies should be related to the methodology used. The samples used by Boissière et al. (2012) were fed with infected blood for *P. falciparum* and midgut's microbiota was analyzed 8 days after the blood meal. In the study, field-collected females were found naturally infected with *Plasmodium* and, therefore, we do not have information about the time of blood meals performed by mosquitoes. We can only estimate that if the mosquito is infected, it probably carried out a blood meal at least 10 to 15 days before the collection. Difference observed may be associated with the time of blood meal and HLC collections.

Anopheles gambiae exposed to a bacterial isolate *Enterobacter* (Esp_Z) became less susceptible to *P. falciparum* infection (Cirimotich et al. 2011). In *Ny. darlingi*, the genus *Enterobacter* was found in two non-*Plasmodium*-infected females. Other studies should be performed to verify if any *Enterobacter* isolate is able to protect *Ny. darlingi* to *Plasmodium* infection.

Pseudomonas has wide dispersion and was found in *Ny. darlingi* and other Anophelinae mosquitoes of Africa, Asia and America (Terenius et al., 2008; Rani et al., 2009; Chavshin et al., 2014; Raharimalala et al., 2016; Bascuñán et al. 2018). In this study, this

genus was the most abundant in *P*-negative group and presented high prevalence among the analyzed samples (15/16 samples). The high prevalence of this bacterium corroborate with other studies (Chavshin et al., 2012). Due to high prevalence between analysed samples, studies are necessary to verify the possible use of this genus as candidate for paratransgenesis in *Ny. darlingi*.

Escherichia/Shigella was found in all samples and it was the most abundant genus in *P*-positive group. In previous studies, this genus was found in all mosquitoes samples analyzed of Northern California (USA) (Chandler et al., 2015) and in more than 85% of the samples of *An. gambiae* (Boissière et al., 2012). Both studies indicate the prevalence of this genus in other species of mosquitoes. The fact that this genus has been found in all natural breeding sites in the Brazilian Amazon region studied by Nilsson et al. (2018), suggests that this bacterial genus can probably be acquired in the immature phase.

Although *P*-negative group had a higher number of OTUs (294), there was no significant difference between the bacterial diversity of each group (*P*-positive and *P*-negative), that is, neither group was more diverse than the other. In addition, there was also no significant difference in the composition of the bacteria between the groups (beta diversity). These results are contrary to that of Bassene et al. (2018), who verified that vectors infected with *P. falciparum* presented greater diversity. Hypotheses to explain the contradiction of results (1) we considered sample infected with *Plasmodium*, without differentiating whether the infection was by *P. vivax* or *P. falciparum*, unlike the one conducted by Bassene et al. (2018), which analyzed *P. falciparum* infection; (2) bacteria were analyzed from different species of mosquitoes. Bassene et al. (2018) verified the bacteria in *An. gambiae* and *An. funestus* and here, we analyzed from *Ny. darlingi*.

Conclusions

This is the first study on bacteria associated with abdomen *Ny. darlingi* naturally infected and not infected by *Plasmodium*. The results expand the knowledge of the bacterial that are associated with abdomen of *Ny. darlingi*. Here, seven genera were reported for the first time in *Ny. darlingi*. Due to the high prevalence of *Pseudomonas*, other studies should be performed to verify the possibility of the use of these bacteria in the paratransgenesis of *Ny. darlingi*. Since *Enterobacter* was found in two non-infected *Ny. darlingi* samples and was absent in *P*-positive group, other studies are necessary to determine if *Enterobacter* present in *Ny. darlingi* offer protection to *Plasmodium* infection.

Data availability

Sequencing data generated for this study are available in the European Nucleotide Archive (ENA) (Access numbers: ERR3324411-ERR3324396).

Acknowledgments

We thank Eduardo Sterlino Bergo, Gabriel Zorello Laporta and Leonardo Suveges Moreira Chaves for conducted the field collections together with MA.

Author Contributions Statement

MA and TM conceived the experiments. MA planned and conducted the field collections. MA identified field specimens. TM and SS conducted all bioinformatics analyses. TM conducted the laboratory experiments. MA, TM and SS wrote the manuscript. All authors approved the final draft of the manuscript.

Funding

This work has been funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP grant no. 2014/26229-7.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Alonso, D.P., Mancini, M.V., Damiani, C., Cappelli, A., Ricci, I., Alvarez, M.V.N., et al. (2019). Genome reduction in the mosquito symbiont *Asaia*. *Genome Biol. Evol.* 11(1), 1–10.
- Bahia, A. C., Dong, Y., Blumberg, B. J., Mlambo, G., Tripathi, A., Benmarzouk-Hidalgo, O.J., et al. (2014). Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ. Microbiol.* 16(9), 2980–2994.
- Baldini, F., Rougé, J., Kreppel, K., Mkandawile, G., Mapua, S.A., Sikulu-Lord, M., et al. (2018). First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. *Parasit. Vectors.* 11(1):635. doi: 10.1186/s13071-018-3249-y
- Bando, H., Okado, K., Guelbeogo, W.M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., et al. (2013). Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Sci. Rep.* 3:1641. doi: 10.1038/srep01641
- Bascuñán, P., Niño-García, J.P., Galeano-Castañeda, Y., Serre, D., Correa, M.M. (2018). Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. *Microbiome.* 6(1):148. doi: 10.1186/s40168-018-0528-y
- Bassene, H., Niang, E.H.A., Fenollar, F., Dipankar, B., Doucouré, S., Ali, E., et al. (2018). 16S Metagenomic Comparasion of *Plasmodium falciparum*- Infected and Noninfected *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* Microbiota from Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99(6), 1489–1498.
- Boissière, A., Tchioffo, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., et al. (2012). Midgut Microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogen.* 8(5):e1002742. doi: 10.1371/journal.ppat.1002742
- Caporaso, J.G., kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7(5), 335–336.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(Suppl 1), 4516–4522.

Chandler, J.A., Liu, R.M., Bennett, S.N. (2015). RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. *Front Microbiol.* 6:185. doi: 10.3389/fmicb.2015.00185

Chavshin, A.R., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Pourmand, M.R., Raeisi, A., Enayati, A.A., et al. (2012). Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: A step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop.* 121(2), 129–134.

Chavshin, A.R., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Pourmand, M.R., Raeisi, A., Terenius, O. (2014). Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach. *Parasit. Vectors.* 7:419. doi: 10.1186/1756-3305-7-419

Cirimotich, C.M., Dong, Y., Clayton, A.M., Sandiford, S.L., Souza-Neto, J.A., Mulenga, M., et al. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science.* 332(6031), 855–858.

Durvasula, R.V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R.B., Richards, F.F., Beard, C.B. (1997). Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(7), 3274–3278.

Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 26(19), 2460–2461.

Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods.* 10(10), 996–998.

Ferreira, M.U., and Castro, M.C. (2016). Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar. J.* 15(1):284. doi: 10.1186/s12936-016-1335-1

Kipanga, P.N., Omondi, D., Mireji, P.O., Sawa, P., Masiga, D.K., Villinger, J. (2014). High-resolution melting analysis reveals low *Plasmodium* parasitaemia infections among microscopically negative febrile patients in western Kenya. *Malar. J.* 13:429. doi: 10.1186/1475-2875-13-429

Laporta, G.Z., Burattini, M.N., Levy, D., Fukuya, L.A., Oliveira, T.M.P., Maselli, L.M.F., et al. (2015). *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malar. J.* 14:181. doi: 10.1186/s12936-015-0680-9

Nilsson, L.K.J. (2018). Exploration of bacteria associated with *Anopheles* mosquitoes around the world: For the prevention of transmission of malaria. [thesis/doctor's thesis]. [Uppsala]: University of Uppsala.

Minard, G., Mavingui, P., Moro, C.V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors.* 6:146. doi: 10.1186/1756-3305-6-146

Ngo, C.T., Romano-Bertrand, S., Manguin, S., Jumas-Bilak, E. (2016). Diversity of the Bacterial Microbiota of *Anopheles* Mosquitoes from Binh Phuoc Province, Vietnam. *Front. Microbiol.* 7:2095. doi: 10.3389/fmicb.2016.02095

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W.G., Peplies, J., et al. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35(21), 7188–7196.

Raharimalala, F.N., Bokraa, S., Bawin, T., Boyer, S., Francis, F. (2016). Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitol. Res.* 115(4), 1391–1399.

Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T., Bhatnagar, R.K. (2009). Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* - an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 9:96. doi: 10.1186/1471-2180-9-96

Silva, G.L., Pereira, T.N., Ferla, N.J., Silva, O.S. (2016). The impact of insecticides management linked with resistance expression in *Anopheles* spp. populations. *Cien. Saude Colet.* 21(7), 2179–2188.

Terenius, O., Oliveira, C.D., Pinheiro, W.D., Tadei, W.P., James, A.A., Marinotti, O. (2008). 16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 45(1), 172–175.

Tchioffo, M. T., Boissière, A., Abate, L., Nsango, S.E., Bayibéki, A.N., Awono-Amnéne, P.H., et al. (2016). Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Front. Microbiol.* 6:1500. doi: 10.3389/fmicb.2015.01500

Wang, S., and Jacobs-Lorena, M. (2013). Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol.* 31(3), 185–193.

World Health Organization. World Malaria Report 2018. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/> (Accessed on January 27, 2019).

Figure 1 – Composition of bacterial phyla from *P*-negative and *P*-positive groups. (A) *P*-negative group, (B) *P*-positive group.

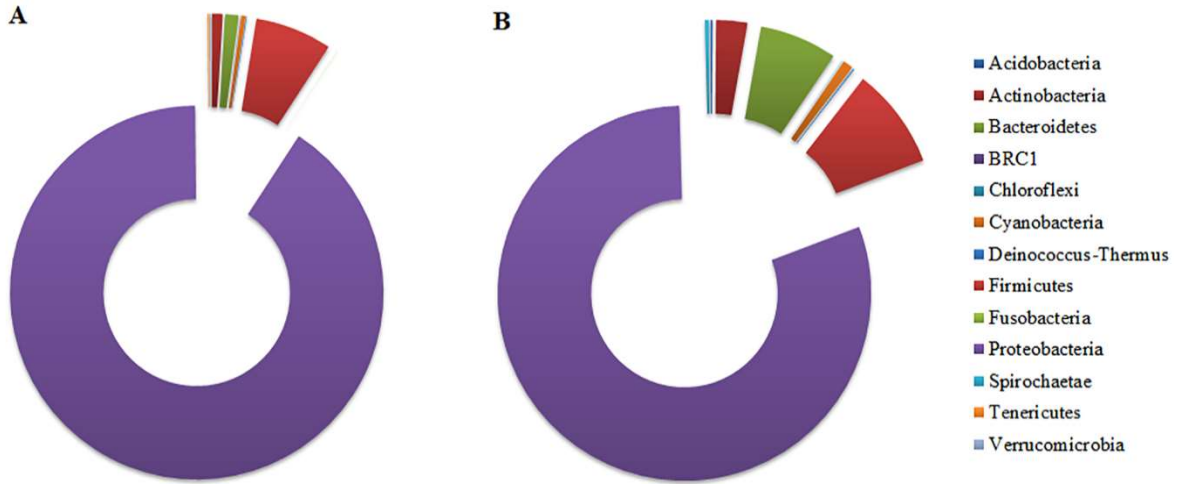


Figure 2 – Abundance of the bacterial genera in *P*-positive and *P*-negative groups. Only genera that had a relative abundance of 1% or greater are presented. Others <1.0 corresponds to genera that had relative abundance <1%. (A) *P*-positive group, (B) *P*-negative group.

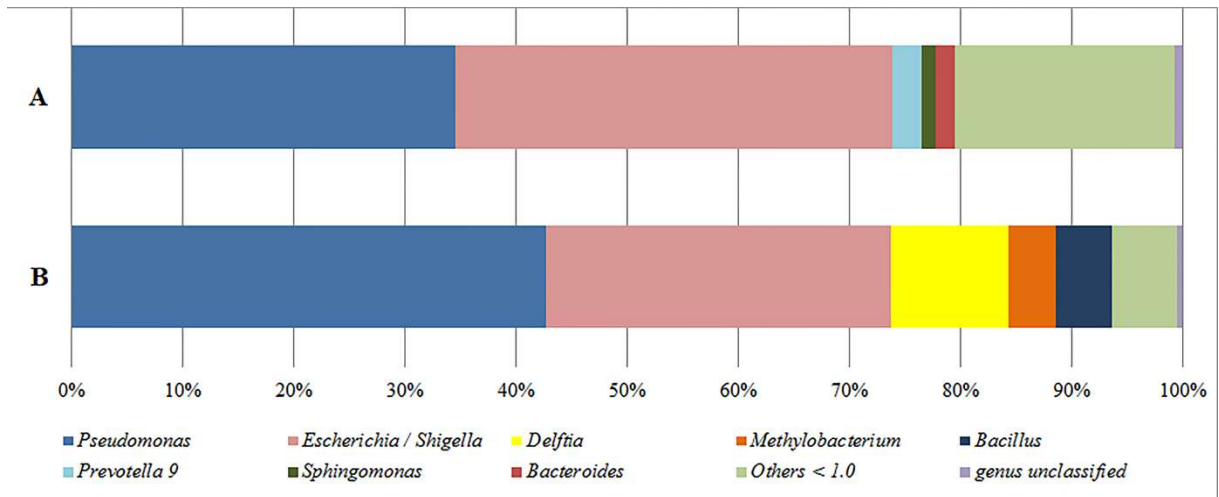


Figure 3 – Venn diagram. Number of unique OTUs in *P*-positive and *P*-negative groups. **(A)** *P*-negative group presents 77.5% of the total unique OTUs, **(B)** Almost 23% of all unique OTUs are presents only in *P*-positive group.

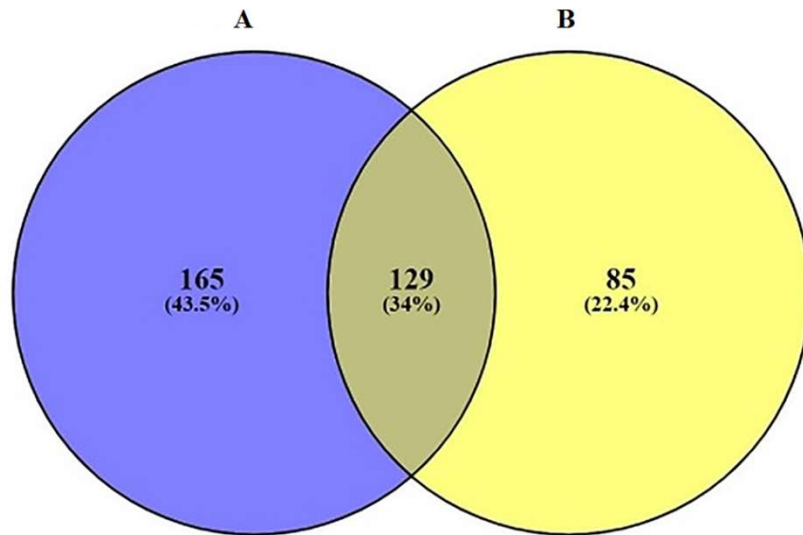


Figure 4 – Box plot of Shannon index for *P*-positive and *P*-negative groups. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles; whiskers extend to 5th and 95th percentiles, outliers are represented by dots. **(A)** Samples of the *P*-negative group, **(B)** Samples of the *P*-positive group.

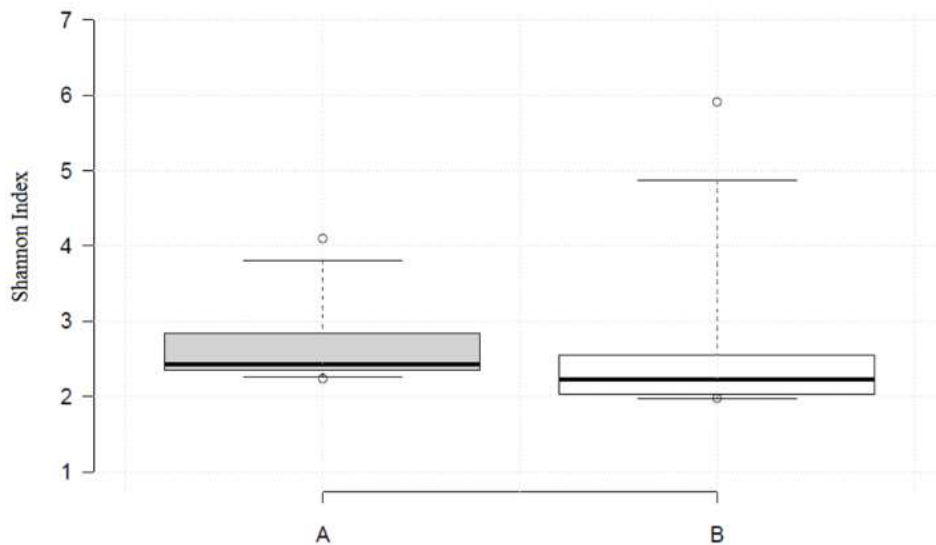


Figure 5 – Beta diversity. Principal Coordinates Analysis based on the unweighted unifracs distance. Blue circles: *Plasmodium* non-infected samples. Red squares: *Plasmodium* infected samples.

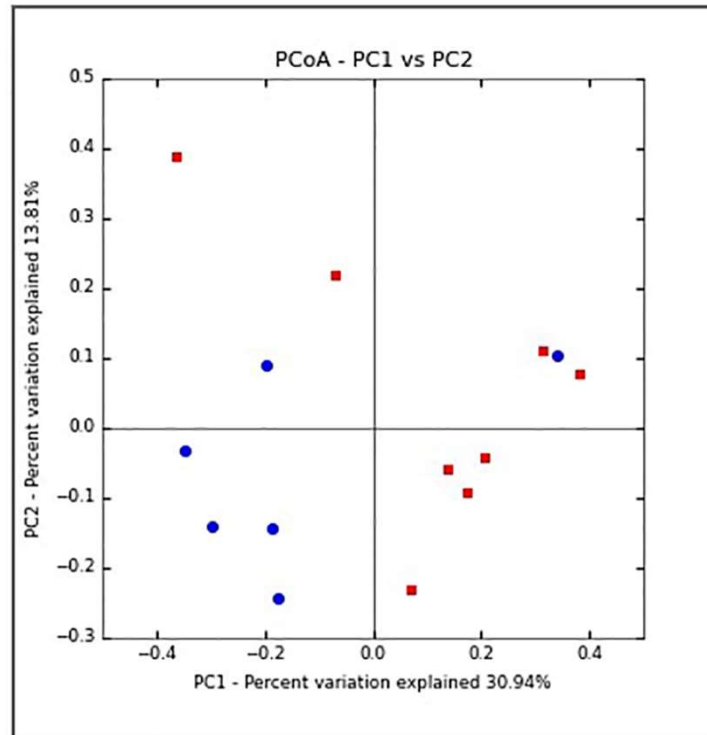


Figure S1 – Rarefaction curves of OTUs (97% similarity) of V4 region of 16S rRNA gene sequences from 16 samples. Rarefaction curves were generated in Qiime2 (2019.1 version). Bars correspond to the standard deviation in each depth step after 10 iterations (rarefied tables computed at each sampling depth).

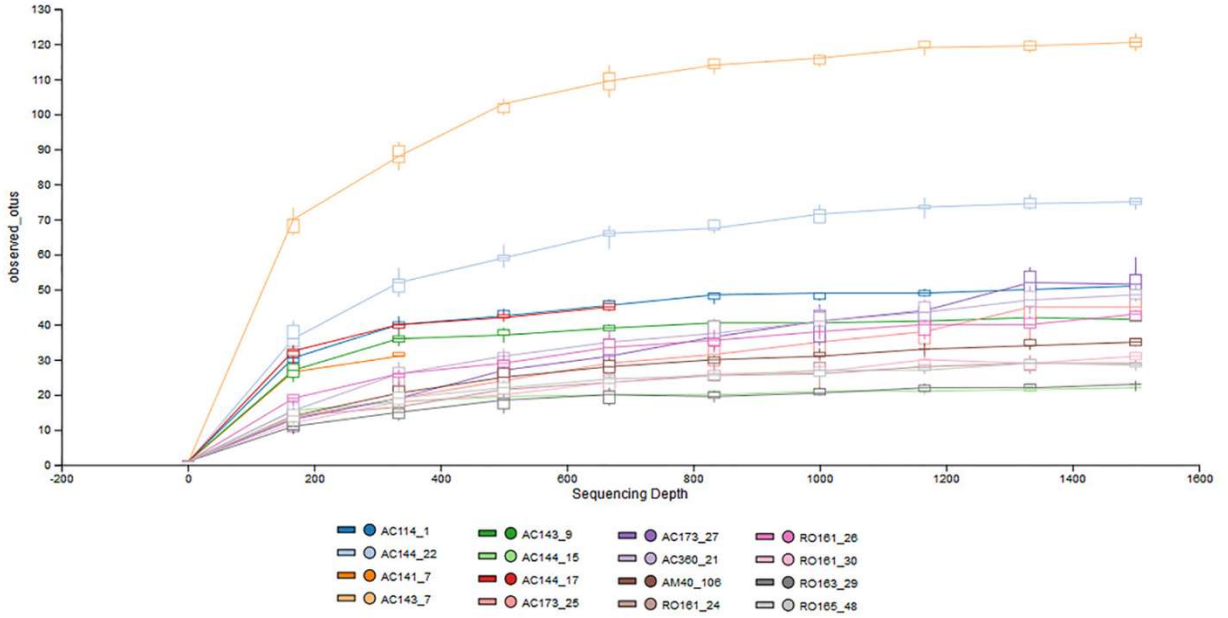


Table S1 – Period of collection in each municipality.

Municipalities	Month of collect	Year
Cruzeiro do Sul	April, May	2015
Lábrea	August	2015
Machadinho D'Oeste	October	2015
Mancio Lima	June	2015

Table S2 – Sequence of the oligonucleotides used to amplify the V4 region of the 16S rRNA gene.

Sequences (5' - 3')	
Forward	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
Reverse	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ***** AGTCAGTCAGCC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

* Barcode sequence.

Table S3 – ID sample, Municipality of collection and *Plasmodium* infection of each sample used in this study.

ID sample	Municipality	<i>Plasmodium</i> infection
AC114-1	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC141-2*	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC141-5*	Cruzeiro do Sul	Infected
AC141-6*	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC141-7	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC142-1*	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC143-7	Cruzeiro do Sul	Infected
AC143-9	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC144-14*	Cruzeiro do Sul	Infected
AC144-15	Cruzeiro do Sul	Infected
AC144-17	Cruzeiro do Sul	Infected
AC144-18*	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC144-19*	Cruzeiro do Sul	Infected
AC144-22	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC173-25	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC173-27	Cruzeiro do Sul	Non-infected
AC354-7**	Mâncio Lima	Infected
AC360-21	Mâncio Lima	Infected
AM40-106	Lábrea	Infected
RO161-24	Machadinho D'Oeste	Non-infected
RO161-26	Machadinho D'Oeste	Infected
RO161-30	Machadinho D'Oeste	Infected
RO163-29	Machadinho D'Oeste	Infected
RO165-48	Machadinho D'Oeste	Infected

*PCR failed.

**16S rRNA sequencing failed.

5 CONCLUSÕES

Este estudo forneceu informações inéditas sobre a diversidade bacteriana associada ao abdômen de dois vetores Neotropical. A maior parte dos gêneros bacterianos pertenceu ao filo Proteobacteria, sugerindo que bactérias deste filo devem ter grande importância na fisiologia de *Ny. darlingi* e *Ny. braziliensis*. O fato de sete gêneros bacterianos terem sido relatados pela primeira vez em *Ny. darlingi*, indica que há uma lacuna de conhecimento entre bactérias presentes em *Ny. darlingi* e em outros vetores da Ásia e África. Devido a presença de *Asaia* e *Serratia* em ambas as espécies de *Nyssorhynchus* e a alta prevalência de *Pseudomonas* em *Ny. darlingi*, outros estudos devem ser realizados para verificar a possibilidade do uso dessas bactérias na paratransgênese em vetores neotropicais. Apesar da diversidade bacteriana não ter sido significativamente diferente entre os grupos infectado e não infectado por *Plasmodium*, a ausência do gênero *Enterobacter* no grupo infectado e sua presença em dois espécimes não infectados sugerem que bactérias desse gênero podem oferecer proteção contra a infecção por *Plasmodium*. Outros estudos serão necessários para verificar essa hipótese.

6 REFERÊNCIAS

AKORLI, J.; GENDRIN, M.; PELS, N. A. P.; YEBOAH-MANU, D.; CHRISTOPHIDES, G. K.; WILSON, M. D. Seasonality and Locality Affect the Diversity of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* Midgut Microbiota from Ghana. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2016.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, p. 32–46, 2001.

BAHIA, A. C.; DONG, Y.; BLUMBERG, B. J.; MLAMBO, G.; TRIPATHI, A.; BENMARZOUK-HIDALGO, O. J.; CHANDRA, R.; DIMOPOULOS, G. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2980–2994, 2014.

BALDINI, F.; SEGATA, N.; POMPON, J.; MARCENAC, P.; SHAW, W. R.; DABIRÉ, R. K.; DIABATÉ, A.; LEVASHINA, E. A.; CATTERUCCIA, F. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–7, 2014.

BALDINI, F.; ROUGÉ, J.; KREPPPEL, K.; MKANDAWILE, G.; MAPUA, S. A.; SIKULU-LORD, M.; FERGUSON, H. M.; GOVELLA, N.; OKUMU, F. O. First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1–7, 2018.

BANDO, H.; OKADO, K.; GUELBEOGO, W. M.; BADOLO, A.; AONUMA, H.; NELSON, B.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SAGNON, N.; KANUKA, H. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–9, 2013.

BASCUÑÁN, P.; NIÑO-GARCIA, J. P.; GALEANO-CASTAÑEDA, Y.; SERRE, D.; CORREA, M. M. Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. **Microbiome**, v. 6, 2018.

BOISSIÈRE, A.; TCHIOFF, M. T.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; NSANGO, S. E.; SHAHBAZKIA, H. R.; AWONO-AMBENE, P. H.; LEVASHINA, E. A.; CHRISTEN, R.; MORLAIS, I. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum*. **PLoS Pathogen**, v. 8, 2012.

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C.; ALGHALITH, G. A.; ALEXANDER, H.; ALM, E. J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI, Y.; BISANZ, J. E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; BROWN, C. T.; CALLAHAN, B. J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; CHASE, J.; COPE, E.; DA

SILVA, R.; DORRESTEIN, P. C.; DOUGLAS, G. M.; DURALL, D. M.; DUVALLET, C.; EDWARDSON, C. F.; ERNST, M.; ESTAKI, M.; FOUQUIER, J.; GAUGLITZ, J. M.; GIBSON, D. L.; GONZALEZ, A.; GORLICK, K.; GUO, J.; HILLMANN, B.; HOLMES, S.; HOLSTE, H.; HUTTENHOWER, C.; HUTTLEY, G.; JANSSEN, S.; JARMUSCH, A. K.; JIANG, L.; KAEHLER, B.; KANG, K. B.; KEEFE, C. R.; KEIM, P.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOESTER, I.; KOSCIOLEK, T.; KREPS, J.; LANGILLE, M. G.; LEE, J.; LEY, R.; LIU, Y.; LOFTFIELD, E.; LOZUPONE, C.; MAHER, M.; MAROTZ, C.; MARTIN, B. D.; MCDONALD, D.; MCIVER, L. J.; MELNIK, A. V.; METCALF, J. L.; MORGAN, S. C.; MORTON, J.; NAIMEY, A. T.; NAVAS-MOLINA, J. A.; NOTHIAS, L. F.; ORCHANIAN, S. B.; PEARSON, T.; PEOPLES, S. L.; PETRAS, D.; PREUSS, M. L.; PRUESSE, E.; RASMUSSEN, L. B.; RIVERS, A.; ROBESON, M.S.; ROSENTHAL, P.; SEGATA, N.; SHAFFER, M.; SHIFFER, A.; SINHA, R.; SONG, S. J.; SPEAR, J. R.; SWAFFORD, A. D.; THOMPSON, L. R.; TORRES, P. J.; TRINH, P.; TRIPATHI, A.; TURNBAUGH, P. J.; UL-HASAN, S.; VAN DER HOOFT, J. J.; VARGAS, F.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; VOGTMANN, E.; VON HIPPEL, M.; WALTERS, W.; WAN, Y.; WANG, M.; WARREN, J.; WEBER, K. C.; WILLIAMSON, C. H.; WILLIS, A. D.; XU, Z. Z.; ZANEVELD, J. R.; ZHANG, Y.; ZHU, Q.; KNIGHT, R.; CAPORASO, J.G. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, v. 6:e27295v2, 2018.

CAPORASO, J. G.; KUCZNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E. K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108 (Suppl 1), p. 4516–4522, 2011.

CHAVSHIN, A. R.; OSHAGHI, M. A.; VATANDOOST, H.; POURMAND, M. R.; RAEISI, A.; TERENIUS, O. Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach. **Parasites & Vectors**, v. 7, p.2–8, 2014.

CIRIMOTICH, C. M.; DONG, Y.; CLAYTON, A. M. ; SANDIFORD, S. L.; SOUZA-NETO, J. A.; MULENGA, M.; DIMOPOULOS, G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 332, p. 855–858, 2011.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. 1–10, 2009.

DOUGLAS, A. E. Lessons from Studying Insect Symbioses. **Cell Host & Microbe**, v. 10, p. 2–16, 2011.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

EDGAR, R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996–998, 2013.

GENDRIN, M.; RODGERS, F. H.; YERBANGA, R. S.; OUÉDRAOGO, J. B.; BASÁÑEZ, M. G.; COHUET, A.; CHRISTOPHIDES, G. K. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–7, 2015.

GIMONNEAU, G.; TCHIOFFO, M. T.; ABATE, L.; BOISSIÈRE, A.; AWONO-AMBÉNE, P. H.; NSANGO, S. E.; CHRISTEN, R.; MORLAIS, I. Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. **Infection Genetics Evolution**, v. 28, p. 715–24, 2014.

HUGHES, G. L.; KOGA, R.; XUE, P.; FUKATSU, T.; RASGON, J. L. *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles Gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2011.

KALAPPA, D. M.; SUBRAMANI, P. A.; BASAVANNA, S. K.; GHOSH, S. K.; SUNDARAMURTHY, V.; URAGAYALA, S.; TIWARI, S.; ANVIKAR, A.; VALECHA, N. Influence of midgut microbiota in *Anopheles stephensi* on *Plasmodium berghei* infections. **Malaria Journal**, v. 17, p. 1–8, 2018.

LAPORTA, G. Z.; BURATTINI, M. N.; LEVY, D.; FUKUYA, L. A.; OLIVEIRA, T. M. P.; MASELLI, L. M. F.; CONN, J. E.; MASSAD, E.; BYDŁOWSKI, S. P.; SALLUM, M. A. M. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? **Malaria Journal**, v. 14, p. 1–12, 2015.

LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8228–8235, 2005.

MANCINI, M. V.; SPACCAPELO, R.; DAMIANI, C.; ACCOTI, A.; TALLARITA, M.; PETRAGLIA, E.; ROSSI, P.; CAPPELLI, A.; CAPONE, A.; PERUZZI, VALZANO, M.; PICCIOLINI, M.; DIABATÉ, A.; FACCHINELLI, L.; RICCI, I.; FAVIA, G. Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study. **Parasites & Vectors**, v. 9, p 1–9, 2016.

MANN, H. B.; WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 18, p. 50–60, 1947.

MINARD, G.; MAVINGUI, P.; MORO, C. V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 1–12, 2013.

NGO, C. T.; AUJOULAT, F.; VEAS, F.; JUMAS-BILAK, E.; MANGUIN, S. Bacterial diversity associated with wild caught *Anopheles mosquitoes* from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–18, 2015.

NGO, C. T.; ROMANO-BERTRAND, S.; MANGUIN, S.; JUMAS-BILAK, E. Diversity of the Bacterial Microbiota of *Anopheles* Mosquitoes from Binh Phuoc Province, Vietnam. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–11, 2016.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W. G.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

PUMPUNI, C. B.; DEMAIO, J.; KENT, M.; DAVIS, J., R.; BEIER, J. C. Bacterial populations Dynamics in three Anopheline species: The impact on Plasmodium sporogonic development. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, p. 214–218, 1996.

RAHARIMALALA, F. N.; BOUKRAA, S.; BAWIN, T.; BOYER, S.; FRANCIS, F. Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. **Parasitology Research**, v.115, p. 1391–1399, 2016.

RODGERS, F. H.; GENDRIN, M.; WYER, C, A. S.; CHRISTOPHIDES, G. K. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–22, 2017.

ROMOLI, O.; GENDRIN, M. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and Plasmodium. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1–8, 2018.

SHARMA, A.; DHAYA, D.; SINGH, O. P.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R. K. Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 41-47, 2013.

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 644–661, 2014.

STATA CORP. *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC, 2017.

TERENIUS, O.; OLIVEIRA, C. D.; PINHEIRO, W. D.; TADEI, W. P.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. 16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 172–175, 2008.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; CHURCHER, T. S.; ABATE, L.; GIMONNEAU, G.; NSANGO, S. E.; AWONO-AMBÈNE, P. H.; CHRISTEN, R.; BERRY, A.; MORLAIS, I. Modulation of Malaria Infection in *Anopheles gambiae* Mosquitoes Exposed to Natural Midgut Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n.12, p. 1–9, 2013.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; ABATE, L.; NSANGO, S. E.; BAYIBÉKI, A. N.; AWONO-AMNÉNÉ, P. H.; CHRISTEN, R.; GIMONNEAU, G.; MORLAIS, I. Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–9, 2016.

VILLEGAS, L. M.; PIMENTA, P. F. P. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 672–684, 2014.

WANG, S.; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 185–193, 2013.

WANG, Y.; GILBREATH, T. M.; KUKUTLA, P.; YAN, G.; XU, J. Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–9, 2011.

WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. **Biometrics**, v. 1, p. 80–83, 1945.

WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1–9, 2015.

CURRÍCULO LATTES



Maria Anice Mureb Sallum

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1200247772482237>
Última atualização do currículo em 01/04/2019

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado (1991) e doutorado (1994) em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Professor titular pela Universidade de São Paulo, Departamento de Epidemiologia, desde 2015. Membro do Comitê Editorial das revistas: *Infection*, *Genetics and Evolution* e *Revista Brasileira de Entomologia*. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: Entomologia Médica, Culicidae, Anopheles, Culex, taxonomia morfológica e molecular, ecologia, biodiversidade e evolução. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Maria Anice Mureb Sallum
Nome em citações bibliográficas	SALLUM, M. A. M.; Sallum, Maria Anice M.; Sallum, Maria Anice Mureb; Mureb Sallum, Maria A.; Mureb Sallum, Maria A.; Mureb Sallum, Maria Anice; Sallum, Maria AM; Sallum, Maria Anice; Maria Anice Sallum; Sallum, Maria Anice; SALLUM, M.A.M.; SALLUM, MARIA; Sallum, Maria Anice Mureb; SALLUM, MARIA A. M.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. AV. DR. ARNALDO no. 715 Sala 210 Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617951
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

1991 - 1994	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: REVISÃO DA SEÇÃO SPISSIPES DE CULEX (MELANOCONION)(DIPTERA:CULICIDAE). Ano de obtenção: 1994. Orientador: OSWALDO PAULO FORATTINI. Palavras-chave: Culex (Melanoconion); Culicidae; Sistemática. Grande área: Ciências da Saúde
1989 - 1991	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: ESTUDO TAXONÔMICO DO CIBÁRIO NA SEÇÃO SPISSIPES DE CULEX (MELANOCONION) (DIPTERA: CULICIDAE). Ano de Obtenção: 1991. Orientador: OSWALDO PAULO FORATTINI. Palavras-chave: Culex (Melanoconion); Culicidae; Sistemática. Grande área: Ciências da Saúde
1979 - 1979	Especialização em Entomologia Médica. (Carga Horária: 560h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
1973 - 1976	Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.



Tatiane Marques Porangaba de Oliveira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8935429163817080>
Última atualização do currículo em 26/01/2017

Graduada em Ciências Biológicas - Modalidade Médica pela Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho (2006) e Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia - USP. Atualmente é Especialista de Laboratório (PROCONTES) no Laboratório de Sistemática Molecular e aluna de doutorado do programa de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública. Possui experiência em técnicas microbiológicas, biologia molecular, sequenciamento de primeira e segunda geração e bioinformática. Atua principalmente nos seguintes temas: identificação molecular de anofelinos, detecção de plasmódios em mosquitos por PCR e PCR tempo real e amplificação de genoma mitocondrial. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Tatiane Marques Porangaba de Oliveira
Nome em citações bibliográficas	Oliveira, Tatiane M. P.;Porangaba, T.M.;PORANGABA, T. M.;OLIVEIRA, TATIANE MP;OLIVEIRA, TATIANE M.P.;Tatiane MP de Oliveira;OLIVEIRA, TATIANE MP DE;OLIVEIRA, T.M.P.;DE OLIVEIRA TM;DE OLIVEIRA, TATIANE M.P.;DE OLIVEIRA, TATIANE MARQUES. PORANGABA;DE OLIVEIRA, TATIANE M. P.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr Amaldo, 715 Pacaembu 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, FSP, Brasil. Título: ESTUDOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO ANOPHELES-BACTÉRIAS-PLASMODIUM EM ASSENTAMENTOS RURAIS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA, Orientador: Maria Anice Mureb Sallum.
2007 - 2010	Mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Clonagem e expressão de β ficocianina em amostras de Escherichia coli,Ano de Obtenção: 2010. Orientador: Marcelo Palma Sircili.
2003 - 2006	Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: bacteriologia; clonagem. Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica. Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Título: Detecção de genes de virulência em amostras de EPEC atípicas através de PCR. Orientador: Marcelo Palma Sircili. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.