

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

MARINA EDWIGES OREFICE RANGEL

**Investigação sobre a presença de *Plasmodium* spp. em Anophelinae (Diptera:  
Culicidae) do Vale do Ribeira, sudeste da Mata Atlântica, Estado de São Paulo,  
Brasil**

SÃO PAULO  
2023

MARINA EDWIGES OREFICE RANGEL

**Investigação sobre a presença de *Plasmodium* spp. em Anophelinae (Diptera: Culicidae) do Vale do Ribeira, sudeste da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil**

**Versão Revisada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum

SÃO PAULO

2023

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

Rangel, Marina Edwiges Orefice  
Investigação sobre a presença de *Plasmodium* spp. em *Anophelinae* (Diptera: Culicidae) do Vale do Ribeira, sudeste da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil / Marina Edwiges Orefice Rangel; orientadora Maria Anice Mureb Sallum. -- São Paulo, 2023.

44 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. *Plasmodium*. 2. *Anopheles*. 3. *Kerteszia*. 4. Malaria. 5. Mata Atlântica. I. Sallum, Maria Anice Mureb, orient. II. Título.

RANGEL, M. E. O. Investigação da presena de *Plasmodium* spp. em Anophelinae (Diptera: Culicidae) do Vale do Ribeira, sudeste da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. 2023. Dissertao (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituio \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituio \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituio \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

À professora Dra. Maria Anice Mureb Sallum, por todo o aprendizado e oportunidades promovidas.

À Dra. Tatiane Marques Porangaba, por toda paciência, aprendizado, ajuda com as análises e suporte no laboratório.

À professora Dra. Ana Maria Duarte, por todo cuidado, aprendizado e ajuda com as análises, bem como por disponibilizar seu laboratório para as análises e extração de DNA enquanto o laboratório da FSP passava por reformas e readequação.

Ao Professor Dr. Gabriel Zorello Laporta, pelas oportunidades, ajuda nas coletas e por todo aprendizado.

À Raquel Montes e Luísa Kelly, por toda ajuda com as extrações e procedimentos.

Ao meu marido, Ricardo Rangel, por toda paciência e apoio todos estes anos.

À organização e participantes do XXV seminário Laveran e Deane sobre Malária, por todas as contribuições.

Aos técnicos da antiga SUCEN: Bonafé, João, Valdomiro e os motoristas Fortunato e Sergio, pelo companheirismo e todo aprendizado de campo.

À reserva Votorantim – Legado das Águas, pela concessão do local de pesquisa, cessão de guias para as trilhas, e toda a infraestrutura que foi crucial para o trabalho.

Aos funcionários da reserva Votorantim – Legado das Águas, por todo carinho e ajuda.

Aos moradores do Ribeirão da Anta, por todo acolhimento, carinho e comidas gostosas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RANGEL, M. E. O. **Investigação da presença de *Plasmodium* spp. em Anophelinae (Diptera: Culicidae) do Vale do Ribeira, sudeste da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil.** 2023. Dissertação – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

## RESUMO

Objetivos: Identificar espécies de anofelinos presentes na região do Vale do Ribeira, Sudeste de São Paulo, e a circulação de plasmódios por estes anofelinos. Método: Foram utilizadas armadilhas CDC com atração luminosa e armadilhas de Shannon no período que compreende das 17:00 às 22:00 horas e atração por humano protegido realizadas das 9:00 às 12:00 horas durante três dias consecutivos em seis campanhas, realizadas de setembro de 2021 a novembro de 2022. Os espécimes capturados foram identificados morfológicamente, separados por espécie e tiveram seu DNA genômico extraído em grupos de até 10 mosquitos, considerando os métodos de captura, locais, datas e horas. Os grupos de DNA genômico foram analisados utilizando tecnologia de PCR em tempo real para amplificar fragmento de 157 a 165 pares de bases da unidade 18S do DNA ribossômico, que permite identificar a presença de plasmódios. As amostras positivas foram submetidas a técnicas de PCR aninhado de fragmento do gene *citocromo b* do genoma mitocondrial. De oito amostras analisadas, duas foram positivas e tiveram seus amplicons sequenciados empregando tecnologia de Sanger. Resultados: Foram coletados 5.577 mosquitos classificados no gênero *Kerteszia* (99,62%) e gênero *Anopheles* (0,38%), agrupados em 811 grupos. Foram identificados oito grupos positivos para plasmódios, sendo um para *Plasmodium vivax* / *Plasmodium simium*, um para *Plasmodium malariae* / *Plasmodium brasilianum*, dois para *Plasmodium falciparum* e quatro grupos positivos apenas para *Plasmodium* spp. O sequenciamento Sanger confirmou a infecção por *P. vivax* / *P. simium* em uma amostra, e *P. malariae* / *P. brasilianum* em outra. A proporção total de anofelinos infectados por *Plasmodium* spp. foi 0,5% (4/811), 0,2% dos anofelinos coletados apresentavam infecção por *P. falciparum* (2/811), 0,1% apresentavam infecção por *P. vivax* (1/811) e a mesma proporção de infectados por *P. malariae* (1/811). A razão mínima de infecção (RMI) para *Plasmodium* spp. nos anofelinos coletados foi 0,125, para *P. vivax* foi 0,02, assim como para *P. malariae* e, para *P. falciparum* foi 0,035. As estimativas de razão entre mosquitos infectados e mosquitos coletados foram 0,007 para *Plasmodium* spp., 0,0002 para *P. vivax*, 0,0005

para *P. falciparum* e 0,0005 para *P. malariae*. A razão de infecção absoluta por *P. vivax* foi 0,02 em março de 2022 e 0,01 por *P. falciparum* em novembro de 2022 no mesmo ponto de coleta. Conclusão: Foi identificada a presença de plasmódios zoonóticos em área de reserva da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, onde a presença de hospedeiros humanos é restrita aos moradores, turistas, trabalhadores da reserva e pesquisadores. A densidade de mosquitos infectados por *P. falciparum* foi maior do que a de *P. vivax* e *P. malariae*. O encontro de mosquitos, naturalmente, infectados por estas espécies de plasmódios indica a necessidade de programas de educação ambiental delineados aos frequentadores e moradores da região da reserva e do entorno. Acresce considerar a necessidade de pesquisas detalhadas sobre as taxas de *Plasmodium* ocorrendo na área estudada e na Mata Atlântica, com sequenciamentos dos genomas das espécies que são encontradas em localidades diversas do Brasil e América Latina.

Descritores: *Plasmodium*. *Anopheles*. *Kerteszia*. Malária. Mata Atlântica.

RANGEL, M. E. O. **Investigation of the presence of *Plasmodium* spp. in Anophelinae (Diptera: Culicidae) from Vale do Ribeira, southeastern Atlantic Forest, State of São Paulo, Brazil.** 2023. Dissertation - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023. Portuguese.

#### ABSTRACT

**Objectives:** Identify species of anophelines present in the Vale do Ribeira region, Southeast of São Paulo, and the circulation of plasmodia by these anophelines. **Method:** CDC light traps and Shannon traps were used in the period from 5:00 p.m. to 10:00 p.m. and attraction by protected human carried out from 9:00 a.m. to 12:00 p.m. for three consecutive days in 6 campaigns, carried out from September 2021 to November 2022. The captured specimens were morphologically identified, separated by species, and had their genomic DNA extracted in pools of up to 10 mosquitoes, considering capture methods, locations, dates and time. By utilizing real-time PCR technology, a 157 to 165 base pairs segment of the 18S ribosomal DNA unit was amplified to identify plasmodia within the genomic DNA pools. The positive samples were submitted to nested PCR techniques of *cytochrome b* gene fragment of the mitochondrial genome. Of 8 samples analyzed, two were positive and had their amplicons sequenced using Sanger technology. **Results:** A total of 5,577 mosquitoes belonging to the genus *Kerteszia* (99.62%) and to the genus *Anopheles* (0.38%) were collected, grouped into 811 pools. Eight positive pools for plasmodia were identified, one for *Plasmodium vivax* / *Plasmodium simium*, one for *Plasmodium malariae* / *Plasmodium brasilianum*, two for *Plasmodium falciparum* and four pools positive only for *Plasmodium* spp. Sanger sequencing confirmed *P. vivax* / *P. simium* infection in one sample, and *P. malariae* / *P. brasilianum* in the other. The total proportion of anophelines infected with *Plasmodium* spp. was 0.5% (4/811), 0.2% of the collected anophelines had *P. falciparum* infection (2/811), 0.1% had *P. vivax* infection (1/811) and the same proportion of infected with *P. malariae* (1/811). The minimum infection rate (MIR) for *Plasmodium* spp. in anophelines collected was 0.125, for *P. vivax* was 0.02, as well as for *P. malariae*, and for *P. falciparum* it was 0.035. The ratio estimates between infected and collected mosquitoes were 0.007 for *Plasmodium* spp., 0.0002 for *P. vivax*, 0.0005 for *P. falciparum*, and 0.0005 for *P. malariae*. The absolute infection ratio for *P. vivax* was 0.02 in March 2022 and 0.01 for *P. falciparum* infection in November 2022 at the same collection point. **Conclusion:** The presence of zoonotic



plasmodia was identified in a reserve area of the Atlantic Forest in southeastern Brazil, where the presence of human hosts is restricted to residents, tourists, reserve workers and researchers. The density of mosquitoes infected with *P. falciparum* was higher than that of *P. vivax* and *P. malariae*. The finding of mosquitoes naturally infected by these species of plasmodia shows the need for environmental education programs designed for visitors and residents of the reserve region and surroundings. In addition, consider the need for detailed research on the rates of *Plasmodium* occurring in the studied area and in the Atlantic Forest, with sequencing of the genomes of the species that are found in different locations in Brazil and Latin America.

Descriptors: *Plasmodium*. *Anopheles*. *Kerteszia*. Malaria. Atlantic forest.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Série histórica de casos autóctones de malária na região estudada – 2007 a 2023 baseados em dados do Sivep-Malária atualizados em 27/07/2023 e do Sinan atualizados em 21/06/2023.

Tabela 02 – Oligo iniciadores e sondas utilizados na RT-qPCR da subunidade 18S do DNA ribossômico (rDNA).

Tabela 03 – Fêmeas de anofelinos coletadas na Reserva Votorantim – Legado das Águas, no período de setembro de 2021 a novembro de 2022.

Tabela 04 – Resultados das análises moleculares para infecção por *Plasmodium* spp., *P. vivax* / *P. simium* / *P. falciparum* e *P. malariae* / *P. brasilianum*.

Tabela 05 – Razão de mosquitos infectados e mosquitos capturados por ponto e local das coletas.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Localização da Reserva Votorantim – Legado das Águas entre outras áreas de conservação

Figura 02 – Aspecto da armadilha CDC com atrativo luminoso instalada na área da Cachoeira Dezembro, Reserva "Legado das Águas", estado de São Paulo

Figura 03 – Aspecto da armadilha de Shannon instalada na área da Trilha Suspensa, Reserva "Legado das Águas", estado de São Paulo.

Figura 4 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies de *Plasmodium*, incluindo duas sequências obtidas para amostras de *Ke. cruzii*, naturalmente, infectadas na Reserva Legado das Águas, São Paulo, Brasil (em negrito). Os valores nas ramificações indicam o suporte de estatístico estimado por “bootstrap”

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Vetores.....	14
1.2	Parasitas .....	15
1.3	Hospedeiros .....	16
1.4	Ambiente .....	17
1.5	Malária como problema de saúde pública.....	18
1.5.1	Amazônia.....	18
1.5.2	Extra-amazônia.....	19
1.6	Controle.....	20
2	JUSTIFICATIVA .....	21
3	HIPÓTESE .....	21
4	OBJETIVOS .....	22
5	METODOLOGIA.....	22
5.1	Área de estudo.....	22
5.2	– Coletas de espécimes.....	24
5.3	Extrações de gDNA.....	25
5.4	– PCR Tempo Real.....	26
5.5	- PCR aninhada do gene mitocondrial .....	27
5.6	Sequenciamento Sanger.....	28
5.7	Análises estatísticas.....	28
6	RESULTADOS .....	29
6.1	Anofelinos .....	29
6.2	– RT-PCR .....	30
6.3	– PCR aninhada do gene mitocondrial.....	31
6.4	– Sequenciamento .....	32
7	DISCUSSÃO .....	35
	REFERÊNCIAS.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, potencialmente, grave, em especial para crianças com idade inferior a cinco anos e populações vulneráveis com pouco ou sem acesso ao diagnóstico e tratamento com drogas antimaláricas. Em 2021, ocorreram aproximadamente 247 milhões de casos de malária no mundo e o número estimado de mortes pela doença chegou a 619.000 (WHO, 2023).

A doença é causada pela infecção por protozoários Apicomplexa, *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*, transmitidos às pessoas suscetíveis através das picadas de fêmeas de algumas espécies da subfamília Anophelinae que se tornam infectadas, após se alimentarem de sangue de hospedeiros portadores de gametócitos. Existem oito espécies de parasitas que podem causar malária em humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* e *Plasmodium simium* (MOURIER et al., 2021) Estes três últimos são plasmódios zoonóticos que causam alta incidência de infecção em humanos em áreas do sudeste asiático, principalmente, pessoas que vivem ou trabalham em área florestal (FORNACE et al., 2023; MOURIER et al., 2021; SINGH et al., 2004).

Existem controvérsias sobre a origem de *P. vivax* e *P. malariae* no continente americano. Alguns autores defendem que as espécies circulavam na região antes da colonização europeia (GERSZTEN; ALLISON; MAGUIRE, 2012). Todavia, outros estudos defendem que a diversidade genética de *P. vivax* é consistente com as diferentes ondas migratórias de populações africanas e do sul da Ásia em épocas pré-colombianas (RODRIGUES et al., 2018). Os mecanismos genéticos e ecológicos que envolveram o estabelecimento e adaptação do plasmódio em novos ambientes e diferentes espécies de Anophelinae não são conhecidos (ROUGERON et al., 2022). Em relação a *P. simium*, estudos recentes demonstram que o processo de especiação está associado à ocorrência de transferência reversa de *P. vivax* de humanos para símios do novo mundo (DE OLIVEIRA et al., 2021; ROUGERON et al., 2022) *Plasmodium simium* foi descrita a partir de amostras de sangue, fígado, baço de símio *Alouatta fusca* do município de Itapeverica, São Paulo, graças às investigações sobre hospedeiros simianos do vírus amarelo (FONSECA, 1951). Posteriormente, Deane (1964) registrou a presença de *P. simium* e de *P. brasilianum* em *A. fusca* da região do Horto Florestal, na cidade de São Paulo, São Paulo. Revisando aspectos sobre a

epidemiologia da malária simiana, Deane (1992) observou que *P. simium* estava presente apenas em áreas da costa Atlântica do sudeste e sul do Brasil, tendo como vetor *Ke. cruzii*. No caso de *Plasmodium falciparum*, as evidências atuais indicam que a introdução da espécie nas américas ocorreu com a vinda de imigrantes europeus e o tráfico de escravos oriundos da África subsaariana a partir de 1620 (RUSSELL, 1968; YALCINDAG et al., 2012).

### 1.1 Vetores

No Brasil, os principais vetores de *Plasmodium* humanos na Amazônia são *Nyssorhynchus darlingi*, (anteriormente *Anopheles darlingi*) *Ny. marajoara* (anteriormente *Anopheles marajoara*) e *Ny. aquasalis* (anteriormente *Anopheles aquasalis*) (CARLOS et al., 2019). Nestas áreas, o desmatamento, as mudanças no uso da terra e problemas socioeconômicos como moradias precárias, má gestão do meio ambiente e condições sanitárias inadequadas são os principais facilitadores de contato entre humanos e mosquitos infectados (COHEN et al., 2017).

*Nyssorhynchus darlingi* é oportunista em relação às espécies de vertebrados das quais se alimenta de sangue, com preferência pelo sangue humano (NAGAKI et al., 2021). O pico de atividade é crepuscular, podendo se estender por toda a noite (OLIVEIRA et al., 2021). A espécie inclui populações endofágicas e exofágicas (FORATTINI, 1996).

Em áreas fora da bacia dos rios Amazonas / Solimões, o principal vetor de malária humana e simia é *Kerteszia cruzii* (anteriormente *Anopheles cruzii*), mosquito silvestre cujo nicho de desenvolvimento das fases iniciais de vida são fitotelmas de bromélias (Bromeliaceae) (FORATTINI, 1996). Espécies do gênero *Kerteszia* ocorrem em áreas costeiras dos oceanos Pacífico e Atlântico, desde o México até o sul do Brasil, sendo *Ke. cruzii* endêmico na região Sul e Sudeste do Brasil (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

No Brasil, em um estudo de infecção natural por *Plasmodium*, de 37 espécies de mosquitos coletadas, 27 foram testadas positivas, usando detecção ELISA da proteína circunsporozoíta (CSP), microscopia e/ou PCR. Dentre as 27 espécies de mosquitos testadas, 16 são classificadas no gênero *Nyssorhynchus*, sete no gênero *Anopheles* e quatro no gênero *Kerteszia*. A maioria das fêmeas analisadas estava infectada por mais de uma espécie de *Plasmodium* registrada no Brasil (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P.*

*malariae*). Estavam positivos para os três parasitas: *Ny. albitarsis*, *Ny. brasiliensis*, *Ny. darlingi*, *Ny. janconnae*, *Ny. marajoara*, *Ny. nuneztovari*, *Ny. oswaldoi*, *Ny. strodeji*, *Ny. triannulatus* e *An. medialis* (CARLOS et al., 2019).

Na Mata Atlântica, as fêmeas de *Ke. cruzii* exercem a hematofagia, preferencialmente, no dossel da floresta, em mamíferos, principalmente em roedores e macacos e em aves. Todavia, múltiplos estudos relatam alta densidade da espécie em nível do solo, onde podem forragear de sangue humano (MEDEIROS-SOUSA et al., 2019). Após o repasto sanguíneo, as fêmeas não repousam no ambiente domiciliar, por isso a espécie é considerada exofágica (FORATTINI et al., 1993).

A infecção natural de *Ke. cruzii* por plasmódios na Mata Atlântica foi abordada em diversos estudos, nos quais foram relatadas infecções por *P. vivax* / *P. simium*, *P. malariae* / *P. brasilianum* e *P. falciparum*, mesmo em momentos em que não havia descrição de casos humanos de malária na área (BRANQUINHO et al., 1997; BUERY et al., 2017; CERUTTI et al., 2007; COUTO, 2009; CURADO et al., 2006; DUARTE et al., 2008; DEANE, 1992; DEANE; DEANE; FERREIRA NETO, 1966; DUARTE et al., 2013; KIRCHGATTER et al., 2014; LAPORTA et al., 2015; NEVES et al., 2013; PINA-COSTA et al., 2014; REZENDE et al., 2009).

## 1.2 Parasitas

A malária pode ser causada por cinco espécies do gênero *Plasmodium*, família Plasmodiidae, filo Apicomplexa. Os protozoários são transmitidos aos humanos através da picada de fêmeas de 42 espécies da subfamília Anophelinae. Os insetos se infectam ao ingerir sangue de hospedeiro humano infeccioso, portador das formas denominadas gametócitos. As espécies capazes de infectar humanos são: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* e *Plasmodium simium* (MOURIER et al., 2021). *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* são as malárias mais comuns, enquanto infecções por *P. malariae* e *P. ovale* são mais raras. Destas, a infecção por *P. falciparum* é a mais fatal se não for tratada, podendo levar a complicações renais e cerebrais e até mesmo à morte (OPAS; OMS, [s.d.]).

O período de incubação extrínseco, também chamado de esporogonia, é o ciclo do parasita no mosquito visando criar esporozoítos infecciosos e tem duração, em média,

de 9 a 10 dias, mas pode chegar a 16 dias, dependendo da temperatura do ambiente de repouso. O período de incubação intrínseco, ocorre no organismo humano, e engloba desde a inoculação dos esporozoítos pela picada do mosquito, até o início dos sintomas. Este período inclui a fase hepática e eritrocitária e tem duração, em média, de 9 a 17 dias. No caso do *Plasmodium vivax*, devido à presença de hipnozoítos (formas intra-hepatocíticas latentes), é possível ter períodos de incubação tardios e recaídas aos 3 e 18 meses. Conhecer esses períodos de incubação é importante para identificar a origem da infecção dos casos (PAHO; WHO, [s.d.]).

Os gametócitos de *P. falciparum* na corrente sanguínea aparecem 7 a 15 dias após o início dos sintomas, enquanto os gametócitos de *P. vivax* aparecem e podem infectar os mosquitos antes do início da febre. Portanto, embora o diagnóstico e o tratamento oportunos sejam importantes para diminuir a gravidade da malária, eles também são importantes para evitar que mosquitos sejam infectados e, conseqüentemente, transmitam o parasita para pessoas suscetíveis (PAHO; WHO, [s.d.]).

Os sintomas clínicos da malária ocorrem devido à ruptura do esquizonte e destruição dos eritrócitos, e são febre, calafrio, mialgia e sudorese, podendo incluir também tontura, mal-estar, dor abdominal, náusea, vômito, diarreia leve, tosse seca, taquicardia, icterícia, palidez, hipotensão, e aumento do fígado e baço. Devido aos sintomas iniciais de malária se parecerem muito com infecções virais comuns, pode haver atraso no diagnóstico e medicação dos doentes, principalmente em áreas hipodêmicas (MINISTERIO DA SAÚDE, [s.d.]).

Deane (1966) relata o primeiro caso de infecção humana por *P. simium*, no qual o indivíduo apresentou crises de calafrios, dores de cabeça e febre a cada 2 dias, seguida de cura espontânea, conforme confirmado em esfregaços sanguíneos (DEANE; DEANE; FERREIRA NETO, 1966).

### 1.3 Hospedeiros

Nas regiões de Mata Atlântica, a malária se comporta como uma zoonose, sendo mantida por primatas não humanos (PNHs), principalmente os do gênero *Allouata* ou outros mamíferos (DUARTE et al., 2013; MONTEIRO et al., 2020), porém outras espécies de PNHs podem participar do ciclo de transmissão.



As condições de reprodução de *Ke. cruzii* em bromélias epífitas favorecem sua permanência no dossel das árvores, área frequentada pelos PNHs, que acabam sendo a principal fonte de repasto sanguíneo. Todavia, humanos em atividades de ecoturismo ou de trabalho em áreas de florestas podem ser picados por fêmeas infectadas, tornando-se hospedeiros acidentais no ciclo zoonótico (FERREIRA et al., 2021). Em estudos no Rio de Janeiro, de Alvarenga et al. (2015) encontraram PNH do gênero *Sapajus* infectados por *P. vivax* / *P. simium* e *P. malariae* / *P. brasilianum*. Encontro semelhante ocorreu em Santa Teresa, no Espírito Santo onde a presença de DNA de *P. falciparum* e *P. malariae* / *P. brasilianum* foi detectada em fezes de *Sapajus nigritus* de vida livre (FERREIRA et al., 2022)

#### 1.4 Ambiente

Mudanças no uso da terra, métodos agrícolas, padrões residenciais e comportamento humano podem interferir nas dinâmicas de transmissão da malária, bem como precipitação, temperatura e outras variáveis climáticas (GUBLER et al., 2001). Temperaturas mais altas diminuem o intervalo entre a infecção do mosquito pelo plasmódio e a capacidade do mosquito conseguir transmitir o parasita a um novo hospedeiro suscetível, bem como temperaturas mais baixas aumentam este intervalo e podem também diminuir a competência vetorial de determinada população de mosquitos (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021)

A presença de *Ke. cruzii* foi registrada em 94 localidades, sendo a maior parte destes locais em regiões de floresta ombrófila densa, onde o clima úmido e chuvoso, as rochas e o solo fértil, sustentam diversas espécies de bromélias no período que compreende de 1968 a 2019 (MARRELLI et al., 2007). Estudos de de Azevedo Fernandes et al., (2021) demonstram que a probabilidade de sobrevivência diária *Ke. cruzii* foi maior em áreas mais quentes, em latitudes mais baixas e a taxa de sobrevivência de *P. vivax* e *P. falciparum* aumentaria entre 10% e 13% em um cenário de aumento de 1 e 3,7°C de temperatura global, respectivamente (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021).

O período de incubação extrínseco dos plasmódios é reduzido com a elevação da temperatura. Em temperaturas superiores a 25 °C, a transmissão de malária é mais efetiva, sendo significativamente reduzida em temperaturas inferiores a 20 °C. Essa

redução deve-se ao fato de as taxas de sobrevivência das fêmeas serem reduzidas, portanto elas não sobrevivem o tempo necessário para completar o ciclo esporogônio que pode chegar a 56 dias em temperaturas baixas (LINDSAY; MARTENS, 1998).

### 1.5 Malária como problema de saúde pública

A rápida urbanização, mudanças nos padrões de uso da terra e aumento do comércio internacional colocam os humanos em contato mais frequente com vetores de doenças, enquanto mudanças climáticas e ambientais fazem com que doenças antes limitadas a áreas tropicais e subtropicais, sejam cada vez mais frequentes em áreas temperadas (PAHO; WHO, [s.d.]). A malária é uma das principais causas de morbidade nos países onde é endêmica. Em 2021, o número estimado de casos de malária foi 247 milhões em todo o mundo, e o número estimado de mortes atingiu 619.000 (PAHO; WHO, [s.d.]).

Segundo dados do boletim epidemiológico volume 53 Nº 17, de maio de 2022, que reúne informações dos casos de malária registrados no ano de 2021 nos bancos de dados de vigilância epidemiológica, 99,0% (137.857) dos casos no Brasil foram autóctones. Deste total, 17,0% (23.408) foram infecções por *P. falciparum* e malária mista e 83,0% (114.449) foram por *P. vivax* e outras espécies parasitárias (MINISTERIO DA SAÚDE, [s.d.]).

Segundo estimativa da OMS (Organização Mundial da Saúde), até 2050, sete em cada 10 pessoas no mundo viverão em ambientes urbanos. A urbanização não planejada pode levar a casos isolados de malária, resultando em uma carga de doença muito maior entre a população mais pobre ( PAHO/WHO, 2023).

#### 1.5.1 Amazônia

A transmissão de malária, no Brasil, é mais intensa na bacia do Rio Amazonas / Solimões, onde 33 municípios registraram, em 2021, 80,0% do total de casos autóctones. (CVE; SECRETARIA DE SAÚDE ESTADO DE SÃO PAULO, [s.d.]). Na Região Amazônica, a transmissão de *P. vivax* é disseminada, *P. falciparum* concentrada principalmente nos estados do Amazonas e Acre (CARLOS et al., 2019). Além das duas espécies, existe registro de infecção de primatas, principalmente,

*Cebidae* e *Atelidae* e, raramente, membros da família *Callithricidae* por *P. brasilianum* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; DEANE, 1995) na Amazônia brasileira.

Segundo o boletim epidemiológico número 53 de maio de 2022 da Secretaria de Vigilância em Saúde, a maior parte dos casos autóctones de malária em 2021 na Região Amazônica concentrou-se em áreas rurais e indígenas, com 50.609 e 45.642 casos autóctones, respectivamente. Nas áreas indígenas, 24,9% (11.367) dos casos foram de malária por *P. falciparum* e malária mista. As áreas de garimpo registraram 20.468 casos, um aumento de 45,3% se comparado a 2020, onde foram registrados 14.086 casos autóctones. Nestas áreas, 3.569 casos se deram por *P. falciparum* e malária mista (MINISTERIO DA SAÚDE, [s.d.]).

#### 1.5.2 Extra-amazônia

A região extra-amazônica apresentou aumento de 26,9% no número de internações em 2021 (189 internações) em relação a 2020 quando foram registradas 149 internações (MINISTERIO DA SAÚDE, [s.d.]). Estratifcando os casos de malária na região extra-amazônica no período de 2010 a 2021, verifica-se redução de 59,3% nas notificações de infecção (1.280 casos em 2010 para 521 casos em 2021). Do total de casos registrados, 1.178 foram autóctones, sendo 83,7% (986) por *P. vivax* e 15,5% por *P. falciparum* (182) (MINISTERIO DA SAÚDE [2], [s.d.]).

A situação da malária no bioma Mata Atlântica é caracterizada por poucos casos, envolvendo indivíduos assintomáticos ou oligosintomáticos com baixa parasitemia. A espécie de plasmódio com maior prevalência é a *P. vivax* que está associada ao ciclo de transmissão denominado “bromélia-malária” (CURADO et al., 2006; DEANE, 1992; FORATTINI, 1996). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado uma prevalência maior de mosquitos infectados por *P. falciparum*, principalmente em fragmentos florestais no sudeste brasileiro (DEMARI-SILVA et al., 2020; LAPORTA et al., 2015; LORENZ; PATANÉ; SUESDEK, 2015). Entre os anos 2015 e 2016 foram relatados 49 casos de malária autóctone no Estado do Rio de Janeiro; 82% dos infectados residiam em área urbana e relatam ter visitado áreas de mata atlântica a lazer ou trabalho. Foram analisadas 33 amostras destes infectados para sequenciamento de DNA mitocondrial, que resultaram em 28 amostras positivas para *P. simium*, indicando que houve transmissão zoonótica deste parasito (BRASIL et al., 2017).

## 1.6 Controle

Desde o início do Século. XX, o Brasil vem fazendo tentativas de controle da malária. Em 1940, estimativas mostravam que quase todas as regiões do país relatavam casos de malária (DEANE, 1988). A eliminação da malária foi atingida em alguns estados, em 1965, como consequência da campanha global de erradicação proposta pela OMS e adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil, através do uso de diclorodifeniltricloroetano (DDT) como inseticida para o controle dos vetores, e a cloroquina para tratar a infecção nos doentes. Mas essas ações não duraram muito tempo, de 1998 a 1999 houve um aumento de 34% no número de casos de malária na Amazônia brasileira. Em termos de incidência por espécie, dados de 2001 mostram que houve redução de 35% nos casos causados por *Plasmodium falciparum* e de 41% nos casos causados por *P. vivax* devido ao Programa de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (LOIOLA; SILVA & TAUIL, 2002).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), as recomendações para eliminação de casos de malária no mundo incluem estratégias “em massa” aplicadas a toda a população de determinada área em risco. As estratégias “direcionadas” são aplicadas às pessoas com maior risco de infecção do que a população em geral e as “reativas” são consideradas respostas a casos individuais. Em áreas com moderada a alta prevalência de *P. falciparum*, o tratamento preventivo intermitente com sulfadoxina-pirimetamina (SP) é recomendado. O uso de tratamento preventivo intermitente de malária em crianças em idade escolar é recomendado a todas as mulheres grávidas em área endêmica, independentemente do número de gravidezes anteriores, assim como em crianças de 5 a 15 anos ( PAHO/WHO, 2023) .

Em 2021, havia 84 países com malária endêmica, uma diminuição considerável quando comparada com 2020, quando 108 países registraram malária endêmica. O número de países que relataram menos de 100 casos de malária endêmica aumentou de seis no ano 2000 para 27 em 2021 (PAHO/WHO, 2023).

A cloroquina foi o tratamento mais eficaz para a malária e ainda é usada na maioria dos países para o tratamento de *P. vivax*, mas *P. falciparum* desenvolveu resistência ao produto. Como resultado, o tratamento recomendado é adicionar outros medicamentos à base de artemisina em adição à cloroquina. Entre as medidas

preventivas, o uso de mosquiteiros tratados com piretróides nas casas e a pulverização residual de inseticidas em ambientes fechados são recomendados. Esses cuidados agem diminuindo a exposição da população às picadas de mosquitos infectados (OPAS; OMS, [s.d.]).

## 2 JUSTIFICATIVA

A alta abundância de mosquitos vetores de malária geralmente está associada a aumento na incidência da doença (MARQUES et al., 2021). Áreas onde *Ke. cruzii* alterna-se entre copa das árvores e solo, costumam concentrar maior número de casos humanos de malária, pois esta dispersão permite que a espécie realize hematofagia tanto em primatas não humanos, como em humanos, aumentando o risco de zoonoses (BUERY et al., 2021).

No sudeste do Brasil, especialmente em áreas de Mata Atlântica, o principal reservatório de plasmódios humanos é bugio (*Allouata guariba clamitans*) (ABREU et al., 2019), mas esta espécie foi praticamente dizimada da área pelo recente surto de febre amarela. Justifica-se então investigar se a ausência deste reservatório afetou a prevalência de malária na área de Mata Atlântica estudada.

A malária que ocorre na Mata Atlântica se baseia em um movimento de transbordamento e retrocesso, com intensidade ainda não compreendida. Áreas onde infecções por plasmódios permanecem, mesmo que de forma residual, podem levar a aumento de casos da doença a longo prazo (BUERY et al., 2021).

Considerando-se as poucas informações sobre a dinâmica de transmissão da malária em áreas de Mata Atlântica na área de estudo, foi realizado um levantamento das espécies de anofelinos presentes no Vale do Ribeira, bioma Mata Atlântica, e sua possível infecção por plasmódios (*P. vivax* / *P. simium*, *P. falciparum* e *P. malariae* / *P. brasilianum*).

## 3 HIPÓTESE

- Na área de Mata Atlântica estudada circulam outras espécies de plasmódios com potencial para infectar humanos (*P. falciparum*, *P. malariae* / *P. brasilianum*) que não apenas *P. vivax* / *P. simium*.

- O parasito *P. vivax* / *P. simium* é a única espécie circulante na área de Mata Atlântica estudada.

#### 4 OBJETIVOS

Identificar as espécies de anofelinos que ocorrem na Reserva do Legado, na região do Vale do Ribeira, Sudeste do Estado de São Paulo.

Analisar se os anofelinos amostrados estão infectados por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*.

#### 5 METODOLOGIA

##### 5.1 Área de estudo

Foram feitas capturas de mosquitos em áreas do Legado das Águas – Reserva Votorantim, área de Mata Atlântica, localizada entre os municípios de Miracatu, Tapiraí e Juquiá, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo (Figura 01). A Reserva Legado das Águas é reconhecida como posto avançado da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Os responsáveis promovem programas de educação ambiental e ecoturismo. Ela possui área total de 31 mil hectares, sendo considerada a maior reserva privada de Mata Atlântica do Brasil, com 75% de sua área em estágio avançado de conservação (“O Legado – Legado das Águas”, [s.d.]).

Os municípios dos quais a Reserva Votorantim – Legado das Águas faz parte apresentaram, de 2007 a 2023, um total de 13 casos autóctones de malária (Tabela 01), sendo o município com maior incidência de casos, Tapiraí (07 casos em 16 anos) (CVE; SECRETARIA DE SAÚDE ESTADO DE SÃO PAULO, [s.d.]; GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, [s.d.]).

Figura 01 – Localização da Reserva Votorantim – Legado das Águas entre outras áreas de conservação.



Fonte: LUCAS, 2019

Tabela 01 – Série histórica de casos autóctones de malária na região estudada – 2007 a 2022 baseados em dados do Sivep-Malária atualizados em: 27/07/2023 e do Sinan atualizados em: 21/06/2023.

Ano	Município			Total
	Miracatu	Tapiraí	Juquiá	
2007	0	1	0	1
2008	2	3	0	5
2009	0	0	1	1
2010	0	0	0	0
2011	0	0	0	0
2012	0	0	0	0
2013	0	2	0	2
2014	0	0	0	0
2015	0	0	0	0
2016	0	0	0	0
2017	0	0	0	0
2018	0	0	0	0
2019	2	0	0	2
2020	0	0	0	0
2021	0	0	0	0
2022	1	1	0	2
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>13</b>

Fonte: CVE Governo do Estado de São Paulo, 2023.

## 5.2 – Coletas de espécimes

Foram realizadas seis coletas nos meses de setembro e novembro de 2021 e março, abril, maio e novembro de 2022. As atividades em campo ocorreram durante três dias em cada mês citado, no final do período vespertino e início do noturno, das 17:00 às 22:00 horas, utilizando armadilhas CDC com atração luminosa (Figura 02) e armadilha de Shannon (Figura 03), e durante o período matutino (das 9 às 12 horas) com atração por humano protegido. Os mosquitos foram identificados morfologicamente, empregando chave de identificação dicotômica (FORATTINI, 1996).

Figura 02 – Aspecto da armadilha CDC com atrativo luminoso instalada na área da Cachoeira Dezembro, Reserva "Legado das Águas", estado de São Paulo.



Fonte: Marina Rangel. 2022.



Figura 03 – Aspecto da armadilha de Shannon instalada na área da Trilha Suspensa, Reserva "Legado das Águas", estado de São Paulo.



Fonte: Marina Rangel. 2022.

Após as identificações, as fêmeas foram separadas em grupos de até 10 espécimes coletados no mesmo local, hora e data, acondicionados em tubo plástico de 1,5 ml e armazenados em freezer a - 20 °C no laboratório de análises biomoleculares da Faculdade de Saúde Pública – USP até a extração do DNA genômico (gDNA).

### 5.3 Extrações de gDNA

A extração de gDNA foi feita dos grupos de mosquitos seguindo o protocolo de Laporta et al. (2015) compilado abaixo:

“Os mosquitos coletados foram individualmente misturados com 500  $\mu$ L de tampão TEN (2 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,5 mM de EDTA e 5 mM de NaCl) com 5  $\mu$ L de 10% SDS (duodecilsulfato de sódio) e 3  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/ml). A mistura foi homogeneizada com um rasgador de tecido até a completa destruição do inseto e incubada por 1 hora a 56°C. Em seguida, 150  $\mu$ L de NaCl saturado (5 M) foi adicionado e a mistura agitada vigorosamente por 30 segundos. Após centrifugação a 5.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente (18-25°C), o sobrenadante foi transferido para um frasco plástico de 1,5 ml contendo 600  $\mu$ L de isopropanol frio. Este tubo, após várias inversões para ajudar na precipitação do DNA, foi mantido a -20°C durante a noite para aumentar a precipitação. O tubo contendo DNA foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O pellet foi então lavado quatro vezes com etanol 70%, e centrifugado a 5.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente para remover qualquer excesso de sal. O DNA foi seco e ressuspenso em 20  $\mu$ L de TE (2 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA).”

A extração de gDNA foi realizada no laboratório de Análises Biomoleculares da Faculdade de Saúde Pública da USP, utilizando -se homogenizador BeadBlaster 24™ (Benchmark), centrífuga 5415 R (Eppendorf), Concentrador 5301 (Eppendorf) e Thermomixer confort (Eppendorf).

#### 5.4 – PCR Tempo Real

O gDNA extraído foi submetido à tratamento com RNase e empregado em PCR em tempo real que amplifica fragmentos de 157 a 165 pares de bases da unidade 18S do DNA ribossômico (rDNA), seguindo o protocolo de Bickersmith et al. (2015), utilizando Mix Taqman Universal, (ThermoFisher Scientific), primers e sondas de *Plasmodium* spp. e sondas espécie-específicas *P. vivax*, *P. falciparum* (BICKERSMITH et al., 2015) e *P. malariae* (ROUGEMONT et al., 2004) (Tabela 01) sob as seguintes condições: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos por 50 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto). Como controles positivos, foram utilizados DNA extraído de amostras positivas de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* e como controle negativo, uma alíquota de água ultrapura.

A RT-PCR foi realizada no laboratório de Análises Biomoleculares da Faculdade de Saúde Pública da USP, utilizando -se centrífuga 5804 R (Eppendorf) e sistema StepOne™ Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). Primers e sondas foram sintetizados pela Life Technologies.

Tabela 02 – Oligo iniciadores e sondas utilizados na RT-qPCR da subunidade 18S do DNA ribossômico (rDNA).

	Primer	Sonda
<i>Plasmodium</i> spp. *	Plasmo1-F: GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA;	FAM- TCGTAATCTTAACCATAAAC- MG-BNFQ
	Plasmo2-R: AACCCAAAGACTTTGATTTTC TCATAA;	

Tabela 02 – Oligo iniciadores e sondas utilizados na RT-qPCR da subunidade 18S do DNA ribossômico (rDNA).

	Primer	Sonda	Final
<i>Plasmodium vivax</i> *	Vivax-F: GACTAGGCTTTGGATGAAAG ATTTTAA	Vivaxprobe: ATAAACTCCGAAGAGAAAA- MGBNFQ	NED-
<i>Plasmodium falciparum</i> *	Falc-F: GACTAGGTGTT- GGATGAAAGTGTTAAA	Falciprobe: VIC-TGAAG- GAAGCAATCTAAAAGTCACC TCGAAAGA-QSY	
<i>Plasmodium malariae</i> **	Mal-F: CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A	Malprobe FAM-CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT-MGBNFQ	

Fonte: \* BICKERSMITH et al., 2015; \*\* ROUGEMONT et al., 2004

### 5.5 - PCR aninhada do gene mitocondrial

As amostras positivas na PCR em tempo real da subunidade 18S foram submetidas a uma segunda etapa para verificar a presença de plasmódios nos grupos positivos para 18S. Nessa etapa, foi utilizado protocolo para PCR aninhada do gene do *citocromo b* do genoma mitocondrial, utilizando o protocolo de Siregar et al. (2015), utilizando 1 µl dos primers PfF3700 /PfR4615, resultando em um fragmento de 915 pb na primeira reação. A segunda reação utilizando 1 µl dos primers PfF 3700 / PfR4102, e resulta em um fragmento de 402 pb. Foram utilizados 5 µl de DNA na primeira reação, e 4 µl de produto da primeira reação para a segunda reação.

A PCR aninhada foi realizada no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical – USP utilizando termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C (primeiro par de primers) ou 52°C (segundo par de primers) por 15 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos (extensão final, 5 minutos) (NURALITHA et al., 2015). Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma), 3,0% em tampão TBE 1x (Tris borato 0,09M; EDTA 0,0002M) no equipamento Electrophoresis Power Supply – EPS 200 (Pharmacia Biotech) que utiliza uma voltagem constante de 90, Volts. Foi utilizado

um marcador de peso molecular de 50 pb. (Fermentas). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador UV Accuris E3000.

### 5.6 Sequenciamento Sanger

As reações de sequenciamento foram realizadas em ambas as direções usando os mesmos primers das reações de PCR com o produto *Big Dye Terminator* v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação de sequenciamento foi realizada em um volume total de 10 µL contendo 1 µL de produto da PCR purificado, 0,5 µL *Big Dye® Terminator* v3.1 *Ready Reaction Mix* (PE Applied Biosystems), 1 × *Sequencing buffer* (PE Applied Biosystems), 3,6 pmol de *primer* F ou R e o volume restante de água ultrapura. Os produtos do sequenciamento foram analisados em equipamento *Applied Biosystems 3130 DNA Analyzer* (PE Applied Biosystems, Warrington, Inglaterra).

As sequências de fragmento do gene *citocromo b* foram editadas, as regiões correspondentes aos primers foram removidas e depois alinhadas com o programa Geneious 6.1 (Biomatters, Auckland, New Zealand), juntamente com 16 sequências de *Plasmodium* obtidas do GenBank, sendo *P. gallinaceum* e *P. relictum* utilizadas como grupos externos. O alinhamento final foi composto por 18 sequências de 363 pares de bases. A reconstrução filogenética (Figura 4) foi feita utilizando o critério de otimização de máxima verossimilhança, no programa RAxML (STAMATAKIS, 2014) implementado na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>), com algoritmo “rapid bootstrapping” para cálculo do suporte estatístico. O modelo de evolução molecular utilizado foi o modelo geral de tempos reversíveis com distribuição gama (GTR+G), que utiliza diferentes taxas para cada mudança e frequência de nucleotídeos e/ou taxa de variação entre locais (ARENAS, 2015).

### 5.7 Análises estatísticas

Considerando que os mosquitos foram analisados em grupos, para estimar a razão mínima de infecção (RMI) das fêmeas, foi usada a fórmula:  $RMI = (x / n) \times 100$ , onde  $x$  é o número de grupos positivos e  $n$  é o número total de mosquitos testados (PAIVA et al., 2006). A estimativa da razão entre mosquitos infectados e mosquitos coletados para *Plasmodium* spp., *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. foi calculada somente

para *Ke. cruzii*, pois todos os grupos positivos eram compostos apenas por esta espécie. As razões foram estimadas assumindo que, em cada grupo positivo todos os mosquitos estavam infectados. A razão de infecção absoluta foi estimada para os grupos nos quais as fêmeas foram analisadas individualmente, e foi considerada como o número total de fêmeas infectadas dividido pelo total de *Ke. cruzii* no ponto de coleta, na data da coleta (KIRSTEIN et al., 2021).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Anofelinos

Foram obtidos 5.577 mosquitos, sendo 97% *Ke. cruzii* (5399 / 5577), 0,2% *Nyssorhynchus lutzii* (10 / 5577), 0,1% *Anopheles medialis* (6 / 5577), 0,07% *Anopheles fluminensis* (4 / 5577), 0,02% *Anopheles maculipes* (01 / 5577) e 2,9% *Kerteszia* spp. (157 / 5577), que não puderam ser identificadas em nível de espécie devido aos danos ocorridos nos espécimes durante as coletas, impedindo a análise dos caracteres empregados nas chaves. Após identificação por chave dicotômica padrão (FORATTINI, 1996), os mosquitos foram separados em grupos de até 10 mosquitos, coletados por mesmo método, local, data e hora, totalizando 811 grupos. Espécimes coletados por mês e local de coleta são discriminados na Tabela – 01.

Nas armadilhas de Shannon foram obtidos 5474 mosquitos, nas armadilhas CDC com atração luminosa foram obtidos 73 mosquitos, nas e atração por humano protegido foram obtidos 30 mosquitos.

Tabela 03 - Fêmeas de anofelinos coletadas na Reserva Votorantim – Legado das Águas no período entre setembro de 2021 e novembro de 2022.

Área de estudo	Categoria Taxonômica	Nº de espécimes	Número de grupos infectados/ mês de captura *			
			<i>Plasmodium spp.</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>
Suspensa	<i>Ke. cruzii</i>	872	Neg.	Neg.	01 (abr. 22) Neg.	Neg.
	<i>Kerteszia spp.</i>	6	Neg.	Neg.		Neg.
	<i>An. lutzii</i>	3	Neg.	Neg.	Neg. Neg.	Neg.
	<i>An. medialis</i>	1	Neg.	Neg.		Neg.
Cachoeira Dezembro	<i>Ke. cruzii</i>	1955	Neg.	01 (mar.22) ** Neg.	01 (nov. 22) Neg.	Neg.
	<i>Kerteszia spp.</i>	115	Neg.			Neg.
Porto Raso	<i>Ke. cruzii</i>	223	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Ribeirão da Anta	<i>Ke. cruzii</i>	2352	03 (abr. 22) 01 (nov.22)	Neg. Neg.	Neg. Neg.	01 (abr. 22) ***
	<i>Kerteszia spp.</i>	36	Neg.	Neg.	Neg.	Neg. Neg.
	<i>An. lutzii</i>	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	<i>An. medialis</i>	5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	<i>An. fluminensis</i>	4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg. Neg.
Cachoeira do Alecrim	<i>Ke. cruzii</i>	22	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Vila Verde	<i>An. maculipes</i>	1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Pedreira	<i>Ke. cruzii</i>	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	<i>An. lutzii</i>	4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

\* Número de grupos de anofelinos positivos para *Plasmodium*. Cada grupo contém até 10 espécimes.

\*\* Grupo nº 430: D 3210 (n=1), DNA de *P. vivax* / *P. simium* detectado pela RT-PCR do fragmento 18S e positivo para *Cyt b* 402 p.b. GenBank ID: OQ830680.

\*\*\* Grupo nº 671: RA 4518 – RA 4520 (n=3), DNA de *P. malariae* / *P. brasilianum* detectado pela RT-PCR do fragmento 18S e positivo para *Cyt b* 402 p.b. GenBank ID: OQ830681.

## 6.2 – RT-PCR

A PCR em tempo real resultou em quatro grupos positivos para *Plasmodium spp.*, um grupo positivo para infecção por *P. vivax* / *P. simium*, um grupo positivo para *P. malariae* / *P. brasilianum* e dois grupos positivos para *P. falciparum*. Todos os grupos positivos eram compostos por *Ke. cruzii*. Dentre as amostras positivas para gênero *Plasmodium*

(7 grupos), 04 amostras foram positivas somente para gênero e 03 foram positivas para gênero e espécie. Os resultados estão apresentados na tabela 04.

Os controles positivos utilizados variaram entre CT (Cycle threshold) 37 e CT 42 para as amostras positivas encontradas.

Tabela 04 – Resultados das análises moleculares para infecção por *Plasmodium* spp., *P. vivax* / *P. simium* / *P. falciparum* e *P. malariae* / *P. brasilianum*.

Ponto de Coleta / Grupo (n)	Real Time qPCR 18S rRNA Cycle threshold (Ct)				PCR aninhada gene Cyt-b
	P. spp.	Pv / Ps	Pm / Pb	Pf	Plasmodium Cyt b (GenBank)
<b>Ribeirão Anta</b>					
RA4518 (n=3)	<b>Pos (43.08)</b>	neg-	<b>Pos (46.99)</b>	neg	<b>Pm / Pb 4518KCVL (OQ830681)</b>
RA4366 (n=10)	<b>Pos (35)</b>	neg	neg	neg	neg
RA4397 (n=10)	<b>Pos (30.94)</b>	neg	neg	neg	neg
RA4457 (n=10)	<b>Pos (45.18)</b>	neg	neg	neg	neg
RA5166 (n=10)	<b>Pos (43,66)</b>	neg	neg	neg	neg
<b>Cachoeira Dezembro</b>					
D3210 (n=1)	<b>Pos (40)</b>	<b>Pos (40)</b>	neg	neg	<b>Pv / Ps 3210 KCRVLA (OQ830680)</b>
D4972 (n=1)	neg	neg	neg	<b>Pos (46.97)</b>	neg
<b>Trilha Suspensa</b>					
S3723 (n=2)	<b>Pos (46,98)</b>	neg	neg	<b>Pos (40.19)</b>	neg

### 6.3 – PCR aninhada do gene mitocondrial

As amostras positivas para PCR em tempo real foram submetidas à PCR aninhada para amplificar o gene do *citocromo b* 402 p.b. do genoma mitocondrial e somente os grupos nº 430 (D 3210) e grupo nº 671 (RA 4518 – RA 4520) amplificaram um fragmento de 420 p.b. conforme esperado, sendo assim, as duas amostras foram sequenciadas empregando tecnologia de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

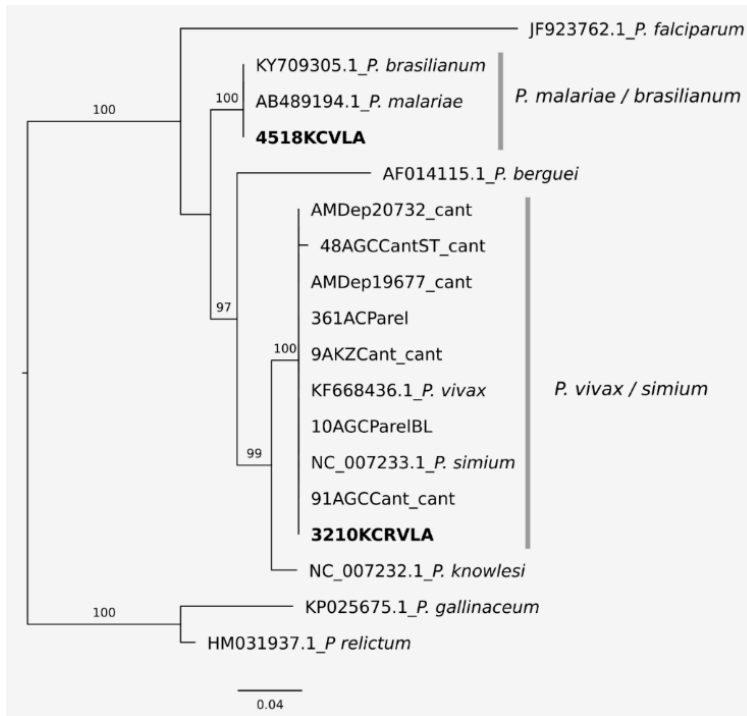
#### 6.4 – Sequenciamento

O grupo nº 430 (D 3210) resultou em uma sequência de 98 nucleotídeos que compartilha similaridade de 11% às sequências senso e 74% às sequências anti senso do gene mitocondrial *Cyt B* de *Plasmodium vivax* sequenciado a partir de amostras obtidas de humanos infectados, como relatado por RODRIGUES et al., (2018). As sequências geradas por Rodrigues et al. (2018) foram obtidas a partir do sangue de pessoas infectadas pelo parasita em Papua Nova Guiné, na Melanésia (Registro no GenBank - KY923373 a KY923413, KY923415, KY923417 a KY923423), do Panamá, na América Central (Registro no GenBank - KY923328 a KY923350) e do Espírito Santo, no Brasil (Registro no GenBank - KY923351 a KY923370 e KY923372).

O grupo nº 671 (RA 4518 – RA 4520) resultou em uma sequência de nucleotídeos 99% similar à sequência senso e 95% similar à sequência anti senso de mitogenoma de *Plasmodium malariae* encontrado em fezes de *Pan troglodytes* (Registro no GenBank - MF693452), *Plasmodium malariae*-like encontrado em fezes de *Gorilla gorilla* (Registro no GenBank– MF693444 E MF 693446) e uma amostra humana de *P. malariae* (Registro no GenBank - MF693442) de Camarões, na África central, registrados por Loy et al. (2018). A amostra também apresentou 99% de similaridade com a sequência senso de *Plasmodium brasilianum* coletado de macacos calitriquídeos (*Saguinus fuscicollis* e *Saguinus imperator*) em Madre de Dios, sudeste do Peru (registro no GenBank - MF693425), encontrados nos estudos de Erkenswick et al. (2017). As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: OQ830680 (grupo nº 430, amostra D 3210) e OQ830681 (grupo nº 671, amostras RA 4518 a RA 4520).

Figura 4 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança das espécies de *Plasmodium* incluindo as duas sequências obtidas em *Ke. cruzii* naturalmente infectados na Reserva Legado das Águas, São Paulo, Brasil (em negrito). Os valores nas ramificações indicam o suporte de “bootstrap”.





## 6.5 – Análises estatísticas

A proporção total de anofelinos naturalmente infectados por parasitas do gênero *Plasmodium* spp. foi 0,5% (4 / 811 grupos), 0,2% apresentavam infecção por *P. falciparum* (2 / 811 grupos), 0,1% infectados por *P. vivax* (1 / 811 grupos) e a mesma proporção de infectados por *P. malariae* (1 / 811).

A razão mínima de infecção (RMI) para *Plasmodium* spp. nos anofelinos coletados foi de 0,125, para *P. vivax* foi 0,02, assim como para *P. malariae* e para *P. falciparum* foi 0,035. As razões foram estimadas assumindo que cada grupo positivo continha ao menos um mosquito infectado (PAIVA et al., 2006).

As razões entre mosquitos infectados e mosquitos coletados foram estimadas assumindo que, em cada grupo positivo todos os mosquitos estavam infectados:

*Plasmodium* spp.: 40 / 5400 *Ke. cruzii* = 0,007

*P. vivax*: 1 / 5400 *Ke. cruzii* = 0,0002

*P. falciparum*: 3 / 5400 *Ke. cruzii* = 0,0005

*P. malariae*: 3 / 5400 *Ke. cruzii* = 0,0005

A razão de infecção absoluta foi calculada para os pontos em que foram encontrados grupos contendo somente 01 fêmea infectada, e foi considerada como o número total

de fêmeas infectadas dividido pelo total de *Ke. cruzii* no ponto de coleta, na data da coleta (KIRSTEIN et al., 2021). Razão de infecção absoluta por *P. vivax* na cachoeira Dezembro (Grupo nº 131) em março de 2022: 01 / 57 *Ke. cruzii* = 0,02; Razão de infecção absoluta por *P. falciparum* na cachoeira Dezembro (Grupo nº 230) em novembro de 2022: 01 / 101 *Ke. cruzii* = 0,01.

As estimativas de razão entre mosquitos infectados e mosquitos coletados também foram calculadas por ponto de coleta e local de coleta, e estão discriminadas na tabela 05.

Tabela 05 – Razão entre mosquitos infectados e mosquitos coletados por ponto de coleta e local de coleta.

	Suspensa	Porto Raso	Cachoeira Alecrim	Cachoeira Dezembro	Ribeirão da Anta	Vila Verde	Pedreira	TOTAL	M.I / M.C
set/ 21	<i>Ke. cruzii</i> : 108	<i>Ke. cruzii</i> : 223	<i>Ke. cruzii</i> : 22					<i>Ke. cruzii</i> : 353	0
nov/ 21	<i>Ke. cruzii</i> : 18			<i>Ke. cruzii</i> : 1131	<i>Ke. cruzii</i> : 1460			<i>Ke. cruzii</i> : 2609	0
mar/ 22	<i>Ke. cruzii</i> : 56			<i>Ke. cruzii</i> : 57	<i>Ke. cruzii</i> : 70			<i>Ke. cruzii</i> : 183	
				<i>P. vivax</i> : 01					<i>P. vivax</i> : 0,005
abr/ 22	<i>Ke. cruzii</i> : 417			<i>Ke. cruzii</i> : 634	<i>Ke. cruzii</i> : 151		<i>Ke. cruzii</i> : 1	<i>Ke. cruzii</i> : 1203	
	<i>P. falciparum</i> : 02								<i>P. falciparum</i> : 0,002
					<i>P. malariae</i> : 03				<i>P. malariae</i> : 0,002
					<i>Plasmodium</i> spp.: 30				<i>Plasmodium</i> spp.: 0,025

Tabela 05 – Razão entre mosquitos infectados e mosquitos coletados por ponto de coleta e local de coleta. Final

	Suspensa	Porto Raso	Cachoeira Alecrim	Cachoeira Dezembro	Ribeirão da Anta	Vila Verde	Pedreira	TOTAL	M.I / M.C
mai/ 22	<i>Ke. cruzii</i> : 1			<i>Ke. cruzii</i> : 4	<i>Ke. cruzii</i> : 155		<i>Ke. cruzii</i> : 1	<i>Ke. cruzii</i> : 161	0
nov/ 22	<i>Ke. cruzii</i> : 274			<i>Ke. cruzii</i> : 101	<i>Ke. cruzii</i> : 516			<i>Ke. cruzii</i> : 891	
				<i>P. falciparum</i> : 01					<i>P. falciparum</i> : 0,001
					<i>Plasmodium</i> spp: 10				<i>Plasmodium</i> spp.: 0,011
<b>TOTAL:</b>	874	223	22	1927	2352		2	5400	
<b>M.I / M.C</b>	<i>P. falciparum</i> : 0,002	0	0	<i>P. vivax</i> : 0,0005	<i>P. malariae</i> : 0,001	0	0		<i>P. falciparum</i> : 0,0005
					<i>Plasmodium</i> spp.: 0,02				

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados das pesquisas conduzidas na Reserva Legado das Águas corroboram estudos anteriores que demonstraram que *Ke. cruzii* é espécie frequente em áreas de Mata Atlântica (CHAVES et al., 2016). Acresce considerar que a identificação de espécies do protozoário *Plasmodium* em fêmeas de *Ke. cruzii* corrobora a importância do mosquito como vetor de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* na região extra-amazônica (DEANE, 1992).

Apesar de as razões de infecção detectadas neste estudo serem menores do que aquelas observadas por Laporta et al. (2015), que encontraram prevalência de *P.*

*falciparum* (4,4%) e de *P. vivax* (0,8%) no sudeste da Mata Atlântica, na Reserva Votorantim – Legado das Águas, ou as encontradas por Demari Silva et al. (2020), que relataram uma prevalência geral de mosquitos infectados 0,34% e uma razão de infecção por *P. vivax* de 0,006% (6 mosquitos infectados / 1019 mosquitos coletados) na mesma região onde foi conduzida esta pesquisa, a presença de *P. falciparum* em *Ke. cruzii* foi maior do que de *P. vivax* e *P. malariae*. Assim, os resultados dos estudos recentes ampliam abrangência e importância da “bromélia-malária”, inicialmente, associada à transmissão de *P. vivax* por espécies de *Kerteszia*. A identificação de *P. malariae* em *Ke. cruzii* indica a importância do mosquito como vetor de várias espécies de *Plasmodium* que podem infectar e causar malária em humanos. Resultados semelhantes foram observados por pesquisas recentes que registraram o encontro de *Ke. cruzii* naturalmente infectados por *P. vivax* ou *P. simium*, *P. malariae* ou *P. brasilianum* (BUERY et al., 2017; DEMARI-SILVA et al., 2020; DUARTE, ANA MARIA RIBEIRO DE CASTRO et al., 2021) e de humanos infectados por *P. simium* no Estado do Rio de Janeiro (BRASIL et al., 2017).

Os resultados de investigação realizada em áreas de floresta Atlântica no Espírito Santo, permitiu aos autores levantarem hipótese sobre a participação de *Ke. cruzii* na transmissão interespecífica tanto de *P. vivax* como *P. simium*. (BUERY et al., 2017). A presença de dois SNPs (Single Nucleotide Polymorphism, Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos) presentes em região do genoma mitocondrial dos parasitas que, segundo BRASIL et al. (2017), permitem a identificação das espécies *P. vivax* e *P. simium*, não estavam presentes nas amostras de sangue humano, nos tecidos de símios e nos mosquitos estudados, permanecendo a dúvida sobre qual espécie foi encontrada nas amostras analisadas por Buery et al. (2017).

A espécie de símio potencialmente agindo como reservatório de *Plasmodium* spp., segundo a literatura, são do gênero *Alouatta* sp. (DUARTE et al., 2006; MONTEIRO et al., 2020). Entretanto, as espécies de *Alouatta* que ocorrem na Mata Atlântica enfrentaram epizootia causada pelo vírus da febre amarela (YFV) entre 2016 e 2019 que dizimou a maior parte das populações (“Secretaria da Saúde [3]”, [s.d.]). A Reserva Votorantim – Legado das Águas monitora a presença de primatas não humanos na área e houve apenas um avistamento de bugio-ruivo, *Alouatta guariba*, desde 2019. O animal foi observado em janeiro de 2023 na área da Cachoeira Dezembro. Os estudos de Ferreira et al. (2021) no Espírito Santo tinham como

hipótese que a diminuição da população de bugios na Mata Atlântica resultaria na diminuição da taxa de infecção em *Ke. cruzii*. Aparentemente, não ocorreu redução na taxa de infecção dos mosquitos, na região investigada, que já havia apresentado infecção em anofelinos por *Plasmodium* anteriormente (BUERY et al., 2018).

Estudos de Duarte et al. (2006) evidenciaram a descoberta de anticorpos contra proteína de superfície circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax* em macacos *Cebus* sp. do Brasil, outros estudos com primatas dos gênero *Sapajus* e *Cebus* revelaram infecção natural por *P. vivax* / *P. simium* e *P. malariae* / *P. brasilianum* (DE ALVARENGA et al., 2015) e *P. falciparum* e *P. malariae* / *P. brasilianum* foram identificados nas fezes de *Sapajus nigritus* por Ferreira et al. (2022), reforçando a presença de outros gêneros de primatas, ou de outros mamíferos na manutenção das infecções por plasmódios na Mata Atlântica, como relatado por Duarte et al. (2021), que encontrou *P. falciparum* e outro parasito, com DNA semelhante ao de *P. berghei* e *P. chabaudi* em amostra de fígado de roedor.

Os resultados do presente estudo sugerem a circulação de possíveis variantes de *Plasmodium* sp. Ou espécies parasitas símios de malária que podem causar doença com sintomatologia atípica ou infecção assintomática, dificultando o diagnóstico pelos serviços de saúde. As infecções assintomáticas e a dificuldade de diagnóstico correto de malária em áreas de Mata Atlântica oferecem também um risco adicional, que é o de malária transfusional, como relata Maselli et al. (2014). Os autores encontraram prevalência elevada de infecção por *P. vivax* (2,26%) e *P. falciparum* (5,14%) em doadores de sangue assintomáticos da fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Estes doadores incluíam moradores e visitantes de áreas de Mata Atlântica do sudeste brasileiro. Em 2005, foi registrado o caso de um paciente portador de linfoma de Hodgkin que durante cirurgia cardíaca recebeu eritrócitos e plasma e doadores e, após alguns dias deu entrada na emergência com cefaleia e icterícia. Os exames laboratoriais indicaram a presença de infecção por *P. malariae* que levou o paciente a óbito. Durante investigação feita com os doadores de sangue, foi constatado que um deles havia feito viagem à cidade de Iguape, São Paulo. O resultado da IFA usando antígenos de *P. malariae* mostrou a presença de anticorpos IgG em títulos de 1:2.560 no doador. Um segundo paciente que recebeu sangue do mesmo doador também contraiu *P. malariae* (KIRCHGATTER et al., 2014).

O encontro de quatro grupos positivos para *Plasmodium* spp., que não foram positivos para as espécies pesquisadas (*P. vivax* / *P. simium*, *P. falciparum* e *P. malariae*/ *P. brasilianum*) sugere a circulação de outras espécies ou variantes das espécies investigadas. Esses resultados indicam a necessidade de continuar os estudos para identificar quais são as espécies de *Plasmodium* que ocorrem na Mata Atlântica da costa leste do Brasil e, posteriormente, compreender se elas podem causar infecções em humanos.

Entre as principais limitações deste estudo, devemos salientar a inespecificidade das técnicas moleculares na identificação precisa do parasita de origem não humana e a complexidade das linhagens evolutivas. Segundo alguns especialistas, é possível que *P. vivax* e *P. malariae* sejam as mesmas espécies que *P. simium* e *P. brasilianum*, respectivamente. Essa possibilidade decorre das semelhanças morfológicas, genética e imunológica dessas espécies (DE ALVARENGA et al., 2015; ESCALANTE et al., 1998; TAZI; AYALA, 2011).

## 8 CONCLUSÃO

A presença de *P. falciparum* foi identificada em área de reserva da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, onde a circulação de hospedeiros humanos é restrita aos moradores, pessoas que visitam a área em atividades de ecoturismo, trabalhadores da reserva e pesquisadores. Os resultados obtidos apontam que a densidade de mosquitos infectados por *P. falciparum* pode ser maior do que a de *P. vivax* e *P. malariae*. O encontro de mosquitos, naturalmente, infectados por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* indica a necessidade de programas de educação ambiental delineados aos frequentadores e moradores da região da reserva e do entorno. Acresce considerar a necessidade de pesquisas detalhadas sobre os taxa de *Plasmodium* que ocorrem na área estudada e na Mata Atlântica, com sequenciamentos dos genomas das espécies que são encontradas em localidades diversas do Brasil e América Latina.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. V. S. DE et al. Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007906, 9 dez. 2019.
- ARENAS, M. Trends in substitution models of molecular evolution. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.
- BICKERSMITH, S. A. et al. A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 573–576, 29 maio 2015.
- BRANQUINHO, M. S. et al. Infecção do Anopheles (Kerteszia) cruzii por Plasmodium vivax e Plasmodium vivax variante VK247 nos Municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 2, p. 189–193, set. 1997.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, 1 out. 2017.
- BUERY, J. C. et al. Mitochondrial genome of Plasmodium vivax/simum detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? **Malaria Journal**, v. 16, p. 437, 30 out. 2017.
- BUERY, J. C. et al. Ecological characterisation and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 111–118, fev. 2018.
- BUERY, J. C. et al. Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 132, jan. 2021.
- CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2019.
- CARVALHO-PINTO, C. J. DE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Isoenzimatic analysis of four Anopheles (Kerteszia) cruzii (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 471–475, ago. 2004.
- CERUTTI, C. et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 33, 19 mar. 2007.
- CHAVES, L. S. M. et al. Kerteszia Theobald (Diptera: Culicidae) mosquitoes and bromeliads: A landscape ecology approach regarding two species in the Atlantic rainforest. **Acta Tropica**, v. 164, p. 303–313, 1 dez. 2016.

COHEN, J. M. et al. Mapping multiple components of malaria risk for improved targeting of elimination interventions. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 459, 13 nov. 2017.

COUTO, R. D. Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública. 2009.

CURADO, I. et al. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 100, n. 1, p. 54–62, 1 nov. 2006.

CVE; SECRETARIA DE SAÚDE ESTADO DE SÃO PAULO. **CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. Dados Estatísticos - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/oldzoonoses/malaria/dados-estatisticos>>. Acesso em: 20 maio. 2023.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 81, 18 fev. 2015.

DE AZEVEDO FERNANDES, N. C. C. et al. Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 47–56, jan. 2021.

DE OLIVEIRA, T. C. et al. *Plasmodium simium*: Population Genomics Reveals the Origin of a Reverse Zoonosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 11, p. 1950–1961, 1 dez. 2021.

DEANE, L. M. Malaria Studies and Control in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 2, p. 223–230, 1 mar. 1988.

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

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; FERREIRA NETO, J. 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.

DEMARI-SILVA, B. et al. *Plasmodium* infection in *Kerteszia cruzii* (Diptera: Culicidae) in the Atlantic tropical rain forest, southeastern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 104061, 1 mar. 2020.

DUARTE, A. M. R. et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 58, 7 mar. 2013.

DUARTE, A. M. R. DE C. et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 2, p. 87–96, 2006.



DUARTE, A. M. R. DE C. et al. Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179–185, 1 ago. 2008.

DUARTE, A.M.R.C., et al. Complexity of malaria transmission dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 1, p. 100032, 1 jan. 2021.

ERKENSWICK, G. A. et al. Chronic Plasmodium brasilianum infections in wild Peruvian tamarins. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184504, 13 set. 2017.

ESCALANTE, A. A. et al. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8124–8129, 7 jul. 1998.

**Fact sheet about malaria.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>. Acesso em: 21 ago. 2023.

FERREIRA, L. M. et al. Residual malaria of Atlantic Forest systems and the influence of anopheline fauna. **Parasitology Research**, v. 120, n. 8, p. 2759–2767, 1 ago. 2021.

FERREIRA, L. M. et al. Anopheles (Kerteszia) cruzii infected by Plasmodium in the Atlantic Forest indicates that the malaria transmission cycle is maintained even after howler monkeys' population decline. **Parasitology Research**, v. 121, n. 12, p. 3627–3634, 1 dez. 2022.

FONSECA, F. DA. Plasmódio de primata do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 49, p. 543–551, mar. 1951.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 1- Parity of blood seeking Anopheles (Kerteszia) in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 1–8, fev. 1993.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2.** [s.l.] EdUSP, 1996.

FORNACE, K. M. et al. No evidence of sustained nonzoonotic Plasmodium knowlesi transmission in Malaysia from modelling malaria case data. **Nature Communications**, v. 14, p. 2945, 1 jun. 2023.

GERSZTEN, E.; ALLISON, M. J.; MAGUIRE, B. Paleopathology in South American Mummies: A Review and New Findings. **Pathobiology**, v. 79, n. 5, p. 247–256, 21 jun. 2012.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo, 2023. Sivep-Malária e Sinan; 2023.** Disponível em: <[https://public.tableau.com/views/BoletimMalrianasregiesamaznicaeextra-amaznica/Incio?%3Adisplay\\_static\\_image=y&%3AbootstrapWhenNotified=true&%3Aembed=true&%3Alanguage=en-US&:embed=y&:showVizHome=n&:apiID=host0#navType=0&navSrc=Parse](https://public.tableau.com/views/BoletimMalrianasregiesamaznicaeextra-amaznica/Incio?%3Adisplay_static_image=y&%3AbootstrapWhenNotified=true&%3Aembed=true&%3Alanguage=en-US&:embed=y&:showVizHome=n&:apiID=host0#navType=0&navSrc=Parse)>. Acesso em: 20 ago. 2023.

GUBLER, D. J. et al. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. suppl 2, p. 223–233, maio 2001.

KIRCHGATTER, K. et al. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (DIPTERA: CULICIDAE) IN PERIDOMICILIARY AREA DURING ASYMPTOMATIC MALARIA TRANSMISSION IN THE ATLANTIC FOREST: MOLECULAR IDENTIFICATION OF BLOOD-MEAL SOURCES INDICATES HUMANS AS PRIMARY INTERMEDIATE HOSTS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 403–409, out. 2014.

KIRSTEIN, O. D. et al. Natural arbovirus infection rate and detectability of indoor female *Aedes aegypti* from Mérida, Yucatán, Mexico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0008972, 4 jan. 2021.

LAPORTA, G. Z. et al. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 181, 25 abr. 2015.

LINDSAY, S. W.; MARTENS, W. J. Malaria in the African highlands: past, present and future. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 1, p. 33–45, 1998.

LORENZ, C.; PATANÉ, J. S. L.; SUESDEK, L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 144–152, 1 out. 2015.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L. M. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I--The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 3, p. 331–339, 1995.

LOY, D. E. et al. Investigating zoonotic infection barriers to ape *Plasmodium* parasites using faecal DNA analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 7, p. 531–542, 1 jun. 2018.

LUCAS, M. S. B. Anfíbios do Legado das Águas-Reserva Votorantim, SP. 29 mar. 2019.

MARQUES, R. et al. Climate change impacts on *Anopheles (K.) cruzii* in urban areas of Atlantic Forest of Brazil: Challenges for malaria diseases. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106123, 1 dez. 2021.

MARRELLI, M. T. et al. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 127, 19 set. 2007.

MASELLI, L. M. et al. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 224, 6 jun. 2014.

MEDEIROS-SOUSA, A. R. et al. Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of

malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. **Malaria Journal**, v. 18, p. 110, 2 abr. 2019.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Vol.53 Nº17 — Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no17.pdf/view>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

MINISTERIO DA SAÚDE [2]. **Boletim Epidemiológico Vol.53 Nº30 - 2022 - Malária na região extra-amazônica do Brasil série histórica de 2010 a 2021 — Ministério da Saúde**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria-1/boletins-epidemiologicos-de-malaria/boletim-epidemiologico-vol-53-no30-2022-malaria-na-regiao-extra-amazonica-do-brasil-serie-historica-de-2010-a-2021/view>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

MINISTERIO DA SAUDE [3]., **Boletim Epidemiológico Vol.51 Nº01** [s.d.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-vol-51-no-01>>. Acesso em: 23 ago. 2023

MONTEIRO, E. F. et al. Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 525, jul. 2020.

MOURIER, T. et al. The genome of the zoonotic malaria parasite Plasmodium simium reveals adaptations to host switching. **BMC Biology**, v. 19, p. 219, 1 out. 2021.

NAGAKI, S. S. et al. Host feeding patterns of Nyssorhynchus darlingi (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 213, p. 105751, 1 jan. 2021.

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

NURALITHA, S. et al. Within-Host Selection of Drug Resistance in a Mouse Model of Repeated Incomplete Malaria Treatment: Comparison between Atovaquone and Pyrimethamine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 258–263, 31 dez. 2015.

**O Legado – Legado das Águas**. , [s.d.]. Disponível em: <<https://legadodasaguas.com.br/o-legado/>>. Acesso em: 20 maio. 2023

OLIVEIRA, T. M. P. et al. Vector role and human biting activity of Anophelinae mosquitoes in different landscapes in the Brazilian Amazon. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 236, 6 maio 2021.

OPAS; OMS. **Malária - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/malaria>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

PAHO; WHO. **Global vector control response 2017–2030 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/documents/global-vector-control-response-2017-2030-0>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

PAIVA, B. R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2, p. 252–259, 1 out. 2006.

PINA-COSTA, A. DE et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 618–633, ago. 2014.

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

RODRIGUES, P. T. et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1993, 31 jan. 2018.

ROUGEMONT, M. et al. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636–5643, dez. 2004.

ROUGERON, V. et al. Evolutionary history of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium simium* in the Americas. **Malaria Journal**, v. 21, p. 141, 3 maio 2022.

RUSSELL, P. F. The United States and malaria: debits and credits. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 44, n. 6, p. 623–653, 1 jun. 1968.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **The Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017–1024, 27 mar. 2004.

SIREGAR, J. E. et al. Non-invasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 404, 12 out. 2015.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 1 maio 2014.

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

YALCINDAG, E. et al. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 511–516, 10 jan. 2012.