

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Natália Valério de Souza

**Levantamento de fauna anofélica (Diptera: Culicidae) e verificação da presença de protozoários nesses vetores no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.**

Florianópolis

2021

Natália Valério de Souza

**Levantamento de fauna anofélica (Diptera: Culicidae) e verificação da presença de protozoários nesses vetores no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luisa Damazio Rona Pitaluga  
Coorientadora: Msc. Kamila Voges

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Valério de Souza, Natália

Levantamento de fauna anofélica (Diptera: Culicidae) e verificação da presença de protozoários nesses vetores no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. / Natália Valério de Souza ; orientador, Luisa Damazio Rona Pitaluga, coorientador, Kamila Voges, 2021.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Malária. 3. Anopheles cruzii . 4. Plasmodium. 5. Tetrahymena. I. Pitaluga, Luisa Damazio Rona. II. Voges, Kamila. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Natália Valério de Souza

**Levantamento de fauna anofélica (Diptera: Culicidae) e verificação da presença de protozoários nesses vetores no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciatura em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, maio de 2021.

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luisa Damazio Rona Pitaluga  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Msc. Kamila Voges  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. José Henrique de Oliveira  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr<sup>a</sup> Julyana Cerqueira Buery  
Avaliadora  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Dr. Guilherme de Rezende Dias  
Suplente  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho aos meus pais Sérgio Murilo de Souza e  
Cristiane Valério de Souza e a minha avó Zulmira Valério.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo suporte que me proporcionaram para que eu conseguisse concluir a graduação. A minha família – irmãs, sobrinhos e avó – por todo apoio e amor que me deram durante a minha vida. Todo o apoio recebido foi crucial para que eu conseguisse atingir meus objetivos.

A Universidade Federal de Santa Catarina, por fazer um excelente trabalho promovendo ensino público de qualidade e contribuindo para a Ciência, mesmo em tempos difíceis e desafiadores.

A minha orientadora Luisa Damazio Rona Pitaluga por ter me acolhido no laboratório e por toda paciência e dedicação que teve comigo e com o meu projeto durante esses anos. A minha coorientadora Kamila Voges que sempre se mostrou muito presente e dedicada e que, sem sombra de dúvidas, contribuiu imensamente para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela oportunidade de atuar como Bolsista de Iniciação Científica, contribuindo para a minha formação. Ao professor André Nobrega Pitaluga por todo o auxílio durante a execução do projeto. Ao grupo do professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira (USP) por ceder às amostras de *Plasmodium* utilizadas neste estudo. A Fiocruz pela disponibilidade de realizar o sequenciamento das amostras. A Epagri, pelo fornecimento dos dados climáticos solicitados. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilização de equipamentos sempre que necessário. A todos os professores com quem tive o prazer de aprender durante minha trajetória.

Aos colegas e professores do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) por todo o auxílio que me foi dado sempre que necessitei. Em especial para meus colegas do grupo do Insetário: João Victor Guessier pelo auxílio e parceria na realização das coletas e Sabrina Fernandes pelo companheirismo nas intensas semanas de experimentos no laboratório. Vocês foram fundamentais para mim!

Ao meu companheiro Victor Santibañez, por todo carinho e suporte emocional nos dias mais difíceis e sempre me incentivar a buscar o melhor em mim.

As amigas que não posso deixar de citar, especialmente Damaris Martins, Paloma de Souza, Jamille Marques, Sofia Troppmair e Julya Santos. Cada uma de vocês possui um lugar no meu coração e sou imensamente grata por todas as trocas que tivemos. Espero levar a amizade e o carinho de todas pra vida. A todos os meus amigos e colegas que não foram

citados aqui, mas com quem tive o prazer de conviver e dividir muitos momentos, que tornaram mais leves todas as dificuldades que encontrei no caminho.

E por fim (e com certeza não menos importante) agradeço a mim mesma. Por todas as vezes que me ouvi, reconheci e respeitei meus limites, priorizei a mim mesma e minha saúde mental, por todos os momentos que precisei e consegui forças para me reinventar, olhar pra frente e seguir com foco nos meus objetivos. Agradeço por reconhecer meus erros e me permitir evoluir sempre. Talvez não seja comum, mas acredito que seja essencial reconhecer as mudanças internas que enfrentamos.

*“Tudo o que é silenciado clamará para ser ouvido ainda que silenciosamente”*

(ATWOOD, 1985).

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium* que é transmitida ao homem por mosquitos do gênero *Anopheles*. Em 2019, o Brasil registrou cerca de 175 mil casos da doença, que é mais frequente na região Amazônica. Contudo, a região da Mata Atlântica, que é ser rica em bromélias, criadouro larval das espécies de anofelinos do subgênero *Kerteszia*, também apresenta casos da doença, por. Na Mata Atlântica, o principal mosquito vetor da malária de bromélias é o *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, que também é incriminado como o único mosquito capaz de transmitir *Plasmodium sp.* de primatas não humanos ao homem. Devido à importância desse vetor, estudos de monitoramento da espécie em áreas preservadas são necessários para avaliar o risco de transmissão da malária nessas regiões. Portanto, este estudo tem como principal objetivo analisar, através de uma combinação de capturas em campo, identificações morfológicas e análises moleculares, como realização de PCR e sequenciamentos, a dinâmica da população de *An. cruzii* estabelecida na Unidade de Conservação do Desterro (UCAD) – Florianópolis, e detectar se esses anofelinos encontram-se infectados com *Plasmodium*, apresentando risco de transmissão da doença. Neste estudo, capturamos 229 anofelinos, sendo que a maioria foi identificada como *An. cruzii*. Ainda, observamos uma tendência ao predomínio de anofelinos em armadilhas instaladas na copa quando comparadas ao solo. Este fato pode ser relacionado ao comportamento acrodendrofilico de *An. cruzii*, e reforça a hipótese de que esse anofelino possui na transmissão de malária simiana. Além disso, coletamos maior número de anofelinos na primavera e no verão, confirmando o que já é descrito na literatura: que os mosquitos do subgênero *Kerteszia* são influenciados por fatores como clima e precipitação, ocorrendo nas estações mais quentes e chuvosas uma maior densidade populacional. Nas análises de infecção foi observada uma espécie de protozoário ciliado do gênero *Tetrahymena* infectando *An. cruzii*. Este achado surpreende, uma vez que nunca havia sido relatada a presença de *Tetrahymena* nesse anofelino. Ainda, observou-se que o fragmento analisado de *Tetrahymena* possui algumas semelhanças com *Plasmodium*, o que explica a amplificação deste protozoário ao usarmos *primers* que, a princípio, seriam específicos para *Plasmodium*. Apesar de instigante, a recente descoberta necessita de mais estudos, visando compreender melhor a influência da infecção por *Tetrahymena* em anofelinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Anopheles (Kerteszia) spp.*, malária, protozoário, Mata Atlântica, *Tetrahymena*.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* parasites that are transmitted to humans by mosquitos of the *Anopheles* genus. In 2019, Brazil registered around 175 thousand cases of the disease, which is most common in the Amazon region. However, the Atlantic rainforest region also has malaria cases, since it is rich in bromeliads, the larval breeding grounds for *Anopheles* species from the *Kerteszia* subgenus. In the Atlantic rainforest, the main malaria vector is *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, which also transmits *Plasmodium* spp. from primates to humans. Due to the importance of this vector, surveillance on this species in areas where vegetation is preserved is necessary to evaluate the risks of malaria transmission. Therefore, the main goal of this study is to analyze the population dynamics of *An. cruzii* at Unidade de Conservação do Desterro (UCAD – Florianópolis, Brazil) through the combination of field collection, morphological identification, and molecular analysis such as PCR and sequencing. It also aims to detect if those *Anophelines* are infected with *Plasmodium*, posing a risk to the transmission of the disease. In this study we collected 299 *Anophelines*, of which most were *An. cruzii*. Apart from that, we observed a tendency of anophelines to be predominant in the traps installed in the canopy in comparison to the ones installed on the ground. This fact may be related to the acrodendrophilic behavior of *An. cruzii*, and corroborates the hypothesis these anophelines have a role in transmitting simian malaria. Besides that, we were able to obtain a bigger number of anophelines collecting in the spring and summer than in other seasons, confirming what is found in the literature which says that mosquitoes from the *Kerteszia* subgenus are influenced by climate factors such as precipitation, occurring in bigger numbers in warmer and wetter seasons. In infection analysis, ciliate protozoans from the genus *Tetrahymena* were found infecting *An. cruzii*. This is a surprising find since the presence of *Tetrahymena* has never been documented in this anopheline. Moreover, it was possible to observe the *Tetrahymena* fragment analyzed has some genetic similarities with *Plasmodium*, which explains the amplification of this protozoan in primers which were designed specifically for *Plasmodium*. In spite of being intriguing, this recent discovery requires more study in order to better comprehend the influence of the *Tetrahymena* infection in anophelines.

**KEYWORDS:** *Anopheles (Kerteszia)* spp., malária, protozoário, Mata Atlântica, *Tetrahymena*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da UCAD (B) no município de Florianópolis (A).....	22
Figura 2: Armadilha luminosa de CDC com alimentação de CO <sub>2</sub> utilizada nas coletas.....	23
Figura 3: Número de anofelinos coletados nas armadilhas da copa e solo por coleta. Utilizando o teste de Mann Whitney (não paramétrico; não pareado) para análise estatística. Valor de P = 0,0982. ....	31
Figura 4: Médias de umidade nos 15 dias que antecedem as coletas de outubro de 2019 e fevereiro, junho, julho e novembro de 2020. Realizado ANOVA e obtido valor de P = 0,0001 com significância estatística para os meses de outubro e fevereiro, fevereiro e junho, outubro e novembro. As linhas horizontais referem-se à mediana de umidade dos 15 dias analisados. ....	32
Figura 5: Frequência de anofelinos em relação à média de umidade diária observada em cada coleta. Foi utilizada a análise de correlação de Spearman. Valor de P = 0,5994 (para solo). Valor de P = 0,3566 (para copa). ....	33
Figura 6: Anofelinos capturados, por estação do ano, no período de agosto de 2019 a novembro de 2020. Realizada Análise de Variância (ANOVA) para comparar a abundância da população nas estações do ano. Valor de P = 0,0139 (significância P < 0,05). ....	33
Figura 7: Frequência de <i>An. cruzii</i> em relação a precipitação média diária observada em cada coleta. Foi utilizada a análise de correlação de Spearman. Valor de P = 0,0743 (para solo). Valor de P = 0,4443 (para copa). ....	34
Figura 8: Frequência de <i>An. cruzii</i> em relação à temperatura média diária observada em cada coleta. Teste de correlação de Spearman foi realizado, porém não obteve-se significância. Valor de P = 0,5099 (para solo). Valor de P = 0,3170 (para copa).....	35
Figura 9: Frequência de <i>An. cruzii</i> em relação ao vento médio diário observada em cada coleta. Teste de correlação de Spearman foi realizado, porém não se obteve significância em nenhuma das análises (P = 0,7205 para copa e P = 0,8363 para o solo). ....	36

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Reagentes para preparo de SQ buffer .....	24
Quadro 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para detecção de <i>Plasmodium</i> spp. ....	25
Quadro 3: Reagentes para a primeira reação (gênero) da Nested-PCR .....	25
Quadro 4: Reagentes para a segunda reação (espécie) da Nested-PCR.....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de anofelinos coletados nas armadilhas do solo e copa por coleta.....	30
Tabela 2: Mosquitos com infecção positiva detectada por reação de PCR. A identificação das amostras se refere à copa (C-) ou solo (S-). Em algumas amostras foi observada infecção em tórax e abdômen, e em outros apenas uma porção do mosquito foi positiva para infecção.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18s – DNA ribossômico 18S

COI – citocromo c oxidase I

DIVE – Diretoria de Vigilância Epidemiológica

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAHO – *Pan American Health Organization*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

rDNA – DNA ribossomal

rRNA – RNA ribossomal

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

UCAD – Unidade de Conservação Ambiental Desterro

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	MALÁRIA .....	15
1.2	MOSQUITOS DO GÊNERO <i>ANOPHELES</i> .....	15
1.3	SUBGÊNERO <i>KERTESZIA</i> NO BRASIL .....	16
1.4	A MALÁRIA NO BRASIL .....	17
1.5	INFECÇÃO PLASMODIAL .....	18
1.6	PRESENÇA DE <i>Tetrahymena</i> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	LOCAL E MÉTODO DE COLETA: .....	22
3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ANOFELINOS.....	23
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	23
3.4	ANÁLISE MOLECULAR.....	24
3.5	SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS .....	27
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1	COLETAS E CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLIMÁTICAS.....	29
4.2	ANÁLISE DE INFECÇÃO .....	37
4.3	INFECÇÃO POR <i>TETHRAHYMENA</i> .....	40
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>53</b>
7.1	APÊNDICE A – ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS .....	53
7.2	APÊNDICE B – ALINHAMENTO COM <i>PLASMODIUM</i> SPP. ....	55

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MALÁRIA

A malária é considerada um grave problema de saúde pública, uma vez que todos os anos acomete milhões de pessoas e é endêmica em 87 países (WHO, 2020; RBM, 2019). Esta é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos ao homem por meio da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* (WHO, 2018). Apenas em 2019, estima-se que ocorreram cerca de 229 milhões de casos e 409 mil óbitos em decorrência da doença (WHO, 2020). De acordo com a OMS, em 2019 o Brasil, junto com a Venezuela e a Colômbia, representaram mais de 86% dos casos de malária na região das Américas (WHO, 2020).

A febre é o principal sintoma inicial da doença, podendo estar associado à sudorese, calafrios, tremores e dores de cabeça. Todavia, ela também apresenta sintomas de difícil reconhecimento, sendo muitas vezes confundida com outras doenças febris (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2016). Se a malária não for tratada no início, pode evoluir e se agravar, podendo levar o indivíduo à morte. Os grupos mais afetados pela doença são mulheres grávidas e crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2018).

### 1.2 MOSQUITOS DO GÊNERO *ANOPHELES*

O gênero *Anopheles* foi assim categorizado em 1818 pelo entomologista Johann Wilhem Meigem e, atualmente conta com 465 espécies distribuídas pelos subgêneros *Anopheles*, *Baimaia*, *Cellia*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia*, sendo apenas *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* considerados vetores dos parasitas que infectam humanos (HARBACH, 2013). Segundo Portes *et al.* (2010), cinco espécies de anofelinos têm maior envolvimento na transmissão de malária para humanos no Brasil: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator*.

### 1.3 SUBGÊNERO *KERTESZIA* NO BRASIL

O subgênero *Kerteszia* é distribuído do México ao Sul do Brasil, estando ausente no Chile, Uruguai e todas as ilhas do Caribe, com exceção de Trindade (COLLUCCI; SALLUM, 2003). Quanto à distribuição das espécies deste subgênero no Brasil, pode-se encontrar *An. cruzii* do Estado de Sergipe até a região Sul do país. Já *An. bellator* pode ser observado ao longo da costa do Nordeste, até o Amapá, *An. homunculus* em Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo, *An. bambusicolus* em Santa Catarina e Paraná e *An. laneanus* em grandes altitudes nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Outras duas espécies de *Kerteszia* também já foram registradas no território brasileiro: *An. neivai*, na região Amazônica, e *Anopheles boliviensis*, que se encontra com registros desatualizados (MARRELLI *et al.*, 2007).

Dentre as espécies de *Kerteszia*, *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus*, são consideradas os principais vetores da malária em regiões de Mata Atlântica como, no sul e sudeste do Brasil (MARRELLI *et al.*, 2007). Ademais, *An. cruzii* merece destaque por ser o único anofelino que já foi encontrado naturalmente infectado com as três espécies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*), sendo também o único responsável pela transmissão dos plasmódios de macacos (*P. brasilianum* e *P. simium*) aos humanos (Deane *et al.*, 1970), provavelmente devido a sua atividade hematofágica versátil e mobilidade vertical (UENO *et al.*, 2007; CARLOS *et al.*, 2019).

Segundo Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), as fêmeas de *An. cruzii* alimentam-se preferencialmente durante o período crepuscular. Suas fontes de alimentação sanguínea podem ser diversas, picando aves, humanos, e outros mamíferos. As fêmeas alimentam-se no ambiente silvestre e também adentram residências em busca de sangue humano (DEANE, 1986), sendo então consideradas antropofílicas. Elas possuem grande mobilidade entre o solo e a copa das árvores, realizando hematofagia em níveis mais elevados de florestas, tornando possível a infecção humana por *Plasmodium* de macacos em áreas de ocorrência de malária simiana (UENO *et al.*, 2007). Ainda, *An. cruzii* é considerada uma espécie eurigâmica, ou seja, possui a necessidade de formação de enxames para copular. Segundo Bates (1949), os enxames podem ser influenciados pelo estado fisiológico dos mosquitos, associação de espécies, presença de luz, correntes de ar, temperatura e umidade.

## 1.4 A MALÁRIA NO BRASIL

Em 2019, o Brasil registrou cerca de 175 mil casos de malária (WHO, 2020). Mais de 90% dos casos de malária no Brasil ocorrem na região Amazônica, tendo *An. darlingi* como o principal vetor (CARLOS *et al.*, 2019). Apesar de grande parte dos casos se concentrarem na região amazônica, o Brasil também apresenta casos de malária associados à Mata Atlântica. Esta é uma região rica em bromélias, que são criadouros de larvas das principais espécies vetoras da doença nessas regiões – os anofelinos do subgênero *Kerteszia* (MARRELLI *et al.*, 2007; KIRCHGATTER *et al.*, 2014).

A região onde originalmente existia Mata Atlântica abrange aproximadamente 15% do território brasileiro e possui mais de 72% de toda a população do país. Combinado com a alta incidência de casos importados da região Amazônica e da África, isso representa um alto risco de reintrodução da doença e de epidemias sazonais, como a que aconteceu há poucos anos no estado do Rio de Janeiro. De fato, o Brasil tem uma história centenária de combate à malária na Mata Atlântica, que era um grave problema de saúde pública, principalmente entre as décadas de 1940 e 1960, atingindo cerca de 40 mil casos por ano (DEANE 1986; 1988). Medidas de controle de vetores, incluindo remoção de bromélias e desmatamento, foram altamente eficazes na redução de casos de malária (DEANE, 1988). No entanto, a transmissão ainda ocorre dentro ou perto de florestas onde *An. cruzii* é encontrado. Além de ser um vetor da malária humana, *An. cruzii* também é um vetor natural de parasitas da malária simiana para humanos (DEANE *et al.*, 1970; 1971; BRASIL *et al.*, 2017).

Esses casos de paludismo que ocorrem nas regiões extra-amazônicas costumam ter um diagnóstico mais difícil, pois devido à baixa incidência da doença nessas áreas, faltam profissionais treinados no reconhecimento da doença e capazes de fazer diagnósticos clínicos e laboratoriais precisos. Por esse motivo, apenas 19% dos casos são diagnosticados e tratados nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas. Portanto, a taxa da letalidade por malária é muito maior na região extra-amazônica do que na Amazônia. Isso indica que a chance de morrer devido a malária é dez vezes maior se a doença for diagnosticada na região extra-amazônica, mesmo em Estados que possuem recursos tecnológicos e médicos muito mais avançados (PINA-COSTA *et al.*, 2014). Recentemente, o caso da atriz Camila Pitanga ganhou notoriedade na mídia, quando foi revelado que após ficar em isolamento social devido à

Covid-19 em uma região de Mata Atlântica, no litoral de São Paulo, a atriz e sua filha estariam com picos de febre, sendo diagnosticadas com malária dez dias após início dos sintomas. A atriz ainda ressaltou a importância da doença, destacando que ela existe, é curável, mas que necessita de cuidados (G1, 2020). De fato, esse caso não pode ser tratado como um caso isolado desta região, uma vez que ainda ocorrem casos extra-amazônicos em diferentes locais, como no Estado do Rio de Janeiro, onde, entre 2015 e 2016, foram notificados 49 casos de malária (BRASIL *et al.*, 2017). Essas notificações reforçam a importância do monitoramento da doença na região da Mata Atlântica.

## 1.5 INFECÇÃO PLASMODIAL

Cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* são capazes de causar malária em humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (JOHNSTON *et al.*, 2006; COX-SINGH *et al.*, 2008). Porém, apenas três espécies são encontradas no Brasil: *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, sendo a maioria dos casos registrados causados por *P. vivax* (PINA-COSTA *et al.*, 2010). Além disso, Brasil *et al.* (2017) relataram infecções por *P. simium*, um plasmódio de macacos, em pacientes acometidos por malária no estado do Rio de Janeiro, levantando assim a possibilidade de ocorrência de malária zoonótica ocasionada por esse parasita.

*An. cruzii* já foi encontrado naturalmente infectado com as três espécies de *Plasmodium* encontradas no Brasil, sendo também responsável pela transmissão dos plasmódios de macacos (*P. brasilianum* e *P. simium*) ao homem (Deane *et al.*, 1970), provavelmente devido a sua atividade hematofágica versátil e mobilidade vertical (UENO *et al.*, 2007; CARLOS *et al.*, 2019).

Kirchgatter *et al.* (2014) utilizaram a técnica de PCR como método de detecção plasmodial em anofelinos capturados na cidade de Juquitiba, no estado de São Paulo. Nesse estudo, foram confirmadas infecções por *P. vivax* e *P. malariae* em *An. cruzii*. Além disso, os mosquitos foram testados para identificar a fonte de alimentação de sangue e todos os resultados foram identificados como DNA de sangue humano. Segundo os autores, o fato de sangue de macaco não ter sido detectado nesses anofelinos não corrobora a hipótese de a

malária ser uma zoonose; o que os dados obtidos sugerem é que portadores humanos de malária assintomática são a principal fonte de infecção e manutenção dos parasitas em ambiente peridomiciliar.

Em um estudo mais recente sobre detecção plasmodial, Buery *et al.* (2018) atestaram a presença de *P. vivax* e *P. simium* em 13 pools anofelinos coletados em Santa Tereza, no estado do Espírito Santo, sendo 10 identificados como *An. cruzii*, mantendo então a espécie como principal vetor encontrado na área estudada. Além disso, os autores sugerem que a presença de *P. vivax* / *P. simium* se deve ao fato de que esses anofelinos se alimentam também do sangue de animais que vivem na copa das árvores.

No Espírito Santo e em outros estados como Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro, onde são reportados casos importados e autóctones da doença todos os anos (SINAN, 2011; DIVE, 2014), *An. cruzii* é considerado o principal vetor de malária (MARRELLI *et al.*, 2007). Mesmo com a presença abundante desses mosquitos nessas regiões, atualmente tais insetos não são alvo de vigilância entomológica. A persistência da transmissão de malária autóctone e o aumento do ecoturismo nesses locais justificam a necessidade de monitoramento dessa espécie, que é característica de áreas preservadas (UENO *et al.*, 2007).

Recentemente foi realizado um levantamento sobre a situação da malária no estado de Santa Catarina onde foi observado que foram notificados mais de 250 casos da doença no estado no período de 2008 a 2018. Ainda nesse estudo, foi observado que 2% desses casos são autóctones, ou seja, provavelmente a infecção ocorreu em Santa Catarina e, como reforça a autora, é possível que os casos autóctones sejam causados por *P. simium*, com macacos atuando como reservatório de *Plasmodium*. Os demais casos são provenientes das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e de fora do país. Em relação aos parasitas, destaca-se a maioria dos casos em Santa Catarina ocasionados por *P. vivax*, seguido por *P. falciparum* e coinfeções das duas espécies. Um caso foi registrado causado por *P. malariae*, advindo da África do Sul. (MADALENA, 2019).

Pouco se sabe sobre os casos de malária autóctones extra-amazônicos, distribuídos nas regiões da Mata Atlântica (em especial no estado de Santa Catarina), e sobre os fatores envolvidos na cadeia de transmissão da malária nesse bioma. Nesse cenário, os estudos que visam compreender os anofelinos vetores de regiões extra-amazônicas tendem a contribuir

para a avaliação do risco de transmissão da malária. Não é bem compreendido o possível efeito da coexistência de anofelinos, primatas não-humanos e os seres humanos na transmissão de malária nesse bioma. Acredita-se, entretanto, que a transmissão da doença na Mata Atlântica seja diferente daquela que ocorre na Amazônia, uma vez que a natureza da paisagem local e as espécies de anofelinos ali encontrados são distintas (CARLOS *et al.*, 2019). Assim, estudos que visam à correta identificação das espécies de possíveis vetores e o conhecimento da epidemiologia da malária no estado de Santa Catarina são importantes para o sistema público de saúde, pois eles podem fornecer a base para futuras medidas de vigilância e prevenção, e os resultados obtidos podem ser extrapolados para outras regiões cobertas pela Mata Atlântica em diferentes estados do Sul e Sudeste do Brasil.

#### 1.6 PRESENÇA DE *TETRAHYMENA*

Além de *Plasmodium* spp., outros protozoários podem ser encontrados em mosquitos, como *Tetrahymena* spp. Esses são ciliados, que podem ser de vida livre e ainda ocupar uma diversidade de habitats, podendo ser encontrados em criadouros larvais e até mesmo em mosquitos adultos (CORLISS, 1961). Já foram observadas espécies de *Tetrahymena* em diversos gêneros de mosquitos, como *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (GRASSMICK; ROWLEY, 1973; WASHBURN *et al.*, 1989). Dentre as espécies de *Anopheles* pode-se citar: *Anopheles albitarsis*, *Anopheles strodei*, *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles darlingi* e *Anopheles oswaldoi* (CORLISS, 1961; WASHBURN *et al.*, 1989; BARROS *et al.*, 2006). Estudos sugerem que esse protozoário possa causar esterilidade em mosquitos adultos (WASHBURN *et al.*, 1989), o que pode sugerir potencial para o controle de mosquitos vetores, merecendo assim maiores estudos para averiguar a influência de *Tetrahymena* em populações de *Anopheles* e sobre a interação de indivíduos desse gênero com *Plasmodium*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Dado a importância de *An. cruzii* como vetor de malária na região de Mata Atlântica, o presente estudo tem o intuito de investigar a presença de protozoários do gênero *Plasmodium* na população de *An. cruzii* da Unidade de Conservação Ambiental do Desterro (UCAD) e realizar uma correlação da sazonalidade e densidade dessas amostras com as influências climáticas, como precipitação, temperatura, força do vento e umidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

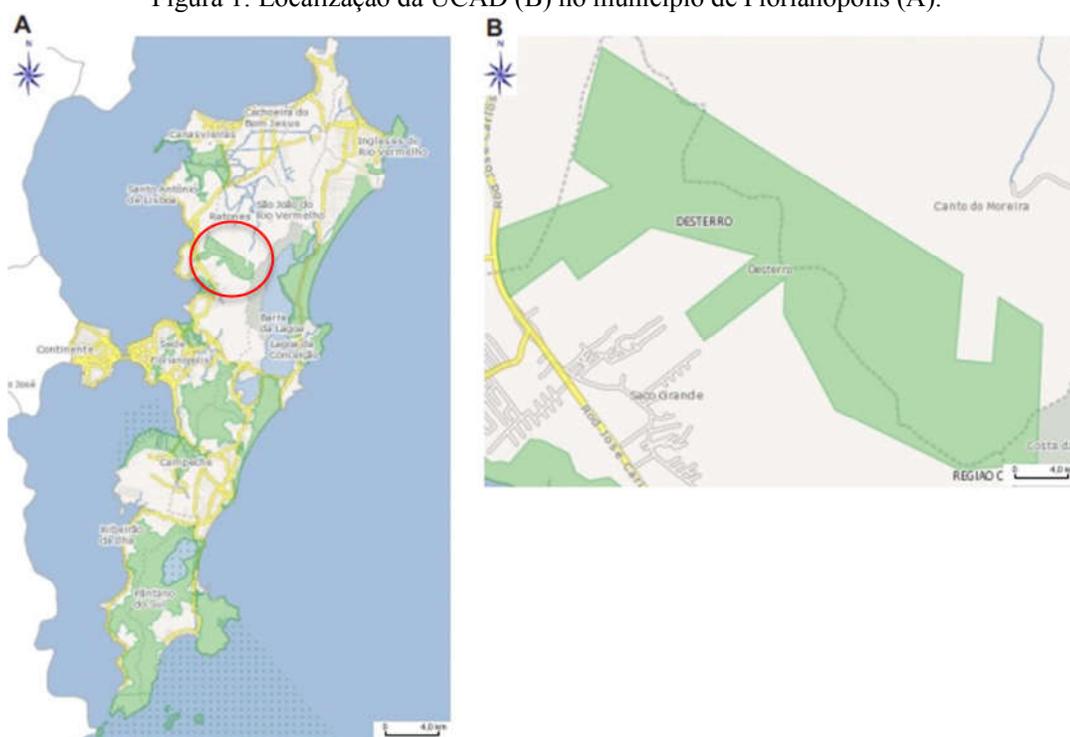
- Realizar um estudo ecológico da fauna de anofelinos da UCAD, correlacionando padrões de distribuição sazonal e densidade populacional com fatores climáticos, como temperatura, umidade, força do vento e precipitação;
- Verificar a presença de protozoários nos anofelinos coletados;
- Identificar as espécies de protozoário infectantes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL E MÉTODO DE COLETA:

As coletas foram realizadas na Unidade de Conservação Ambiental Desterro – UCAD (-27.5254824, -48.5109176), município de Florianópolis, Santa Catarina (Figura 1).

Figura 1: Localização da UCAD (B) no município de Florianópolis (A).



Fonte: Modificado de <http://geo.pmf.sc.gov.br>

As coletas foram realizadas de agosto de 2019 a novembro de 2020, durante a segunda quinzena de cada mês utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC com cilindro de CO<sub>2</sub> (Figura 2). Duas armadilhas foram instaladas simultaneamente na mesma área dentro da mata, sendo uma delas na copa de uma árvore (em torno de 10 metros de altura) e a outra no nível do solo. As coletas tiveram a duração de 14 horas e as armadilhas foram instaladas cerca de uma hora antes do pôr do sol e retiradas pela manhã, de forma a contemplar o horário

preferencial de repasto sanguíneo das fêmeas de *An. cruzii* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994),

Figura 2: Armadilha luminosa de CDC com alimentação de CO<sub>2</sub> utilizada nas coletas.



### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ANOFELINOS

No laboratório foi realizada a triagem dos insetos coletados e os anofelinos foram identificados com base na chave para identificação de adultos de *Anopheles* que ocorrem no Brasil, disponível em Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Após a identificação da morfologia externa, os mosquitos foram conservados em etanol absoluto a -20°C para análise molecular de presença de protozoários.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Todos os mosquitos identificados como *An. cruzii* coletados no decorrer do projeto tiveram o DNA genômico extraído segundo Jowett (1998), por meio de um método de extração rápida utilizando o SQ buffer feito com os seguintes reagentes:

Quadro 1: Reagentes para preparo de SQ buffer

Reagente	Volume
Água destilada	24,6 ml
EDTA (0,5M)	100 ul
Tris-HCl (1M)	250 ul
Triton absoluto	50 ul

Os mosquitos foram separados em duas partes distintas: cabeça + tórax (T) e abdômen (A), que tiveram seu DNA genômico extraídas individualmente. A extração foi realizada desta forma para saber se havia probabilidade de os protozoários encontrados estarem presentes nas glândulas salivares, uma vez que se o *Plamodium* chega à glândula em sua forma infecciosa, o mesmo está apto para ser transmitido.

Após esse processo de divisão das partes, foi adicionado em cada tubo de amostra individual, 20ul de SQ buffer e as partes de cada mosquitos foram maceradas individualmente. Então, foi adicionado mais 80 ul de SQ buffer, e 1 ul de proteinase K (20mg/ml). Essa solução foi incubada em banho seco a 37°C por 1 hora, e posteriormente incubada a 100°C por 10 minutos para inativação da proteinase K.

### 3.4 ANÁLISE MOLECULAR

Para a padronização da PCR de detecção plasmodial foram utilizadas amostras de DNA extraído de *P. vivax* e *P. falciparum* (PV1 FAS 1/11 e PF1 SAD 5/11, respectivamente) doados gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira da USP. A técnica utilizada foi *Nested-PCR* baseada no protocolo descrito por Kimura *et al.* (1997) e modificado por Win *et al.* (2002). O fragmento de DNA alvo foi a unidade ribossomal 18S DNAr (ALENCAR *et al.*, 2017) (Quadro 2). Basicamente, a técnica consiste em duas rodadas de PCR, onde a segunda utiliza o produto de PCR da primeira reação com um par de *primers* internos.

Quadro 2: Sequência dos *primers* utilizados para detecção de *Plasmodium* spp.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>
PIUP	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG
P2	GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT
P1	ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT
V1	CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA
F1	CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG

Na primeira reação da *Nested-PCR* (gênero-específica) as amostras foram agrupadas em *pools* com até 10 amostras, separados em *pools* de DNA extraído de tórax e abdômen. Os *pools* que apresentaram amplificação positiva foram posteriormente analisados individualmente, a fim de saber exatamente quantos anofelinos estavam infectados. A reação para gênero foi realizada para um volume final de 20ul, utilizando os reagentes conforme descrito no quadro 3:

Quadro 3: Reagentes para a primeira reação (gênero) da *Nested-PCR*

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade 1x</b>
H <sub>2</sub> O MiliQ	10,5 ul
Buffer 5x	4 ul
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2 ul
DNTP (10uM)	0,40 ul
<i>Primer</i> PIUP (10uM)	1 ul
<i>Primer</i> P2 (10uM)	1 ul
Go Taq	0,1 ul

DNA	1 ul
-----	------

A reação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de 95°C por 9 minutos, 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e para finalizar um ciclo de 72°C por 7 minutos.

Na segunda reação da *Nested-PCR* (espécie-específica), foram testadas apenas as amostras individuais que obtiveram resultados positivos na reação gênero-específica. Para um volume final de 20ul, foram utilizados reagentes conforme descrito no quadro 4:

Quadro 4: Reagentes para a segunda reação (espécie) da *Nested-PCR*

Reagente	Quantidade 1x
H <sub>2</sub> O MiliQ	10,5 ul
Buffer 5x	4 ul
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2 ul
DNTP (10uM)	0,40 ul
<i>Primer</i> P1 (10uM)	1 ul
<i>Primer</i> V1 (ou F1) (10uM)	1 ul
Go Taq	0,1 ul
DNA	1 ul

A reação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de 95°C por 9 minutos, 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e para finalizar um ciclo de 72°C por 7 minutos. A segunda reação contém dois pares de *primers*, sendo a princípio desenhados para obtenção de especificidade de diferentes espécies de *Plasmodium*. Portanto, ao realizar a segunda reação, foram realizados dois mix de PCR, um para cada par de *primer*, P1 e V1 para *P. vivax* e P1 e F1 para *P. falciparum* (quadro 2).

Em todas as reações foram utilizados controles negativos, com todos os reagentes com exceção de DNA, que foi substituído por H<sub>2</sub>O MiliQ. A confirmação das reações de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose seguindo o seguinte protocolo: 0,3g de agarose; 30ml de TAE 1x; 1,5 ul de unisafe dye. Os géis foram revelados com utilização de luz ultravioleta.

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas sete amostras individuais de tórax dos mosquitos positivos na primeira reação de PCR (gênero específica). As amostras de PCR foram purificadas utilizando o *Kit Qiaquick PCR Purification Qiagen*, seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram submetidas à quantificação de DNA utilizando *NanoDrop® Spectrophotometer*.

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o seguinte protocolo: 1 ul do produto de PCR da amostra a ser sequenciada; 2,5 ul do *primer* (P1UP para amostras *foward* e P2 para amostras *reverse*) e 4 ul de H<sub>2</sub>O miliq.

As amostras foram enviadas para a Fiocruz – RJ, que realizou o sequenciamento do DNA presente nas amostras. As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger, utilizando o aparelho *Applied Biosystem 3130xl DNA sequencer*.

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando o *software* ClustalO, com as sequências obtidas e sequências disponibilizadas no GenBank (seq. ID MN994471.1).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas correlacionando variáveis climáticas, os dados de precipitação, temperatura, vento e umidade foram gentilmente disponibilizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), para os dias e período em que foram realizadas coletas.

Primeiramente foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para determinar se a população

possuía distribuição normal, ou se os valores de captura obtidos foram aleatórios. Para avaliar a correlação entre as variáveis climáticas e abundância de mosquitos, foi empregada a análise de correlação de Spearman. O teste Mann Whitney foi utilizado para verificar se o número de mosquitos capturados na copa e no solo era significativamente diferente. Esse teste substitui o t-Test e é comumente utilizado em amostras independentes e não paramétricas. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar a incidência de mosquitos em relação às estações do ano. Para verificar se o nível de infecção em anofelinos foi significativo, empregamos o teste de Wilcoxon.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COLETAS E CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLIMÁTICAS

No total, 229 anofelinos foram capturados de agosto de 2019 a novembro de 2020, em 20 coletas diferentes. A maioria dos mosquitos coletados foi identificada como *An. cruzii* (226), no entanto três insetos foram classificados como *An. neivai* (2) e *An. homunculus* (1). Nos meses agosto, setembro, outubro (2019) e março (2020) foram necessários realizar mais de uma coleta, devido a problemas encontrados, como a falta de bateria nas armadilhas ou o cabo de alimentação de CO<sub>2</sub> ter desconectado durante coleta.

Neste estudo, foi observado predomínio de *An. cruzii* coletado na armadilha da copa (cerca de 65,1%) em relação ao solo (34,9%) – conforme mostrado na tabela 1 e figura 3. A predominância de *An. cruzii* nas partes mais altas da mata pode ser devido ao fato desses mosquitos se atraírem pela presença de símios, ou seja, a preferência alimentar deste anofelino é considerada eclética e a espécie possui grande mobilidade entre o solo e a copa das árvores (UENO *et al.*, 2007). Ainda, a característica acrodendrofilica da espécie, reforça a hipótese que esse anofelino possui um importante papel na transmissão de malária simiana, tornando possível a infecção humana por *Plasmodium* de macacos, conforme relatado por Brasil *et al.*, (2017). Apesar disso, alguns espécimes foram coletados no nível do solo, o que reforça o aspecto eclético destes vetores, que podem ser atraídos por diferentes fontes de sangue, como humanos e outros mamíferos.

Apesar de ser observado um predomínio de anofelinos capturados na copa, quando empregamos o teste de Mann Whitney para verificar se existe diferença significativa entre os valores de captura observados na copa e no solo (para dados não paramétricos; valor de P = 0,0952) não se obteve significância estatística. Todavia, é importante ressaltar que em uma das coletas realizadas (dia 21/10/2019), obtivemos uma discrepância muito grande em relação às outras, com 62 anofelinos capturados no solo e 14 na copa. Esse resultado pode ter variado devido à presença de abundante fonte alimentar humana (em torno de sete pessoas) até o horário de pico desses insetos, uma vez que por volta das 18h15min os pesquisadores e alunos ainda estavam realizando a instalação das armadilhas, devido a um problema na hora de içar a CDC da copa. Isso não se repetiu nas outras coletas. Por alimentarem-se preferencialmente

durante o crepúsculo vespertino e serem ecléticos em relação à atividade hematofágica, a situação estava favorável para que esses anofelinos descessem no nível do solo para realizar a refeição sanguínea, ocasionando assim, um maior número de mosquitos capturados no solo em relação à copa apenas nesta coleta.

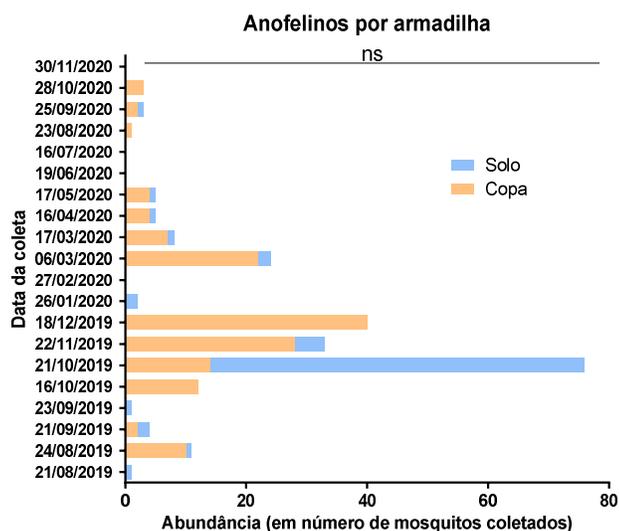
Ainda, nas primeiras coletas realizadas no projeto, durante o período de adequação da metodologia utilizada, ocorreram alguns outros episódios específicos que se tornaram relevantes para os resultados. Na coleta realizada no dia 21/08/2019, o cabo que alimentava a bateria instalada na copa da árvore se desconectou durante a coleta, o que pode explicar a ausência de anofelinos capturados nessa armadilha, visto que alguns dias depois a coleta foi realizada novamente (24/08/2019) e foram capturados 10 anofelinos na copa. Nesse dia (24/08/2019) a mangueira de CO<sub>2</sub> da armadilha do solo não funcionou, o que pode explicar a coleta de apenas um anofelino no solo (tabela 1). Além disso, na coleta realizada no dia 23/09/2019 a lâmpada da armadilha da copa estava mais fraca, o que também pode ter influenciado o resultado. Para determinar a normalidade dos dados foi empregado o teste de Shapiro-Wilk, onde foi obtido o valor de  $P < 0,0001$ , assumindo, portanto, que os dados não possuem distribuição normal (assim, utilizam-se testes não paramétricos) (figura 3).

Tabela 1: Quantidade de anofelinos coletados nas armadilhas do solo e copa por coleta

<b>Data da Coleta</b>	<b>Solo</b>	<b>Copa</b>
<b>21/08/2019</b>	1	0
<b>24/08/2019</b>	1	10
<b>21/09/2019</b>	2	2
<b>23/09/2019</b>	1	0
<b>16/10/2019</b>	0	12
<b>21/10/2019</b>	62	14
<b>22/11/2019</b>	5	28
<b>18/12/2019</b>	0	40
<b>26/01/2020</b>	2	0
<b>27/02/2020</b>	0	0
<b>06/03/2020</b>	2	22

<b>17/03/2020</b>	1	7
<b>16/04/2020</b>	1	4
<b>17/05/2020</b>	1	4
<b>19/06/2020</b>	0	0
<b>16/07/2020</b>	0	0
<b>23/08/2020</b>	0	1
<b>25/09/2020</b>	1	2
<b>28/10/2020</b>	0	3
<b>30/11/2020</b>	0	0
<b>TOTAL</b>	80	149

Figura 3: Número de anofelinos coletados nas armadilhas da copa e solo por coleta. Utilizando o teste de Mann Whitney (não paramétrico; não pareado) para análise estatística. Valor de  $P = 0,0982$ .



Além desses episódios, em algumas coletas pontuais não foi capturado nenhum anofelino (27/02/2020, 19/06/2020, 16/07/2020, 30/11/2020), mesmo com as armadilhas funcionando de maneira correta. É possível que isso tenha ocorrido devido a fatores abióticos não favoráveis para o desenvolvimento do mosquito nos dias que precederam as coletas. Por exemplo, é necessário para o desenvolvimento desse anofelino um ambiente úmido, que favorece o acúmulo de água nas axilas das bromélias (CONSOLI; LOURENÇO-DE-

OLIVEIRA, 1994). Foi observado nos meses de fevereiro, junho, julho e novembro de 2020 (quando não foi capturado nenhum anofelino), uma tendência à umidade mais baixa nos dias que antecederam a coleta. Por outro lado, no mês de outubro de 2019, mês com os maiores valores de captura, os dias que antecederam as coletas apresentaram uma tendência de maior umidade (figura 4). A figura 4 ilustra a média diária de umidade nos 15 dias anteriores a coleta, onde se obteve significância estatística ao comparar meses em que nenhum anofelino foi coletado com meses em que se obteve um grande número de indivíduos capturados (comparamos, por exemplo, fevereiro/20 e novembro/20, com outubro/19). Portanto, seguidos dias com umidade mais baixa e pouca precipitação são desfavoráveis para o desenvolvimento larval. Assim sendo, acredita-se, que os dias que antecedem a coleta de adultos devem ser considerados, por serem determinantes para o desenvolvimento e ciclo de vida desses insetos.

Apesar disso, a umidade não pôde ser correlacionada ao número de mosquitos coletados no solo ou na copa, utilizando-se a correlação de Spearman, conforme exposto na figura 5.

Figura 4: Médias de umidade nos 15 dias que antecedem as coletas de outubro de 2019 e fevereiro, junho, julho e novembro de 2020. Realizado ANOVA e obtido valor de  $P = 0,0001$  com significância estatística para os meses de outubro e fevereiro, fevereiro e junho, outubro e novembro. As linhas horizontais referem-se à mediana de umidade dos 15 dias analisados.

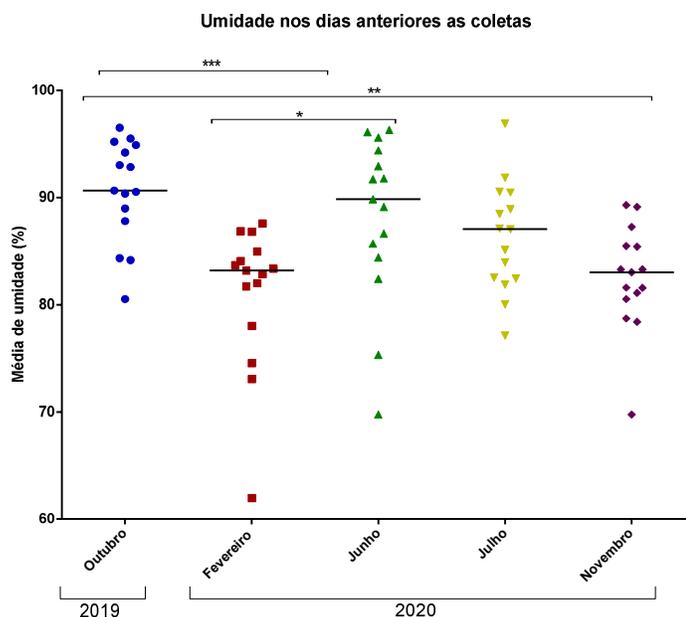
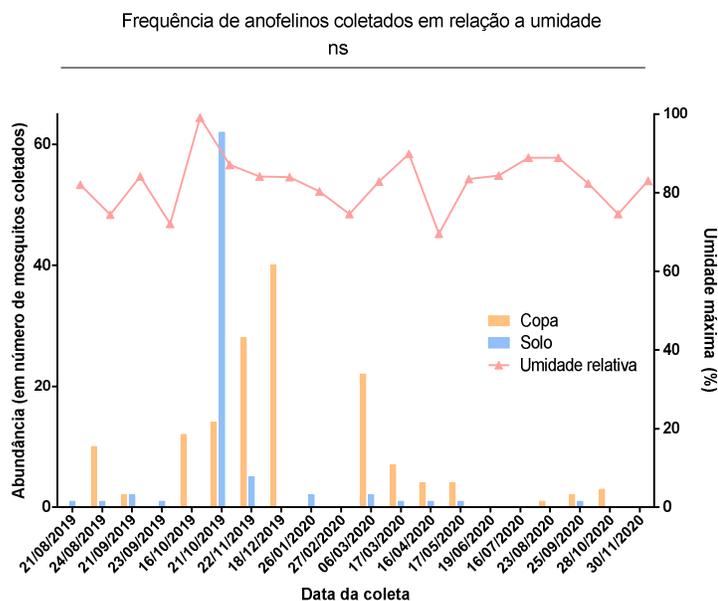


Figura 5: Frequência de anofelinos em relação à média de umidade diária observada em cada coleta. Foi utilizada a análise de correlação de Spearman. Valor de  $P = 0,5994$  (para solo). Valor de  $P = 0,3566$  (para copa).



Além disso, ainda quanto às variáveis climáticas, Marrelli *et al.* (2007), sugerem que as populações de *Kerteszia* apresentam padrões sazonais, sendo influenciadas pelo clima, especialmente precipitação e temperatura, ocorrendo nas estações mais quentes e chuvosas um maior número de mosquitos. Todavia, é possível coletar *An. cruzii* durante o ano inteiro, mesmo com baixa densidade populacional. No presente estudo, foram capturados anofelinos em todas as estações do ano, com maior abundância na primavera e no verão (valor de  $P = 0,0139$ ) – como exposto na figura 6. O mesmo resultado foi observado por Bona e Navarro-Silva (2006) no litoral do Paraná, onde as estações com maiores temperaturas e frequência de chuvas são consideradas fatores positivos para o desenvolvimento desta espécie.

Figura 6: Anofelinos capturados, por estação do ano, no período de agosto de 2019 a novembro de 2020. Realizada Análise de Variância (ANOVA) para comparar a abundância da população nas estações do ano. Valor de  $P = 0,0139$  (significância  $P < 0,05$ ).



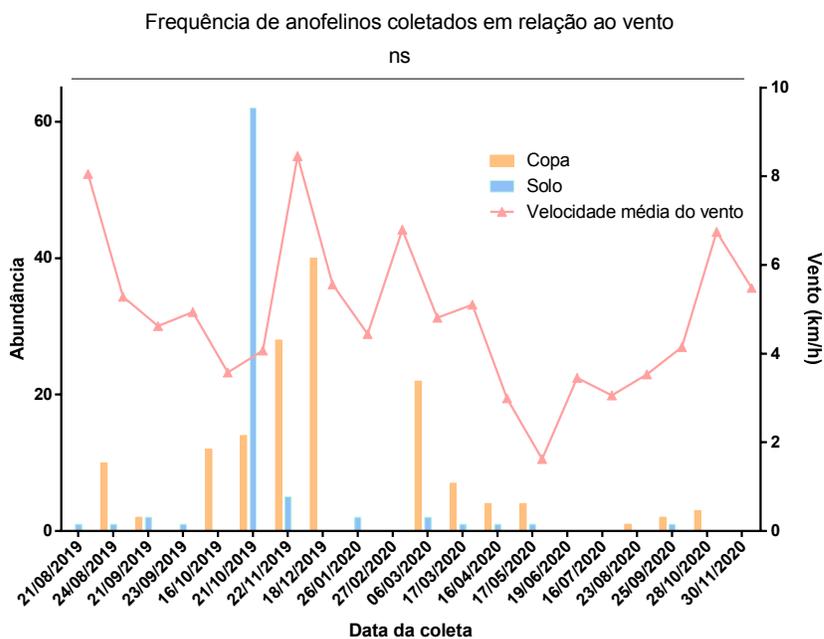
Neste estudo, não foi possível obter uma correlação com significância estatística entre a precipitação e a abundância de anofelinos coletados. O valor de P obtido na correlação de Spearman para precipitação e solo foi  $P = 0,0743$ , enquanto para precipitação e copa foi  $P = 0,4443$  (figura 7). Todavia, Forattini (2002) relata que as estações mais chuvosas proporcionam um acúmulo de água nas axilas das bromélias, fornecendo um criadouro adequado para as formas imaturas desse subgênero. Mesmo para espécies de *Anopheles* que ocorrem na região Amazônica, como *An. (Nyssorhynchus) darlingi* no qual as formas imaturas são encontradas em locais distintos dos *Kerteszia* (em represas, lagoas, em depressões de terrenos e em valas), a precipitação ainda apresenta relevância em relação à abundância de insetos (RACHOU, 1958). Ferreira *et al.* (2013) relacionam uma correlação positiva entre as chuvas e a abundância de *An. darlingi*, sendo favorável o desenvolvimento da espécie com chuvas frequentes, porém fracas ou moderadas.

Figura 7: Frequência de *An. cruzii* em relação a precipitação média diária observada em cada coleta. Foi utilizada a análise de correlação de Spearman. Valor de  $P = 0,0743$  (para solo). Valor de  $P = 0,4443$  (para copa).



Em contraste com o que é observado na literatura, as análises de correlação realizadas para as variáveis de vento médio diário não obtiveram resultados significativos (figura 9). Nas análises feitas utilizando o valor médio de vento foi  $P = 0,7205$  para copa e  $P = 0,8363$  para o solo. Isso pode ser devido ao fato de às coletas terem sido realizadas em uma parte protegida dos ventos por vegetação dentro da floresta, uma vez que, conforme explicitado por Service (1980) espécies que se reproduzem em matas e florestas, são consideravelmente protegidas do vento pelo abrigo de vegetação densa, portanto menos afetadas pelo vento do que aquelas que vivem em áreas mais expostas. Contudo, em geral, as velocidades de vento superiores a 3 km/h reduzem consideravelmente a capacidade de voo de um mosquito em busca de uma fonte de refeição sanguínea (SERVICE, 1980).

Figura 9: Frequência de *An. cruzii* em relação ao vento médio diário observada em cada coleta. Teste de correlação de Spearman foi realizado, porém não se obteve significância em nenhuma das análises ( $P = 0,7205$  para copa e  $P = 0,8363$  para o solo).



Além dos resultados gráficos aqui expostos, foram realizados testes de correlação de Spearman para todas as variáveis mencionadas, juntando o total de mosquitos coletados em

cada coleta, sem que houvesse separação das armadilhas em copa ou solo. Igualmente à maioria dos resultados apresentados, essas análises também não obtiveram significância estatística.

#### 4.2 ANÁLISE DE INFECÇÃO

Um total de 213 anofelinos foram testados para presença de *Plasmodium* sp., d 22 apresentaram resultados positivos para a primeira reação de PCR, na qual foram utilizados os *primers* P1UP e P2. Os demais anofelinos não foram submetidos a PCR devido a limitações encontradas em decorrência da pandemia de Covid-19.

Dos 22 anofelinos encontrados infectados na primeira reação de PCR, alguns foram positivos apenas para região do tórax e cabeça, outros apenas para região do abdômen ou então para ambas as partes do mosquito. Os resultados de infecção podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Mosquitos com infecção positiva detectada por reação de PCR. A identificação das amostras se refere à copa (C-) ou solo (S-). Em algumas amostras foi observada infecção em tórax e abdômen, e em outros apenas uma porção do mosquito foi positiva para infecção.

Identificação	Data de coleta	Porção com infecção	
		Tórax e cabeça	Abdômen
C-30	21/10/19	Positivo	Positivo
C-32	21/10/19	Positivo	Positivo
C-42	22/11/19	-	Positivo
C-57	22/11/19	Positivo	Positivo
C-60	22/11/19	Positivo	Positivo
C-63	22/11/19	-	Positivo
C-87	18/12/2019	Positivo	-
C-90	18/12/2019	-	Positivo

C-95	18/12/2019	-	Positivo
C-98	18/12/2019	Positivo	Positivo
C-101	18/12/2019	-	Positivo
C-107	06/03/2020	-	Positivo
C-109	06/03/2020	Positivo	-
S-41	21/10/19	Positivo	-
S-42	21/10/19	Positivo	-
S-43	21/10/19	Positivo	-
S-44	21/10/19	Positivo	Positivo
S-63	21/10/19	-	Positivo
S-64	21/10/19	Positivo	Positivo
S-65	21/10/19	Positivo	Positivo
S-66	21/10/19	Positivo	Positivo
S-67	21/10/19	-	Positivo

Durante as análises moleculares, foi observado que as bandas amplificadas para a reação de gênero eram notadamente menores que o controle positivo de *P. vivax* utilizado (figura 10). Além disso, nas segundas reações de PCR (que tinham como objetivo identificar a espécie de parasita infectante) não foram obtidos resultados positivos, e devido a isso, algumas amostras da reação gênero-específica foram submetidas ao sequenciamento para se obter mais informações sobre a espécie infectante.

A porção do tórax das amostras C-30, C-32, C-57, C-60, C-98, S-44 e S-66 apresentaram bandas mais fortes na detecção molecular (figura 10) e foram submetidas ao sequenciamento, após serem purificadas e quantificadas.

Figura 10: Gel de agarose (2%) das amostras de PCR purificadas que foram encaminhadas para sequenciamento. É perceptível que as bandas amplificadas neste estudo são significativamente mais baixas que o controle positivo utilizado (*P. vivax*). CP: controle positivo; CN: controle negativo.



As amostras sequenciadas foram analisadas, utilizando-se o consenso das sequências *forward* e *reverse*. Após fazer o consenso, as sequências foram comparadas por meio de BLASTn, constatando-se que surpreendentemente o microrganismo encontrado nos anofelinos trata-se de um protozoário ciliado pertencente ao gênero *Tetrahymena* e que todas as sequências obtidas neste estudo eram iguais (apêndice A). Como as bandas obtidas eram notadamente mais baixas que o controle positivo, alinhamos as sequências deste estudo com *P. vivax*, *P. falciparum* e *Tetrahymena* (apêndice B) e foi observado que as sequências são muito semelhantes, salvo um *indel* presente nos plasmódios. Ainda, pode-se observar no apêndice B grande similaridade entre o fragmento do 18S de *Tetrahymena* e de *P. falciparum*. É provável que, por esse motivo, as amostras tenham amplificado mesmo utilizando *primers* gênero-específicos para *Plasmodium*.

Além disso, *Tetrahymena* e *Plasmodium* fazem parte do grupo dos alveolados, um grupo filogenético composto por ciliados, dinoflagelados e apicomplexa e, em algumas situações, *Tetrahymena thermophila* pode servir como um modelo útil para trabalhos relacionados à genética com o grupo dos apicomplexa (EISEN *et al.*, 2006). Ainda, foi relatado que 419 genes ortólogos são compartilhados entre *Tetrahymena* e *Plasmodium falciparum* (COYNE *et al.*, 2007).

### 4.3 INFECÇÃO POR *TETRAHYMENA*

Surpreendentemente e contrapondo o esperado, foi observado que o que estava sendo amplificado nas reações de PCR não era *Plasmodium* spp., mas sim outro protozoário: *Tetrahymena*. Esta é a primeira observação deste protozoário em *An. cruzii*, portanto, representa um novo achado para esta espécie.

Ao submeter às sequências obtidas neste estudo para análise no BLASTn, percebemos que as sequências obtidas apresentavam 99% de semelhança com uma subunidade pequena do rDNA de *Tetrahymena* (id. Sequência GenBank: MT012299.1) Embora no presente estudo tenha sido identificada o gênero *Tetrahymena* infectando *An. cruzii*, a obtenção de mais informações sobre morfologia e ecologia dessa espécie de protozoário, seriam úteis para refinar a identificação.

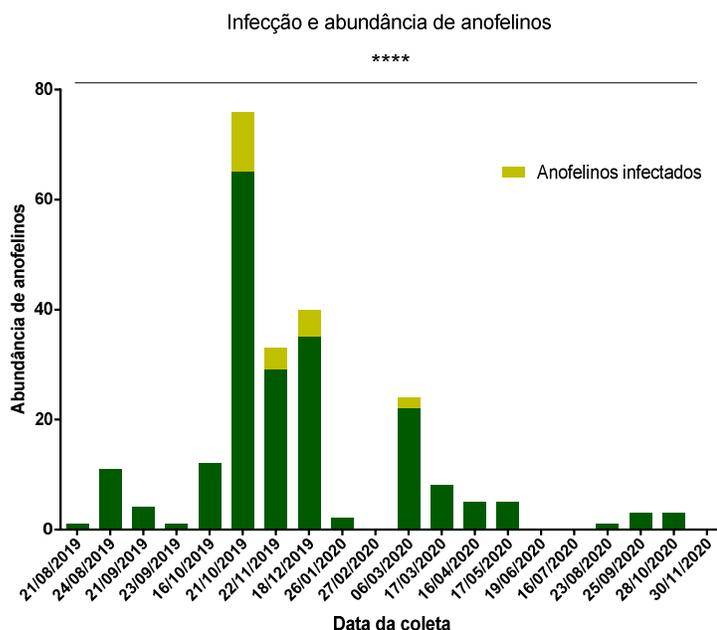
Análises utilizando o fragmento do 18S rDNA sugerem a divisão do gênero *Tetrahymena* em duas linhagens: o grupo *boreal* e o grupo *australis* (JEROME *et al.*, 1996; STRÜDER-KYPKE *et al.*, 2001). Ainda, mais recentemente, análises utilizando o gene mitocondrial da subunidade 1 da citocromo oxidase (COI) agruparam vários táxons fora dessa dicotomia (KHER *et al.*, 2011; QUINTELA-ALONSO *et al.*, 2013; LYNN *et al.*, 2018).

Sabe-se que esses ciliados podem ocupar uma enorme diversidade de habitats, incluindo outros organismos como hospedeiros, como já foi relatado anteriormente por Corliss (1961). Assim, os invertebrados podem representar um habitat para espécies de *Tetrahymena*, porém os estudos acerca dessas infecções ainda são escassos (RATAJ; VĎAČNÝ, 2020). Corliss (1961) relata que apesar de existirem muitas espécies de *Tetrahymena* de vida livre ocupando habitats de água doce, algumas espécies desse gênero podem utilizar mosquitos como hospedeiros. Acreditamos que isso possa ter ocorrido no presente estudo com *An. cruzii*. Possivelmente a infecção por *Tetrahymena* ocorreu durante a fase larval na água das axilas das bromélias, onde coabitam os estágios imaturos desses anofelinos e estes protozoários. Como avaliamos apenas mosquitos adultos, é possível que essa infecção tenha persistido de larva até a fase adulta. Simão *et al.* (2007) relatam a presença de *Tetrahymena* em bromélias de Mata Atlântica, das espécies *Aechmea gamosepala* e *Vriesea platynema*. O gênero *Tetrahymena* foi um dos eucariotos encontrados mais frequentemente nestas plantas no estudo, e a presença do protozoário também foi confirmada

por análises do 18s rDNA. Esse achado corrobora a hipótese da infecção por *Tetrahymena* ocorrer na fase larval dos anofelinos uma vez que, existe a possibilidade de coexistência dos dois organismos no mesmo habitat.

No presente estudo, foi observada taxa de infecção de 10,33% do protozoário ciliado *Tetrahymena* em *An. cruzii*. Essa taxa encontrada em nossas amostras não condiz com o que é conhecido na literatura para infecção plasmodial, como relatado por Deane *et al.* (1966), que encontrou uma taxa de infecção por *P. simium* de 2,4% em 502 espécimes de *An. cruzii* dissecados. Ainda, Branquinho *et al.* (1997) relatam uma taxa de infecção de 0,179% e 0,086% por *P. vivax* em *An. cruzii* nos municípios de São Vicente e Juquitiba, respectivamente. Isso, portanto, é outro ponto que reforça o surpreendente achado de infecção por *Tetrahymena* nessa espécie de anofelino. Além disso, todos os anofelinos em que foi relatada infecção são oriundos das quatro coletas com maior abundância de anofelinos capturados (figura 11). Portanto, pode-se dizer que quanto maior o número de mosquitos coletados maiores as chances de se encontrar infecção por *Tetrahymena*. Ainda, a taxa de infecção observada é similar ao encontrado em estudo anterior que demonstrou que 8,5% de larvas de *Culicidae* estavam infectadas com *Tetrahymena* em criadouros de Roraima (Barros *et al.*, 2006). Todavia, trabalhos demonstram que *Tetrahymena* spp. podem apresentar menor abundância em populações adultas. Em *Ae. sierrensis* por exemplo, foi observada uma taxa de infecção de apenas 0,4% (WASHBURN *et al.*, 1989).

Figura 11: Distribuição cronológica dos anofelinos infectados por *Tetrahymena*. Foi realizado *Wilcoxon test* (pareado; não paramétrico) e obtido valor de  $P < 0,0001$ . Para determinar a normalidade dos dados foi empregado o teste de Shapiro-Wilk, onde foi obtido o valor de  $P < 0,0001$ , assumindo, portanto, que os dados não possuem distribuição normal (assim, utilizam-se testes não paramétricos).



Protozoários ciliados do gênero *Tetrahymena* já foram relatados em outras oportunidades como endoparasitas ou endossimbiontes em uma grande variedade de hospedeiros sendo que formas aquáticas, como larvas, geralmente apresentam maior suscetibilidade a infecções (CORLISS, 1960). Todavia, neste trabalho não foram avaliadas formas imaturas, então ainda permanece a questão de quanto pode variar a taxa de infecção por *Tetrahymena* entre indivíduos adultos e larvas de *An. cruzii*. Já é conhecido na literatura infecções por *Tetrahymena* em outras espécies de anofelinos, como observado por Barros *et al.* (2006) na hemolinfa de fêmeas adultas de *An. darlingi*. Segundo os autores, o número de protozoários nos mosquitos variou consideravelmente e, além disso, foram encontradas infecções em alta intensidade ocorrendo na fase larval. Foram observadas flutuações sazonais no número de larvas e anofelinos adultos infectados, com os maiores índices de infecção ocorrendo durante a estação seca. Embora não tenha sido atestado o efeito negativo referente à infecção, os autores acreditam que a associação de *Tetrahymena* em *An. darlingi* pode ser patogênica para o mosquito quando observada em altos níveis.

Estudos realizados com culicídeos demonstraram que *Culex tarsalis* é altamente suscetível ao parasitismo de *Tetrahymena pyriformis*, que aumentou a mortalidade dos estágios imaturos em criadouros larvais (GRASSMICK; ROWLEY, 1973). Além disso, *Tetrahymena* spp. foi encontrado infectando ovários de fêmeas de *Aedes sierrensis*, em um

estudo onde o protozoário *Tetrahymena clarki* (sin. *Lambornella clarki*) foi o parasita mais comum nessa espécie de culicídeo, e os autores sugerem que essa infecção podem ter causado esterilidade das fêmeas quando persistiu até a fase adulta (WASHBURN *et al.*, 1989; BARTHOLOMAY; MICHEL, 2018), porém consideramos que os testes realizados para verificar esterilidade são insuficientes, necessitando mais estudos sobre essa questão.

A espécie de ciliado *Tetrahymena chironomi* já foi apontada como um parasita da cavidade corporal de *Chironomus plumosus* (mosquitos da família *Chironomidae*), apesar de não ser muito conhecido o método de entrada do protozoário no corpo do hospedeiro larval. O fato do protozoário se alimentar nos tecidos e fluidos do hospedeiro, aparentemente, causa a morte dos insetos (CORLISS, 1970).

Neste cenário, cabe-se destacar que o uso de microrganismos para o controle de doenças transmitidas por mosquitos tem sido amplamente estudado, pois representa novas estratégias para o controle dessas doenças, incluindo a malária. Sendo assim, uma vez que existe a hipótese de que *Tetrahymena* pode causar morte e esterilidade de mosquitos, não se descarta o potencial promissor deste gênero para o controle e prevenção da malária, porém são necessários mais estudos sobre a influência em populações de *Anopheles* e sobre a interação da espécie com *Plasmodium*.

## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo foram coletados 229 anofelinos, sendo a maioria *An. cruzii*. Observamos maior proporção de mosquitos nas copas das árvores em relação às armadilhas instaladas no solo. Ainda que não obtido significância estatística, este fato está de acordo com o que se é conhecido na literatura para *An. cruzii*. Acredita-se que isso pode estar relacionado com a presença de símios nas partes mais altas da mata.

Surpreendentemente foram encontrados protozoários *Tetrahymena* infectando *An. cruzii*, o que representa uma informação até então desconhecida. São necessários mais estudos acerca da infecção de *Tetrahymena* em *An. cruzii*, incluindo características morfológicas do protozoário com o objetivo de identificar a espécie. Além disso, podem ser incluídas análises com PCR utilizando outros marcadores moleculares, como o COI de *Tetrahymena*.

Para verificar a possibilidade de esses protozoários causarem a mortalidade e esterilidade de mosquitos, tanto formas imaturas quanto adultos, são necessários estudos sobre a interação entre *Tetrahymena* e *Anopheles*.

Ainda, fica em aberto a questão de se a presença de *Tetrahymena* inibiu de alguma forma o desenvolvimento de *Plasmodium*, pois não foi observada nenhuma infecção pela espécie nos anofelinos coletados. Para isso, são necessários mais estudos para verificar um potencial controle de infecção.

## 6 REFERÊNCIAS

Alencar FEC, Malafronte RDS, Cerutti C Jr, Natal Fernandes L, Buery JC, Fux B, Rezende HR, Miranda AE. **Reassessment of asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. in an endemic area with a very low incidence of malaria in extra-Amazonian Brazil.** Malar J. 2017; 9; 16:452.

Alvarenga DA, de Pina-Costa A, Brasil P, de Brito CF, Daniel-Ribeiro CT. **Malaria attack in Southeastern Brazil: a probable locally acquired new infection.** Infect Ecol Epidemiol. 2016; 30: 6:32308.

Barros FSM, Vasconcelos SD, Arruda ME, Confalonieri UEC, Luitgards-Moura JF, Honório NA. **Tetrahymenidae infection in mosquito populations in a malaria-endemic region of the Amazon.** Journal Of Invertebrate Pathology. 2006; 91: 199-201.

Bates, M. **The natural history of mosquitoes,** The Macmillan Company, 1949; 379.

Bona AC, Navarro-Silva MA. **Paridade de *Anopheles cruzii* em densa floresta tropical no sul do Brasil.** Rev Saude Publica. 2006; 40: 1118-23.

Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JM, Tubaki R, et al. **Infecção do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium vivax* variante VK247 nos municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo.** Rev Panam Salud Publica. 1997; 2: 189-93.

Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, da Silva Santelli ACF, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, de Fátima Ferreira-da-Cruz M, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT. **Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.** Lancet Glob Health. 2017; 5: e1038-e1046.

Buery JC, Rezende HR, Natal L, Silva LSD, Menezes RMT, Fux B, Malafronte RDS, Falqueto A, Cerutti Junior C. **Ecological characterisation and infection of Anophelines**

**(Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed?** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 113: 111-118.

Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto JÁ. **A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil.** Pathog Glob Health. 2019; 113: 1-13.

Collucci E, Sallum MAM. **Phylogenetic analysis of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters.** Insect Syst. 2003; 34: 361-372.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994.

Corliss JO. **Natural infection of tropical mosquitoes by ciliated protozoa of the genus *Tetrahymena*.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1961; 55: 149-152.

Corliss JO. ***Tetrahymena chironomi* sp. nov., a ciliate from midge larvae, and the current status of facultative parasitism in the genus *Tetrahymena*.** Parasitology. 1960; 50: 111-153.

Corliss JO. **The comparative systematics of species comprising the hymenostome ciliate genus *Tetrahymena*.** J Protozool. 1970; 17: 198–209.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** Clin Infect Dis. 2008; 46: 165-71.

Coyne R, Orias E, Elde N, Malik H, Brunk C, Buhse H, Huvos P. ***Tetrahymena* Comparative Genomics Sequencing Project.** NHGRI. 2007.

Deane LM, Deane MP, Neto JF. **Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil.** Bull World Health Organ. 1966.

Deane LM, Ferreira Neto JA, Deane SP, Silveira IP. ***Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1970; 64: 647.

Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto JA, Barbosa de Almeida F. **On the transmission of simian malaria in Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971; 13: 311–319

Deane LM. **Malaria vectors in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81: 5-14.

Deane LM. **Malaria studies and control in Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 1988; 38: 223–230.

DIVE 2014. **Diretoria de Vigilância Epidemiológica.** Secretaria de Estado de Saúde de Santa Catarina. 2014. Acesso em 10 de agosto de 2020. [<http://www.dive.sc.gov.br/>]

Doerder FP, Brunk C. **Natural Populations and Inbred Strains of *Tetrahymena thermophila*.** Elsevier. 2012; 277-300.

Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK Jr, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E. **Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote.** PLoS Biol. 2006; 4: 286-309.

EPAGRI. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Banco de dados de variáveis ambientais de Santa Catarina.** Florianópolis: Epagri, 2020. 20p. (Epagri, Documentos, 310) - ISSN 2674-9521 (On-line)

Ferreira RMA, Cunha AC, Souto RNP. **Distribuição Mensal e Atividade Horária de *Anopheles (Diptera: culicidae)* em uma área rural da Amazônia oriental.** Biota Amazônia. 2013; 3: 64-75.

Forattini OP. **Culicidologia Médica, volume 2: identificação, biologia, epidemiologia.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

Forattini OP. **Exophilic behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil.** Rev Saude Publica. 1987; 21: 291-304.

**G1: Camila Pitanga Revela Que Ela e A Filha Foram Diagnosticadas Com Malária: 'Dias de Muito Sufoco'.** São Paulo, 11 ago. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/pop-arte/noticia/2020/08/11/camila-pitanga-revela-que-ela-e-a-filha-foram-diagnosticadas-com-malaria-dias-de-muito-sufoco.ghtml>. Acesso em: 15 ago. 2020.

Geo. **Geoprocessamento: Prefeitura Municipal de Florianópolis.** Acesso em: 18 ago. 2020. [<http://geo.pmf.sc.gov.br>]

Grassmick RA, Rowley WA. **Larval mortality of *Culex tarsalis* and *Aedes aegypti* when reared with different concentrations of *Tetrahymena pyriformis*.** Journal of Invertebrate Pathology. 1970; 22: 86-93.

Harbach RE. **The Phylogeny and Classification of *Anopheles*.** In: *Anopheles* mosquitoes: new insights into malaria vectors. Intechopen. 2013.

Jerome CA, Lynn DH, Simon EM. **Description of *Tetrahymena empidokyrea* n.sp., a new species in the *Tetrahymena pyriformis* sibling species complex (Ciliophora, Oligohymenophorea), and an assessment of its phylogenetic position using small-subunit rRNA sequences.** Canadian Journal Of Zoology. 1996; 74: 1898-1906.

Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. **PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria.** J Clin Microbiol. 2006; 44:1087-9.

Jowett T. **Preparation of nucleic acids.** In *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, 1998. p. 275–286.

Kakitani I, Ueno HM, Forattini OP. **Paridade e influência do vento sobre a frequência de *Anopheles marajoara*.** Rev Saude Publica. 2003; 37: 280-248

Kher CP, Doerder FP, Cooper J, Ikonomi P, Achilles-Day U, Küpper FC, Lynn DH. **Barcoding *Tetrahymena*: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode.** Protist. 2011; 162: 2-13.

Kimura M, Kaneko M, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. **Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene.** Parasitol International. 1997; 46: 91-95.

Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte Rdos S, Alves IC, Lima GF, Guimarães Lde O, Zampaulo Rde A, Wunderlich G. ***Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomestic area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts.** Rev Inst Med Trop. 2014;56:403-409.

Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. **DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae).** Journal of Medical Entomology. 2007;44:1-7.

Lynn DH, Doerder FP, Gillis PL, Prosser RS. ***Tetrahymena glochidiophila* n. sp., a new species of *Tetrahymena* (*Ciliophora*) that causes mortality to glochidia larvae of freshwater mussels (*Bivalvia*).** Dis Aquat Organ. 2018; 127: 125-13.

Madanela, MM. **Malária em Santa Catarina: uma análise dos casos notificados entre 2009 e 2018.** TCC (Graduação) - Curso de Biologia, CCB, UFSC, Florianópolis, 2019: 43.

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

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. **Malaria in Brazil: an overview.** Malar J. 2010; 30: 9-115.

PAHO 2018. **Pan American Health Organization** (PAHO Home Page). Casos de malária aumentam na região das Américas. 2018. Acesso em 05 de agosto de 2020.

[[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812)]

Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109: 618-33.

Pina-Costa A, Bressan Cda S, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva Sd, Souza PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz Mde F, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P. **Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro.** Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43: 571-4.

Portes Mda G, Rossi JC, Nascimento JC, Zeccer S, Silva LA. **Anophelines of Santa Catarina (Diptera: Culicidae), Brazil.** Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43:156-60.

Quintela-Alonso P, Nitsche F, Wylezich C, Arndt H, Foissner W. **A new *tetrahymena* (ciliophora, oligohymenophorea) from groundwater of cape town, South Africa.** J Eukaryot Microbiol. 2013; 60: 235-246

Rachou RG. **Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras de malária.** Rev Bras Malariol Doenças Trop 1958, 10:145-181.

Rataj M, Vďačný P. **Multi-gene phylogeny of *Tetrahymena* refreshed with three new histophagous species invading freshwater planarians.** Parasitology Research. 2020; 119: 1523-1545.

RBM. **Partnership to End Malaria.** Malaria world map. Acesso em 10 de agosto de 2020 [<https://endmalaria.org/>].

Santos-Neto LG, Lozovei AL. **Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil.** Revista Brasileira de Entomologia. 2008; 52: 105-111.

Service MW. **Effects of wind on the behaviour and distribution of mosquitoes and blackflies.** Int J Biometeorol 1980; 24:347-353.

Simão TLL, Borges AG, Gano KA, Davis-Richardson AG, Brown CT, Fagen JR, Triplett EW, Dias R, Mondin CA, da Silva RM, Eizirik E, Utz LRP. **Characterization of ciliate diversity in bromeliad tank waters from the Brazilian Atlantic Forest.** Eur J Protistol. 2017; 61: 359-365.

Simon EM, Nanney DL, Doerder FP. **The “*Tetrahymena pyriformis*” complex of cryptic species.** Biodivers Conserv. 2008; 17: 365–380.

SINAN 2011. **Sistema de Informação e Agravos de Notificação.** Acesso em 10 de agosto de 2020. [<http://portalsinan.saude.gov.br/>]

Strüder-Kypke MC, Wright ADG, Jerome CA, Lynn DH. **Parallel evolution of histophagy in ciliates of the genus *Tetrahymena*.** Evolutionary Biology. 2001; 1: 5.

Ueno HM, Forattini OP, Kakitani I. **Vertical and seasonal distribution of *Anopheles (Kerteszia)* in Ilha Comprida, Southeastern Brazil.** Rev Saude Publica. 2007; 41: 269-75.

Washburn JO, Anderson JR, Mercer DR. **Emergence Characteristics of *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae) from California Treeholes with Particular Reference to Parasite Loads.** J. Med. Entomol. 1989; 26: 173-182

WHO 2018. **World Health Organization** (WHO Home Page). World Malária Report 2018. Acesso em 05 de agosto de 2020. [<https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>]

WHO 2020. **World Health Organization** (WHO Home Page). World Malária Report 2020. Acesso em 08 de abril de 2021. [<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>]

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F. **Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar.** Trop Med Int Health. 2002; 7: 231-9.



## 7 APÊNDICES

### 7.1 APÊNDICE A – ALINHAMENTO DAS AMOSTRAS

>S44T\_1\_consensu

**TTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATACCG  
ACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>S66T\_2\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>C30T\_3\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTT**

>C32T\_4\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>C57T\_5\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTT**

>C60T\_6\_consensu

**ATCAAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATACCGAC  
TCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGT**

>C98T\_7\_consensu

**ATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATACCGACT  
CGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>Tetrahymena (MT012299.1)

TTA**ATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATACCG  
ACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

*Primer Foward* P1UP: **TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**

*Primer Reverse* P2: **GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT** - (Reverse-complement:  
**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**)

## CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

C60T_6_consensu      -----ATCAAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      55
Tetrahymena          ---TTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      57
S44T_1_consensu      ---TTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      57
C98T_7_consensu      -----ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      54
S66T_2_consensu      CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      60
C30T_3_consensu      CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      60
C32T_4_consensu      CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      60
C57T_5_consensu      CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA      60
                      *****

C60T_6_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      115
Tetrahymena          CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      117
S44T_1_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      117
C98T_7_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      114
S66T_2_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      120
C30T_3_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      120
C32T_4_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      120
C57T_5_consensu      CTATAAACTATACCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGTATGAGA      120
                      *****

C60T_6_consensu      AATCAAAGTCTTTGGGT--      132
Tetrahymena          AATCAAAGTCTTTGGGTTC      136
S44T_1_consensu      AATCAAAGTCTTTGGGTTC      136
C98T_7_consensu      AATCAAAGTCTTTGGGTT-      132
S66T_2_consensu      AATCAAAGTCTTTGGGTT-      138
C30T_3_consensu      AATCAAAGTCTTT-----      133
C32T_4_consensu      AATCAAAGTCTTTGGGTT-      138
C57T_5_consensu      AATCAAAGTCTTT-----      133
                      *****

```

7.2 APÊNDICE B – ALINHAMENTO COM *PLASMODIUM* SPP.

>S44T\_1\_consensu

**TTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCG  
ACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>S66T\_2\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>C30T\_3\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTT**

>C32T\_4\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>C57T\_5\_consensu

**CCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATA  
CCGACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTT**

>C60T\_6\_consensu

**ATCAAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCGAC  
TCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>C98T\_7\_consensu

**ATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCGACT  
CGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>Tetrahymena (MT012299.1)

TTA**ATCAAGAACGAAAGTTAAG**GGATCAAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATAACCG  
ACTCGGGATCGGCTGGAATAAATGTCCAGTCGGCACCGT**ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTT**

>P\_falciparum

