

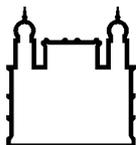
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Diversidade e ecologia de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) e avaliação do risco de reintrodução de malária no Pantanal de Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil

Mariana Marinho e Silva

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIANA MARINHO E SILVA

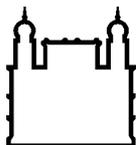
Diversidade e ecologia de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) e avaliação do risco de reintrodução de malária no Pantanal de Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIANA MARINHO E SILVA

DIVERSIDADE E ECOLOGIA DE MOSQUITOS DO GÊNERO *ANOPHELES*
(DIPTERA: CULICIDAE: ANOPHELINAE) E AVALIAÇÃO DO RISCO DE
REINTRODUÇÃO DE MALÁRIA NO PANTANAL DE MIRANDA, MATO GROSSO
DO SUL, BRASIL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Martha Cecilia Suárez Mutis - **Presidente**

Prof. Dr. José Bento Pereira Lima

Prof. Dra. Joseli Oliveira Ferreira

SUPLENTES:

Prof. Dr. Anthony Érico da Gama Guimarães

Prof. Dra. Luísa Damazio Rona Pitaluga

Rio de Janeiro, de de 2012

*À minha mãe, meu maior exemplo,
por todo o seu amor, carinho e dedicação
durante toda a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a maior de todas as forças.

Aos meus pais, Ana e Beto, e à minha irmã Juliana, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação e pelo orgulho que sentem de mim.

Aos meus amigos, Bárbara Moraes, Barbara Proença, Bruno Gorini, Marcelle França, Marina Fernandes e Ricardo Menezes, pelas boas e divertidas conversas, pelo carinho, pela compreensão quando estive ausente e por todos os bons momentos juntos.

Ao Dr. Ricardo Lourenço, pela orientação acadêmica e pelos ensinamentos sobre esse mundo vasto que é a entomologia. Admiro e respeito sua experiência e sua incessante busca pela excelência.

À Dra. Teresa Fernandes, pelos ensinamentos, pelo grande entusiasmo e colaboração com o trabalho, e pela disposição em ajudar sempre.

À Dra. Ana Gaspar e à Comissão de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, pela organização e agilidade em resolver questões e problemas levantados.

À Dra. Maria Anice Sallum e à Tatiane Porangaba, pela grande colaboração com os experimentos de biologia molecular realizados no Laboratório de Sistemática Molecular, Faculdade de Saúde Pública-USP. À Dra. Maria Anice, pela atenção, pelo intercâmbio de experiências e pelo reconhecimento. À Tatiane, pela atenção e pela grande eficiência na bancada.

À Monique Motta, pela amizade, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, pela parceria, pela sinceridade, pelo respeito, por caminhar junto e ao meu lado, pelo reconhecimento e por participar das coletas. Admiro o seu equilíbrio, sua sensibilidade e sua capacidade de enxergar mais além.

À Márcia Gonçalves, pela companhia no turno da noite, pela ajuda, pelo respeito, pela confiança e pelos conselhos.

À Nildimar Honório, sou grata pela força e pelo reconhecimento, e pelas palavras ditas nos momentos certos. Admiro o amor e a competência com que desenvolve a sua pesquisa e o modo como leva esse conhecimento para a comunidade não científica.

À Keli Antunes e à Anielly Alves, pela amizade, pelo carinho, pela companhia e pelas boas conversas.

Ao Maycon Neves, pelo trabalho com as isoenzimas, pela assistência e ajuda prestadas desde os meus primeiros dias no laboratório.

À Andiarra Ramos, pelo trabalho com as isoenzimas, pela companhia no horário pós-expediente, pelas conversas e pelas incontáveis caronas de volta para casa já tarde da noite.

Ao Marcelo Quintela, pelo excelente trabalho de campo, por ser sempre tão gentil, atencioso e prestativo, e por ter estado comigo em todas as coletas.

Ao Dr. José Bento Pereira Lima, por ceder gentilmente sua armadilha para as capturas de anofelinos.

Ao Dr. Jerônimo Alencar, por emprestar gentilmente a armadilha Shannon para as coletas.

Ao Jordi Sanchez, ao Mauro Menezes e ao Glauber Rocha, por participarem das coletas e pela importante contribuição ao meu trabalho.

À Náira Diogo, por me ajudar com a criação dos anofelinos, pelo carinho, pela parceria e pelos bons momentos em que estivemos e trabalhamos juntas no laboratório.

À Cristiane Maria, à Maria Ignez e à Lívia de Melo, por todo o auxílio prestado no laboratório e por estarem sempre prontas a me ajudar.

À Maria Goreti Rosa-Freitas, pela atenção, pela ajuda e por ter tirado prontamente dúvidas durante o meu processo de escrita.

Ao Márcio Mocellin, pelas opiniões sobre os gráficos de resultados.

À Lilha Barbosa, à Miriam Salcedo, ao Francisco Lourenço, à Dinair Couto, ao Daniel Cardoso e ao André Barbosa, por compartilharem experiências e pelos momentos alegres dentro e fora do laboratório.

Ao Gabriel Sylvestre, ao Rafael Freitas e à Mariana David, pelos bons momentos de convívio no laboratório.

Ao Reginaldo Rego, ao Marcelo Celestino, ao Renato Carvalho e ao Roberto Perez, pela disposição em ajudar e pelos momentos engraçados.

À Ester Silva, à Carla Saldanha e ao Rogerio Araujo, pelo auxílio técnico-administrativo indispensável e também pelos momentos de descontração.

À Sra. Elange Ribeiro, à Dra. Ivani Ferrari e ao Sr. Luis Carlos Cristaldo, da Secretaria de Saúde e Saneamento de Miranda, pelo apoio logístico aos trabalhos de campo e pela imprescindível colaboração com o nosso estudo.

Ao Antônio Amancio da Silva, ao Marcílio Araújo e ao Carlos Oriozola, da Secretaria de Saúde e Saneamento de Miranda, pela presteza e por todo o auxílio prestado durante o nosso trabalho no campo.

Ao Sr. Wilson Francisco e ao Sr. Sisínio, da Fundação Nacional de Saúde de Mato Grosso do Sul, pelo apoio nos trabalhos de campo.

Ao Sr. Valmir e ao Sr. Antonio, da Fazenda Salobra, por nos ceder gentilmente o cavalo para as capturas de anofelinos.

À Dona Marlene Oriozola e à sua família, por nos receber tão bem e nos permitir fazer as coletas dos anofelinos em sua residência.

Ao Sr. Paulo Mira Batista, da Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso do Sul, por nos fornecer as informações epidemiológicas sobre os casos de malária.

Ao Sr. Carlos, da Associação Rural do Vale do Rio Miranda, por nos fornecer os dados das medições da altura do Rio Miranda.

À Sra. Andreлина dos Santos, da Agência Nacional de Águas, por nos fornecer com rapidez e eficiência os dados pluviométricos, fluviométricos e climatológicos de Miranda.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os professores e mestres que tive durante toda a minha vida, desde o ensino pré-escolar até a pós-graduação. Todos contribuíram, de algum modo, com a minha formação como pessoa e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 . A Malária.....	2
1.2 . Fatores que determinam a transmissão da malária.....	5
1.3 . Classificação epidemiológica da malária.....	7
1.4 . A malária no Brasil.....	12
1.5 . Breve histórico da malária no Mato Grosso do Sul.....	16
1.6 . Anofelinos vetores.....	22
1.7 . Distribuição espacial, comportamento hematofágico, dinâmica temporal e alguns aspectos da morfologia das principais espécies do Subgênero <i>Nyssorhynchus</i>	24
1.8 . Fauna anofélica conhecida no Mato Grosso do Sul.....	34
1.9 . Justificativa.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Características do local do estudo.....	44
3.2. Coletas de mosquitos anofelinos.....	49
3.3. Dissecção dos ovários para determinação de fêmeas nulíparas e paridas....	53
3.4. Criação dos mosquitos para obtenção de proles individuais.....	53
3.5. Diagnóstico morfológico dos espécimes.....	55
3.6. Diagnóstico isoenzimático das espécies do Complexo <i>Triannulatus</i>	56
3.7. Diagnóstico molecular de espécies dos Complexos <i>Oswaldoi</i> e <i>Albitarsis</i>	57
3.7.1. Extração do DNA total.....	58

3.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	59
3.7.3. Eletroforese em gel de agarose 1%.....	60
3.7.4. Purificação dos produtos da PCR por polietileno glicol 20%.....	60
3.7.5. Eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	61
3.7.6. Reação de sequenciamento.....	61
3.7.7. Purificação dos produtos do sequenciamento por cromatografia de gel filtração.....	62
3.7.8. Análise das sequências.....	62
3.8. Dados climatológicos e epidemiológicos.....	63
3.9. Análise dos dados.....	63
4. RESULTADOS.....	64
4.1. Identificação morfológica e molecular das espécies do gênero <i>Anopheles</i>	65
4.2. Variação da frequência dos anofelinos.....	68
4.3. Variação horária da frequência dos anofelinos.....	76
4.4. Composição etária.....	86
4.5. Distribuição dos anofelinos no intra, peri e extradomicílio.....	88
4.6. Comparação entre capturas de anofelinos feitas diretamente em atrativo humano e em atrativo humano protegido, e sua frequência segundo as iscas.....	93
4.7. Investigações epidemiológicas sobre malária no Mato Grosso do Sul.....	95
5. DISCUSSÃO.....	102
6. CONCLUSÕES.....	126
7. PERSPECTIVAS.....	129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
9. APÊNDICE.....	151

Autorização para atividades com finalidade científica

Ficha de campo

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	3
Figura 1.2. Incidência Parasitária Anual no Brasil nos anos de 1996 e 2010.....	11
Figura 1.3. Registro anual de casos de malária causados por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> no Brasil durante o período de 1960 a 2009.....	14
Figura 1.4. Mapas antigo e atual mostrando o trajeto da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, que liga Bauru (SP) a Corumbá (MS).....	18
Figura 1.5. Casos notificados de malária na Bacia do Alto Paraguai (BAP) entre 1990 e 1996, e casos no Mato Grosso do Sul (MS) de 1990 a 2006.....	21
Figura 1.6. Contribuição percentual dos diferentes tipos de malária ocorridos anualmente na Bacia do Alto Paraguai, de 1990 a 1996.....	21
Figura 1.7. Mapa de distribuição preditiva de <i>An. darlingi</i>	25
Figura 1.8. Mapa de distribuição preditiva de <i>An. albitarsis s.l.</i>	29
Figura 1.9. Mapa de distribuição do <i>An. triannulatus s.l.</i>	32
Figura 1.10. Municípios do Mato Grosso do Sul que conhecem parte de sua fauna anofélica.....	39
Figura 3.1. Mapa com a localização de Salobra (ponto rosa no mapa) no estado do Mato Grosso do Sul e fotografia aérea da região.....	45
Figura 3.2. Mapa político do Mato Grosso do Sul, com destaque para o município de Miranda (em verde) e seus municípios limítrofes.....	46
Figura 3.3. Pontos de coleta sistematicamente empregados no intradomicílio (I) (20°11'51,53" S, 56°30'14,25" O), peridomicílio (P) (20°11'51,74" S, 56°30'13,58" O) e extradomicílio (E) (20°11'51,21" S, 56°30'10,33" O) em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	50
Figura 3.4. Armadilha com atrativo humano protegido, utilizada para avaliar a tendência antropofílica das espécies.....	51
Figura 4.1. Gel de agarose 1% da enzima MPI mostrando o padrão de bandas das espécies do Complexo Triannulatus, <i>An. triannulatus s.s.</i> , <i>An. halophylus</i> e <i>An. triannulatus C</i> capturadas em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	66
Figura 4.2. Variação bimestral das espécies de anofelinos em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	71

Figura 4.3. Variação bimestral de <i>An. triannulatus s.l.</i> (A) e contribuição percentual de <i>An. triannulatus s.s.</i> , <i>An. halophylus</i> e <i>An. triannulatus C</i> (B) em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	73
Figura 4.4. Contribuição percentual das espécies em cada mês de coleta (setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011) e no total dos meses, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS...	74
Figura 4.5. Níveis de água do Rio Miranda, volumes de chuva e temperaturas máxima e mínima nos períodos considerados nos meses de setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, no município de Miranda, MS.....	76
Figura 4.6. Ciclo de picadas de <i>An. darlingi</i> , em números absolutos, entre 17h e 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	78
Figura 4.7. Ciclo de picadas de <i>An. darlingi</i> , em valores percentuais, entre 17h e 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	79
Figura 4.8. Ciclo de picadas de <i>An. triannulatus s.l.</i> de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	80
Figura 4.9. Ciclo de picadas de <i>An. albitarsis s.l.</i> de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	81
Figura 4.10. Ciclo de picadas de <i>An. mattogrossensis</i> de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	82
Figura 4.11. Ciclo de picadas de <i>An. galvaoi</i> + <i>An. arthuri</i> de 17h a 11h, no extradomicílio nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	83
Figura 4.12. Ciclo de picadas de <i>An. oswaldoi s.l.</i> + <i>An. konderi</i> de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	84
Figura 4.13. Ciclo de picadas de <i>An. rondoni</i> de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	85
Figura 4.14. Número de fêmeas, por espécie, que tiveram seus ovários dissecados nos meses de maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	86
Figura 4.15. Número de fêmeas de <i>An. darlingi</i> nulíparas e paridas, capturadas no extradomicílio, em maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	87

Figura 4.16. Número de fêmeas de <i>An. triannulatus s.l.</i> nulíparas e paridas, capturadas no extradomicílio, em maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	87
Figura 4.17. Número total de indivíduos de cada espécie capturados por ambiente [intra, peri (apenas atrativo humano protegido) e extradomiciliar], no total das coletas bimestrais (setembro e janeiro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011) entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	90
Figura 4.18. Distribuição de indivíduos, em escala logarítmica, no intra, peri (apenas atrativo humano protegido) e extradomicílio, em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	91
Figura 4.19. Mapa do Mato Grosso do Sul mostrando os municípios (em azul) onde foram registrados casos autóctones de malária entre 2007 e 2011.....	101
Figura 5.1. Variação sazonal das espécies <i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. darlingi</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i> , <i>An. mattogrossensis</i> , <i>An. rondoni</i> e <i>An. triannulatus s.l.</i> observada pelas excursões científicas realizadas entre 1940 e 1942, e lideradas por Lauro Travassos, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	107

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1. Classificação da intensidade de transmissão da malária baseada na taxa de esplenomegalia (WHO, 1951).....	8
Tabela 1.2. Classificação Malária Estável <i>versus</i> Malária Instável.....	10
Tabela 1.3. Espécies de <i>Anopheles</i> registradas no Estado do Mato Grosso do Sul.....	36
Tabela 3.1. Fluxo de passageiros, por via aérea e terrestre, no Mato Grosso do Sul, de 2007 a 2010.....	46
Tabela 3.2. Datas das coletas e estações do ano e fases lunares correspondentes.....	49
Tabela 3.3. Reagentes utilizados na amplificação, por PCR, da região “barcode” do gene <i>COI</i>	59
Tabela 4.1. Resultado do diagnóstico isoenzimático realizado em uma amostra de 336 indivíduos do Complexo Triannulatus capturados no extradomicílio em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	65
Tabela 4.2. Resultados da identificação específica por meio de sequências “barcode” do gene <i>COI</i> em 30 mosquitos dos Complexos Albitarsis e Oswaldoi cujas análises morfológicas não foram conclusivas.....	67
Tabela 4.3. Total de indivíduos, por espécie, capturados no total das coletas bimestrais em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	69
Tabela 4.4. Comparação entre o nº de indivíduos capturados nos ambientes intra, peri (atração humana + atrativo humano protegido) e extradomiciliar (ponto sistemático), no total das coletas bimestrais de 17h a 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.....	89
Tabela 4.5. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de maio.....	94
Tabela 4.6. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de julho (1º dia).....	94
Tabela 4.7. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de julho (2º dia).....	95
Tabela 4.8. Total de mosquitos de cada espécie capturado nas três coletas simultâneas (um dia em maio e dois em julho) em atração humana, em atrativo humano protegido e em atrativo animal de 17 a 20h.....	95
Tabela 4.9. Casos de malária registrados no Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2002 e 2011.....	97

	Página
Tabela 4.10. Número de casos autóctones anuais registrados no Mato Grosso do Sul entre 2002 e 2011, e municípios onde os indivíduos se infectaram.....	98
Tabela 4.11. Casos importados ocorridos no Mato Grosso do Sul, entre 2002 e 2011, e municípios que receberam o maior número de casos importados em cada ano.....	99
Tabela 4.12. Informações epidemiológicas sobre os casos de malária autóctone ocorridos no Mato Grosso do Sul entre 2007 e 2011.....	100
Tabela 5.1. Trabalhos que estudaram a sazonalidade de <i>An. darlingi</i> nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil.....	112

RESUMO

O número de casos de malária autóctone e importada tem aumentado na Região Extra-Amazônica. O fluxo de indivíduos infectados para regiões não endêmicas com presença de vetores e demais condições necessárias à transmissão pode provocar surtos. O Mato Grosso do Sul, especialmente o Pantanal, está próximo a áreas malarígenas do Brasil e países vizinhos e por ele transitam milhares de pessoas, particularmente turistas brasileiros e advindos de várias partes do mundo. Assim, é importante a determinação das espécies de *Anopheles* que podem atuar como vetor e o estudo da ecologia desses mosquitos, para permitir avaliar o risco de reintrodução da malária, o melhor entendimento da epidemiologia da doença e o controle vetorial eficaz. A localidade Salobra, Pantanal do Município de Miranda, MS, outrora malarígena, é bastante peculiar, devido à sazonalidade das chuvas e rios com distintas características físico-químicas, que transbordam alagando vasta planície durante parte do ano. Tal peculiaridade pode ter favorecido a especiação e aparecimento de complexos de espécies crípticas. Neste trabalho, realizamos capturas bimestrais de anofelinos em Salobra, de setembro-2010 a julho-2011. Em cada mês, foram realizadas coletas durante cinco dias, de 17-20h, nas paredes de uma casa, em atrativo humano no peridomicílio e em armadilha Shannon com cavalo no extradomicílio, além de três capturas de 18h no extradomicílio. Foi realizado levantamento de dados epidemiológicos secundários acerca dos casos autóctones de malária ocorridos no MS nos últimos anos. No total, foram capturados 24.894 anofelinos, cuja maior frequência se deu na transição entre a estação chuvosa e seca. As identificações morfológica e molecular revelaram a presença de 13 espécies ou complexos em Salobra: *An. albitarsis* s.l., *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. halophylus*, *An. mattogrossensis*, *An. oswaldoi* s.l., *An. rondoni*, *An. triannulatus* s.s., *An. triannulatus* C, *An. arthuri*, *An. konderi* e *An. oryzalimnetes*, sendo as três últimas registradas pela primeira vez no MS. A espécie mais frequente no total das capturas foi *An. darlingi* (63,1%), principal vetor de malária no Brasil, seguida de *An. triannulatus* s.l. (19,7%). Todas as espécies apresentaram comportamento predominantemente exofágico e também foram abundantemente capturadas em atrativo animal, embora também tenham sido capturadas picando o homem no peridomicílio e coletadas repousando nas paredes internas da casa. O pico de maior frequência de anofelinos se dá no crepúsculo matutino e momentos peri-crepusculares do amanhecer, embora picos no crepúsculo vespertino e, principalmente, nas horas altas da noite também tenham sido observados, especialmente para *An. darlingi*. O levantamento epidemiológico revelou que, anualmente, ocorrem casos de malária autóctone e importada no MS, alguns diagnosticados no Pantanal. Mais de 66% dos casos eram de homens, com idade entre 18 e 52 anos, cujas atividades profissionais, como garimpo, extrativismo vegetal e agropecuária, aumentam a exposição à picada de anofelinos no extradomicílio durante o amanhecer e anoitecer, como se viu ocorrer em Salobra. Conclui-se que Salobra e o Pantanal de Miranda são consideravelmente receptivos e vulneráveis à transmissão de malária. Portanto, a vigilância deve ser intensificada nesta área, de modo a se evitar surtos e o restabelecimento da endemicidade da malária.

ABSTRACT

The number of cases of imported and autochthonous malaria has increased in recent years in the Extra-Amazonian Region. The migration of malaria-infected individuals to non-endemic regions with presence of vectors and other conditions necessary for the malaria transmission can cause outbreaks. Mato Grosso do Sul State (MS), especially the Pantanal Region, is close to malarious areas in Brazil and in bordering countries, and thousands of people, particularly Brazilians and tourists coming from various parts of the world, transit through Pantanal. It is, therefore, important to determine the *Anopheles* species that can act as vectors and to study the ecology of these mosquitoes, in order to allow risk assessment of reintroduction of malaria, better understanding of disease epidemiology, and effective vector control. The location of Salobra, in the Pantanal of Miranda Municipality, MS, a malarious area in the past, is quite peculiar, due to seasonal rainfalls and rivers with different physico-chemical characteristics, which overflow flooding a vast plain during a time of year. This peculiarity may have favored speciation and appearance of complexes of cryptic species. We carried out bimonthly collections of *Anopheles* mosquitoes in Salobra, from 2010-September to 2011-July. Each month, collections were conducted for five days, from 17-20h, in the walls of a domicile, in human bait in the peridomicile and in Shannon trap with animal bait in extradomicile. Three 18-hour collections in extradomicile were performed. An epidemiological survey, based on secondary data, about autochthonous malaria cases occurred in MS in recent years was conducted. In total, 24,894 anophelines were collected, which occurred more frequently in the transition between the rainy and dry seasons. Morphological and molecular identification revealed the presence of 13 species in Salobra: *An. albitarsis* s.l., *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. halophylus*, *An. mattogrossensis*, *An. oswaldoi* s.l., *An. rondoni*, *An. triannulatus* s.s., *An. triannulatus* C, *An. arthuri*, *An. konderi* and *An. oryzalimnetes*, the last three being registered for the first time in MS. The most frequent species in total of collections were *An. darlingi* (63.1%), main vector of malaria in Brazil, and *An. triannulatus* s.l. (19.7%). All species presented predominantly exophagic behavior and were abundantly caught on horse. However, they were also caught biting human in the peridomicile and on the inner walls of the house. The highest peak frequency of all anophelines occurs in the morning and around peri-crepuscular hours, although peaks at dusk, and especially at dawn, are also observed, especially regarding *An. darlingi*. The epidemiological survey showed that autochthonous and imported malaria cases occur annually in MS, and some occur in Pantanal. More than 66% of cases were male individuals, aged 18-52 years, whose occupations such as mining, agriculture and wood extraction, increase exposure to the bite of anophelines in the extradomicile, during dawn and dusk, as it has been observed in Salobra. We conclude that Salobra and the Miranda Pantanal are pretty receptive and vulnerable to malaria transmission. Therefore, surveillance should be intensified in this area, in order to prevent the occurrence of outbreaks and the reestablishment of endemic malaria.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Malária

A malária é uma doença infecto-parasitária produzida por protozoários do gênero *Plasmodium*, família Plasmodiidae, classe Sporozoa. Há diversas espécies de plasmódios, porém um número reduzido delas é responsável pela malária humana, as quais são: *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890; *Plasmodium falciparum* Welch, 1897; *Plasmodium malariae* Feletti & Grassi, 1889; *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 e *Plasmodium knowlesi* Sinton & Mulligan, 1933. Apenas os três primeiros circulam no Brasil. Os plasmódios humanos são transmitidos pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) infectadas. A transmissão realizada por mosquitos foi comprovada pelo indiano Ronald Ross em 1897, após investigações conduzidas por este pesquisador e por Patrick Manson (Suárez-Mutis *et al.*, 2006).

A malária atualmente encontra-se presente nas regiões tropical e subtropical, sendo endêmica em 106 países (WHO, 2011). Sua distribuição, entretanto, é heterogênea, estando alguns países, como o Brasil, com uma grande extensão de seu território livre da malária endêmica. Apesar disso, em áreas não malarígenas onde existe alta densidade vetorial e circulação de indivíduos infectados vindos de regiões endêmicas, podem ocorrer surtos de casos introduzidos e até mesmo o estabelecimento da transmissão autóctone. Desse modo, em regiões não endêmicas, as áreas de risco são determinadas pelo potencial malarígeno, que possui dois componentes: a receptividade e a vulnerabilidade. A primeira se refere à presença, densidade e longevidade dos vetores locais e a segunda refere-se ao fluxo de pessoas infectadas provenientes de regiões endêmicas (Ministério da Saúde, 2005). Em relação à receptividade, pode-se dizer que todos os Estados brasileiros são, em maior ou menor grau ou extensão, receptivos para a malária, já que a distribuição de anofelinos vetores se estende por praticamente todo o território nacional. Já a vulnerabilidade é menos uniforme no Brasil. Os Estados fronteiriços com a Amazônia, onde ocorre a quase totalidade das transmissões no país, provavelmente são os mais vulneráveis, justamente devido à maior proximidade e, portanto, maior possibilidade de deslocamento entre seus habitantes.

Clinicamente, a malária é uma doença febril aguda que acomete principalmente o fígado e o sangue, tecidos onde o parasito realiza seu ciclo assexuado (ou esquizogonia), composto de uma fase extra-eritrocítica e outra eritrocítica. Os esporozoítas injetados na corrente sanguínea durante o repasto do

mosquito migram para o fígado e invadem os hepatócitos, onde desenvolverão os estágios de trofozoíta, esquizonte e merozoíta. Este último rompe a célula hepática, entra na circulação sanguínea e invade os eritrócitos, onde passará pelos estágios de trofozoíta e esquizonte. Alguns esquizontes darão origem aos gametócitos masculino e feminino, e os demais originarão novos merozoítas, os quais, por sua vez, irão romper os eritrócitos e invadir novas hemácias. Ao se alimentar em um indivíduo humano portador de gametócitos, ocorrerá, no mosquito, o ciclo esporogônico, cuja duração varia entre as espécies de plasmódios. No lúmen do tubo digestivo, ocorrerá o desenvolvimento dos gametócitos em gametas e a fertilização. Após atravessar o epitélio do estômago, o plasmódio irá se encistar na parede deste órgão e gerará dezenas de células filhas, os esporozoítas. Estes, depois de ganhar a hemocele, irão se deslocar pela hemolinfa até chegar às glândulas salivares. Os esporozoítas são sua forma infectante ao ser humano, que é injetada no momento da picada juntamente com a saliva (Figura 1.1).

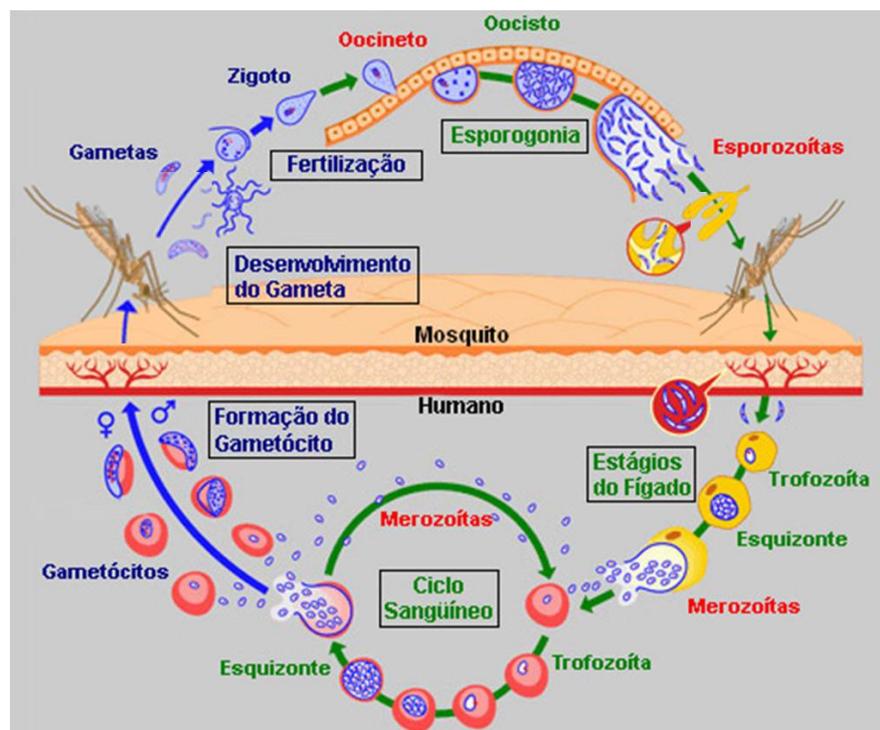


Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Escritas em vermelho estão as formas invasivas do protozoário; em verde, os estágios assexuados, que se multiplicam rapidamente; em azul estão as formas sexuadas do parasito. Adaptado de Wellcome Trust (2007).

Febre, sudorese e calafrios formam a tríade clássica de sintomas da malária. O diagnóstico baseado em tais sintomas, bem como em sinais como esplenomegalia, pode sugerir, mas não confirmar a malária, já que essas características também ocorrem em outras doenças infecto-parasitárias como a leishmaniose visceral, por exemplo. Assim sendo, o diagnóstico preciso da malária é feito principal e rotineiramente por meio da observação do plasmódio no sangue do paciente. Atualmente, o padrão ouro adotado para o diagnóstico definitivo é o exame de gota espessa. Outros métodos também utilizados são a distensão sanguínea, os testes imunocromatográficos (testes rápidos) e os testes moleculares (PCR).

Além da forma sintomática da malária anteriormente mencionada, existe também a infecção assintomática, que, em geral, ocorre em áreas de média e, principalmente, de alta endemicidade. Em áreas de grande incidência de casos de infecção assintomática, crianças de até dois anos são suscetíveis e correm alto risco de adoecer de malária, e os adultos apresentam imunidade clínica bem como baixa densidade parasitária (MacDonald, 1957; Baird *et al.*, 1991; Andrade *et al.*, 1995; Suárez-Mutis & Coura, 2007). Ressalta-se que os indivíduos assintomáticos são difíceis de serem detectados, permanecendo como fonte de infecção para os mosquitos e mantendo, assim, a circulação de plasmódios e a transmissão de malária em uma região (Alves, 2005).

A malária, quando não diagnosticada e tratada oportunamente, pode evoluir para suas formas mais graves (por exemplo, malária cerebral) e levar à morte. Estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, em 2010, 216 milhões de pessoas contraíram malária e 665.000 foram vítimas fatais dessa doença (WHO, 2011).

Apesar das estratégias, tanto globais quanto localizadas, de controle e eliminação por meio dos avanços e aplicação de métodos diagnósticos, de medicamentos e do controle vetorial, a malária ainda apresenta altas taxas de morbidade e letalidade, ocasionando, desse modo, graves perdas socioeconômicas, principalmente em países africanos.

1.2. Fatores que determinam a transmissão da malária

A transmissão de malária em qualquer local é dependente de uma complexa interação de fatores relacionados ao hospedeiro humano, ao parasito, ao vetor e também de fatores ambientais, socioeconômicos e das medidas de controle.

Os principais fatores relacionados ao hospedeiro humano são: a idade, o histórico de exposição à malária, a ocorrência de gravidez e as características genótípicas do indivíduo que estão relacionadas à aquisição da doença, como por exemplo, a presença ou ausência, na superfície dos eritrócitos, de determinadas variantes alélicas do antígeno Duffy, ao qual o *P. vivax* se adere para penetrar a célula (Miller *et al.*, 1975; McGinnis *et al.*, 1977). Todos esses fatores possuem relação com a resposta imune à malária.

Propriedades do parasito que afetam a transmissão são o genótipo parasitário, a duração do ciclo esporogônico e a resistência às drogas antimaláricas. Tais características variam entre as espécies de plasmódio e até mesmo dentro de uma mesma espécie do parasito.

Em relação ao vetor, os principais fatores que irão determinar a transmissão da malária são a longevidade (sobrevivência), a densidade populacional, a suscetibilidade à infecção plasmodial e o comportamento alimentar, sendo este último representado pela frequência de picada, preferência quanto ao hospedeiro (grau de antropofilia) e preferência quanto ao ambiente de picada e de repouso após a alimentação (Gillies, 1988; Charlwood, 1996). As diferentes espécies de *Anopheles* apresentam comportamento alimentar muito diversificado. Essa variação nos hábitos alimentares pode se verificar também entre populações de uma mesma espécie que ocorrem em diferentes regiões (Charlwood & Hayes, 1978; Forattini, 1987; Charlwood, 1996; Voorham, 2002). A escolha do hospedeiro é em grande parte determinada geneticamente, porém altamente modulada pela disponibilidade e acessibilidade das fontes sanguíneas (Gillies, 1988).

Outro fator bastante importante em modelos de transmissão de malária é a longevidade do vetor. Para transmiti-la, um mosquito, após ser infectado, tem que sobreviver durante todo o ciclo esporogônico do parasito, que em geral dura mais de 10 dias. Além disso, o vetor também precisa estar presente em alta densidade, pois quanto maior a densidade populacional, maiores as chances de contato entre o vetor e humanos e maior a taxa de transmissão ou, no caso de áreas não malarígenas, maior o potencial de transmissão.

Os fatores anteriormente mencionados (densidade, longevidade e comportamento alimentar) são os principais utilizados no cálculo da capacidade vetorial, que expressa o risco de transmissão de malária em uma região com base em parâmetros do vetor (Garret-Jones, 1964). A fórmula da capacidade vetorial, uma das mais utilizadas em modelos matemáticos de transmissão, é:

$$C = ma^2p^n / -\log_e p$$

onde, C = capacidade vetorial

m = densidade do vetor em relação à população humana

a = número de repastos sanguíneos que um vetor faz por dia em um indivíduo humano

p = proporção de vetores que sobrevivem por dia

n = período de incubação do parasito no vetor

Fatores ambientais, tais como temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar, exercem forte influência sobre a transmissão da malária, pois afetam direta ou indiretamente a biologia de parasitos e vetores. Considerando a fórmula acima, os fatores ambientais influem na densidade (m), na sobrevivência diária (p) e no período de incubação do parasito no vetor (n). Mais detalhadamente, o incremento no volume de chuvas ou o transbordamento dos rios, por exemplo, propiciam a formação de criadouros larvais, podendo aumentar, em um curto período de tempo, a densidade populacional de vetores. Além disso, uma maior precipitação pluviométrica aumenta a umidade relativa, a qual interfere positivamente na longevidade e atividade dos mosquitos adultos. Por outro lado, um aumento acentuado no volume de chuva pode fazer transbordar e destruir criadouros estáveis, arrastando as larvas e pupas. Já a elevação da temperatura, que também influi na longevidade, aumenta a frequência de alimentação dos mosquitos, bem como favorece o desenvolvimento do plasmódio dentro do vetor. A variação nas condições ambientais e o modo como elas influenciam a biologia dos mosquitos explica, em grande parte, o caráter sazonal da malária.

As diferentes formas de ocupação do espaço, tais como a agricultura, a pecuária, a construção de rodovias, as migrações, as invasões e os assentamentos provisórios; de exploração econômica dos recursos naturais, por exemplo, a construção de usinas hidrelétricas; de atividades profissionais, como o garimpo e de

atividades do turismo formam o conjunto de fatores socioeconômicos envolvidos na transmissão da malária. A migração de populações não imunes para uma área endêmica pode desencadear o surgimento de uma epidemia. O fluxo migratório de indivíduos portadores de gametócitos para uma área indene com presença de vetores e demais condições necessárias à transmissão pode também provocar a ocorrência de surtos epidêmicos. Exemplo desta situação epidemiológica ocorreu em 2005 em Monte Alegre, Minas Gerais, uma área considerada livre de transmissão há muitas décadas. Ali foram confirmados 11 casos de malária autóctone provocados por *P. vivax* e *P. falciparum*. Após uma busca ativa de casos na região, constatou-se que os casos autóctones de malária por *P. vivax* foram, possivelmente, derivados de dois indivíduos procedentes do Pará e do Mato Grosso, os quais foram diagnosticados com esse parasito no mesmo mês de ocorrência da maioria dos casos autóctones (Limongi *et al.*, 2008).

A aplicação de medidas de controle do vetor também influencia a transmissão da malária. O uso de mosquiteiros impregnados com inseticida e a aspersão intradomiciliar de inseticidas, duas das principais formas de controle vetorial na fase adulta, reduzem o tamanho da população adulta e, principalmente, a longevidade dos mosquitos adultos potencialmente infectados ou infectantes, diminuindo, assim, a transmissão. Também, o tratamento de indivíduos humanos portadores de gametócitos é outra importante estratégia de controle, pois impede que os mosquitos se infectem e, posteriormente, inoculem esporozoítas em outros hospedeiros humanos, interrompendo assim o ciclo de transmissão.

1.3. Classificação epidemiológica da malária

Devido à complexidade e heterogeneidade da malária nas distintas regiões em que ocorre, existem diferentes formas de classificação dessa doença: quanto à intensidade e estabilidade da transmissão, quanto à estratificação epidemiológica de risco e quanto ao local da infecção (WHO, 1951; MacDonald, 1957; WHO, 1961; Suárez-Mutis *et al.*, 2006).

A intensidade de transmissão da malária pode ser quantificada por meio de diferentes métodos, entre os quais se destaca a taxa de esplenomegalia, representada pelo percentual de baços palpáveis na população infantil de 2 a 9 anos (WHO, 1951). O índice de esplenomegalia classifica as áreas malarígenas em

quatro níveis de endemicidade: áreas holoendêmicas, hiperendêmicas, mesoendêmicas e hipoendêmicas (Tabela 1.1). Em áreas holoendêmicas, a transmissão é intensa e contínua ao longo do ano, e observa-se uma considerável imunidade entre adolescentes e adultos, enquanto que nas áreas hiperendêmicas, a transmissão é intensa, porém sazonal. Em áreas mesoendêmicas e hipoendêmicas, ocorre média e baixa transmissão, respectivamente. Cabe ressaltar que o principal problema da classificação do nível de transmissão baseado na esplenomegalia é a possível sobrestimação de algumas áreas em que ocorrem concomitantemente outras doenças causadoras de aumento do volume do baço.

Tabela 1.1. Classificação da intensidade de transmissão da malária baseada na taxa de esplenomegalia (WHO, 1951)

Nível de transmissão	Taxa de esplenomegalia
Malária holoendêmica	> 75% das crianças de 2 a 9 anos de idade Baixa em adultos
Malária hiperepidêmica	Acima de 50 até 75% em crianças de 2 a 9 anos de idade Elevada em adultos
Malária mesoendêmica	Varia de 11-49% em crianças de 2 a 9 anos
Malária hipoendêmica	= ou < 10% em crianças de 2 a 9 anos

Quanto à estabilidade da transmissão, a malária pode ser classificada em dois tipos principais: malária estável e malária instável (MacDonald, 1957). As características que definem as áreas de malária como estáveis ou instáveis são descritas na Tabela 1.2, sendo que a principal dessas características é a aquisição de imunidade clínica por parte da população adulta. Em regiões instáveis observa-se baixa imunidade em adultos, isto é, alto número de indivíduos suscetíveis à infecção, enquanto em áreas estáveis é considerável o número de adultos imunes ao desenvolvimento da doença. Em regiões estáveis, indivíduos com imunidade clínica, embora não desenvolvam os sintomas da doença, continuam portando plasmódios e

atuando como possíveis fontes de infecção para os mosquitos. Nas áreas estáveis, os mosquitos são bastante antropofílicos, picam com bastante frequência o ser humano e possuem densidade e longevidade altas, apresentando assim maior capacidade vetorial. Já em áreas instáveis, os anofelinos picam o homem com menor frequência, sendo, dessa forma, menos eficientes em transmitir plasmódios para o homem, ou melhor, essencialmente de baixa capacidade vetorial (MacDonald, 1957; Suárez-Mutis *et al.*, 2006).

Tabela 1.2. Classificação Malária Estável *versus* Malária Instável

Característica	Malária estável	Malária instável
Malária clínica	Afeta principalmente bebês, crianças e gestantes	Afeta a população de modo geral
Vetor	Eficiente, com alta frequência de picadas, preferência por hospedeiro humano e longevidade alta	Ineficiente, com baixa frequência de picadas, preferência por hospedeiro animal e baixa longevidade
Principal parasito	<i>P. vivax</i> ou <i>P. falciparum</i>	Em geral, <i>P. vivax</i>
Clima	Favorável ao rápido ciclo esporogônico, ou seja, clima com temperatura entre 20 e 30°C e umidade relativa acima de 60%	Desfavorável ao rápido ciclo esporogônico
Nível de transmissão	Moderado a muito alto	Baixo (alto durante a ocorrência de epidemias)
Incidência	Varia pouco ao longo do ano. A variação está relacionada aos períodos sazonais.	Bastante variável, não estando necessariamente relacionada à sazonalidade
Epidemias	Improváveis de ocorrer	Prováveis quando as condições climáticas forem favoráveis

Adaptado de Wellcome Trust, 2007.

O risco de transmissão de malária em uma determinada região é calculado pela Incidência Parasitária Anual (IPA), definida pela OMS como o número de novos casos ocorridos em uma dada área durante um ano, dividido pela população desse lugar sob risco no mesmo período, multiplicado por mil habitantes. No Brasil, as áreas são classificadas em: alto risco ($IPA \geq 50$); médio risco ($10 \leq IPA < 50$); baixo risco ($1 \leq IPA < 10$); sem risco ($IPA < 1$). A Incidência Parasitária Anual na Região Amazônica tem variado ano a ano, podendo-se observar, entre 1996 e 2010, o aumento do número de municípios de médio e baixo risco, e concomitante redução das áreas de alto risco, as quais tem se concentrado na porção oeste dessa região (Figura 1.2). Nesse mesmo período, observou-se um aumento expressivo no número de municípios com baixo risco de transmissão na Região Extra-Amazônica (SVS/MS, 2011) (Figura 1.2).

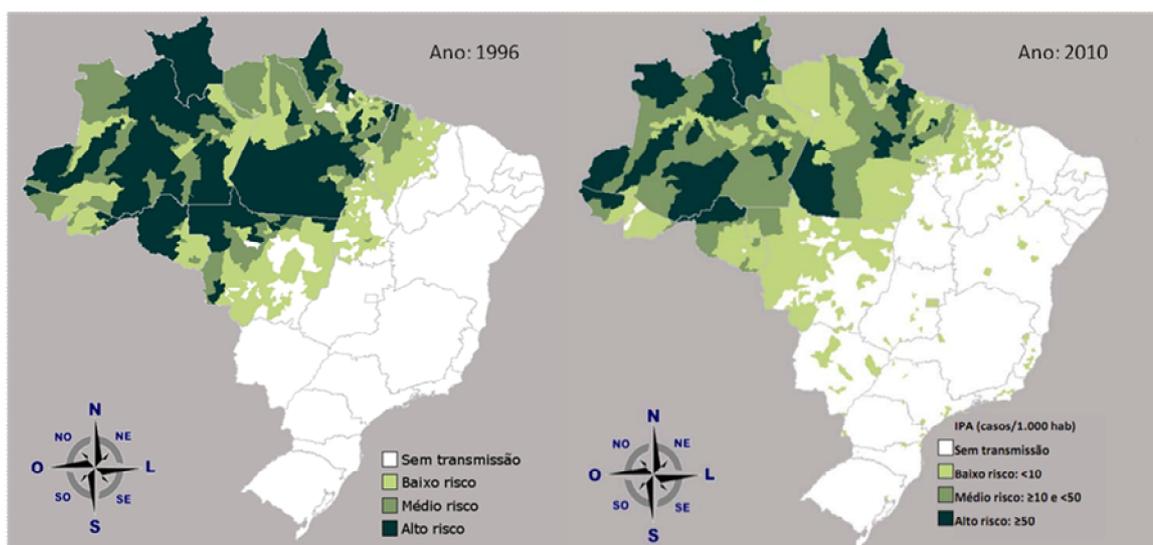


Figura 1.2. Incidência Parasitária Anual no Brasil nos anos de 1996 e 2010. No mapa à esquerda, do ano de 1996, pode-se observar elevado número de municípios com IPA igual ou maior que 50. Já em 2010, observa-se retração das regiões de alto risco de transmissão de malária na Amazônia e aumento do número de municípios com risco de transmissão na Região Extra-Amazônica. Fonte: SISMAL/SIVEP_MALARIA/SVS/MS.

A malária pode também ser classificada segundo o local onde foi adquirida, classificação esta que se reveste de grande importância devido à crescente mobilidade humana proporcionada pela expansão das estradas e pelo acesso cada

vez maior aos variados meios de locomoção, muitos dos quais consideravelmente rápidos. Assim, a malária autóctone designa aquela contraída na própria localidade e cuja transmissão já independe de casos importados (WHO, 1961). Malária importada se refere àquela adquirida fora da região onde o indivíduo doente se encontra ou onde foi diagnosticada. Malária introduzida designa os casos de malária derivados de um caso importado. Malária induzida é aquela que decorre de formas pouco comuns de transmissão de malária, como a transfusão sanguínea (Saez-Alquézar *et al.*, 1998), o uso compartilhado de agulhas por usuários de drogas (Barata *et al.*, 1990; Shin Shiang *et al.*, 1991) e a transmissão congênita (McDermott *et al.*, 1996; Suárez-Mutis *et al.*, 2006). Além dos tipos anteriormente descritos, existe também a recaída, que designa o caso de malária ocorrido algum tempo depois de cessar os sintomas do primeiro ataque malárico e de negatificação da parasitemia, independente se esse indivíduo se deslocou ou não para uma área malarígena. Este tipo de malária é provocado pela persistência de hipnozoítos no tecido hepático, formas latentes do *P. vivax* (ou *P. ovale*).

No Brasil, além dos casos adquiridos nas áreas endêmicas, existem também aqueles contraídos em áreas de malária residual na Região Extra-Amazônica. Ao longo dos últimos anos, as áreas de malária residual, situadas principalmente em resquícios de Mata Atlântica, têm apresentado importância epidemiológica cada vez maior, tendo em vista o número crescente de casos notificados e de surtos, e a alta taxa de letalidade nessas áreas, principalmente nos Estados da Região Sul-Sudeste (Machado *et al.*, 2003; Cerutti *et al.*, 2007; SVS/MS, 2009). É importante ressaltar que o clima, a presença de vetores potenciais e o fluxo de pessoas nas áreas de malária residual são condições que podem favorecer a transmissão. Desse modo, a vigilância epidemiológica, incluindo a pesquisa de vetores, deve ser contínua, de modo a se evitar a ocorrência de pequenas epidemias e o restabelecimento da endemicidade da malária nessas regiões.

1.4. A malária no Brasil

Uma das mais notáveis epidemias de malária relatadas no Brasil data da década de 1930, quando ocorreu a introdução acidental do *Anopheles (Cellia) arabiensis* Patton, 1905, uma espécie de anofelino do Complexo Gambiae, no Rio Grande do Norte, provavelmente por navios franceses vindos do Senegal (Shannon,

1930, 1932; Soper & Wilson, 1943; Deane, 1992; Parmakelis *et al.*, 2008). Nos anos de 1932 a 1937, ocorreu a “ocupação silenciosa” do *An. arabiensis* no Ceará e Rio Grande do Norte e, entre 1938 e 1939, uma enorme epidemia atingiu ambos os estados, com 14.000 casos fatais nos oito primeiros meses, considerando-se apenas o estado do Ceará (Deane, 1992; Parmakelis *et al.*, 2008).

Na década de 1940, a malária era endêmica em praticamente todo o Brasil e tinha como principal espécie vetora o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926, ainda hoje o mais importante vetor de malária no país (Galvão *et al.*, 1942; Deane *et al.*, 1948; Póvoa *et al.*, 2006; Sinka *et al.*, 2010). Nesse período, registrava-se uma média de seis milhões de casos por ano, o que representava 20% da população brasileira àquela época (Barros-Barreto, 1940; Tauil & Daniel-Ribeiro, 1998). Após uma bem sucedida campanha de erradicação nos anos 1950, segundo os moldes preconizados pela OMS, houve uma drástica redução no número de casos, que passou da casa dos milhões para apenas 36.900 no início da década de 1960 (Marques & Cárdenas, 1994). Além da redução da incidência, houve uma retração também territorial da malária no Brasil: várias partes do país ficaram praticamente livres da transmissão autóctone de malária, como grande parte das regiões Sul, Sudeste e Nordeste.

A partir dos anos 1970, ocorreu uma crescente e desordenada ocupação de grande parte da Amazônia, com muitos migrantes chegando à região em busca das oportunidades de trabalho que surgiam em projetos agropecuários, de mineração e de construção de rodovias e hidrelétricas, muitos dos quais patrocinados pelo governo militar (Marques *et al.*, 1977; Marques & Pinheiros, 1979; Tauil, 1981, 1982). O fluxo migratório de indivíduos suscetíveis advindos de uma área não endêmica para uma região com condições altamente favoráveis à transmissão elevou o número de casos de malária de 52.469 em 1970 para 577.500 casos em 1989 (Marques & Cárdenas, 1994; Barata, 1995) (Figura 1.3). A maior parte dos casos de malária era registrada em pessoas do sexo masculino já que as atividades de garimpo, a construção de rodovias e de empreendimentos hidrelétricos e a agropecuária eram atividades essencialmente exercidas por homens, ou seja, a malária era uma doença estreitamente ligada a atividades profissionais.

A situação calamitosa das décadas de 1970 e 1980 começou a ser revertida no início dos anos 1990, com a implementação de medidas recomendadas pela OMS que visavam precipuamente o controle da malária, em vez de sua erradicação, de modo a reduzir a morbidade e letalidade por essa parasitose (UNDP/World

Bank/WHO, 1993). Assim, o Programa de Controle Integrado de Malária (PCIM) reorientou suas ações para o diagnóstico rápido, o tratamento adequado e eficaz e as medidas de controle afinadas com as condições ecológicas e sociais locais (Ladislau *et al.*, 2006). Como consequência direta dessas medidas, observou-se uma expressiva diminuição dos casos de malária por *P. falciparum* nos anos seguintes (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010) (Figura 1.3).

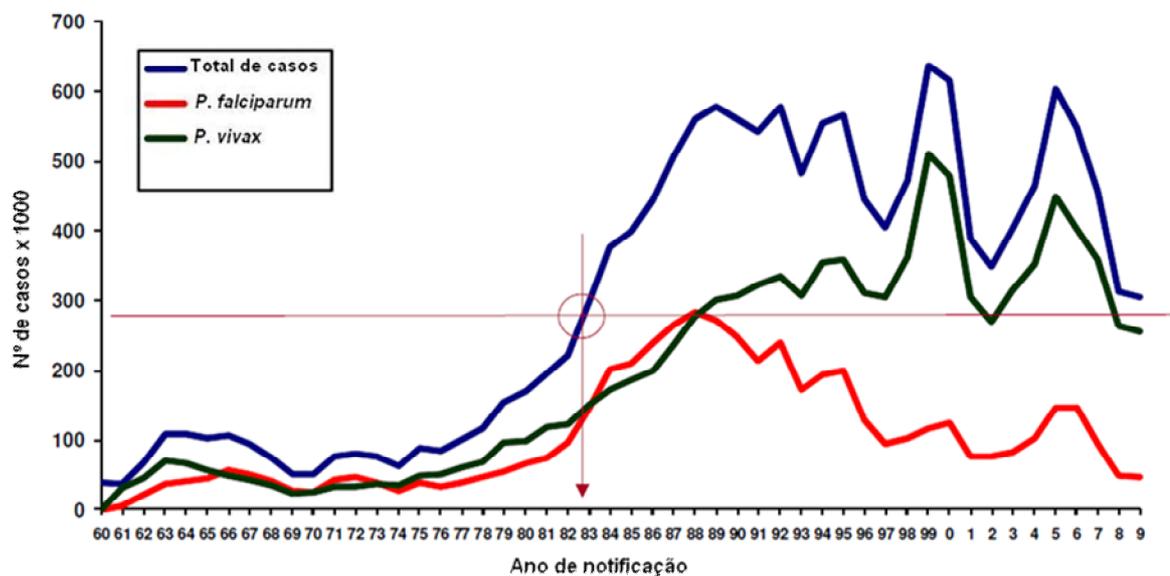


Figura 1.3. Registro anual de casos de malária causados por *P. falciparum* e *P. vivax* no Brasil durante o período de 1960 a 2009. Houve um aumento expressivo no número de casos no final dos anos 1970 e início da década de 1980 devido à ocupação desordenada da Amazônia. A partir dos anos 1990, observou-se a diminuição dos casos de malária por *P. falciparum* em virtude da implementação do diagnóstico rápido e tratamento mais eficaz. Com a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), em 1999, ocorreu uma redução drástica dos casos de malária nos três anos subsequentes. Em 2007, houve redução no número de casos de malária por *P. falciparum* após a implementação de um novo tratamento à base de artemeter e lumefantrina. O ponto de intersecção entre o círculo e as duas linhas mostra que o número de casos de malária de 2009 voltou a se igualar ao número de casos registrados no ano de 1983. Fonte: SISMAL/SIVEP_MALARIA/SVS/MS.

Não obstante, em 1999, o Brasil assistiu ao maior número absoluto de registros de malária da sua história, praticamente todo devido à transmissão na Amazônia e em sua área de influência. Tendo em vista esse fato, foi lançado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), um programa vigoroso de combate à doença envolvendo os três níveis de governo, que resultou numa drástica redução no número de casos em apenas dois anos de existência (Loiola *et al.*, 2002) (Figura 1.3).

Em 2003, um novo plano foi implementado, o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), atualmente vigente em nosso país. Entretanto, entre 2003 e 2005, os casos de malária, mais uma vez, atingiram altos patamares, podendo-se atribuir essa elevação a um conjunto de fatores diversos. Entre esses fatores destacam-se a ocupação desordenada das periferias das grandes cidades da Região Norte como consequência da reforma agrária e o aumento da densidade vetorial resultante da construção em massa de tanques de piscicultura, os quais, depois de abandonados, acabaram por servir de criadouros para os mosquitos (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Em 2007, quatro anos após a implementação do PNCM, ocorreu uma queda brusca nos casos por *P. falciparum* graças à implementação de novo tratamento contra esse parasito à base de artemether e lumefantrina.

Nos últimos 30 anos, o panorama da malária no Brasil modificou-se de doença amplamente distribuída no país para uma doença com caráter mais focal, basicamente restrita à Região Amazônica e com algumas poucas áreas de malária residual fora dessa região (Barata, 1995; Loiola *et al.*, 2002). A situação epidemiológica atual do nosso país difere grandemente daquela apresentada pelo continente africano de um modo geral, onde, anualmente, cerca de 200 milhões de pessoas adoecem de malária, sendo aproximadamente 700.000 casos fatais. Apesar desses números alarmantes e da imensa maioria dos casos serem de malária por *P. falciparum*, a rede de tratamento e diagnóstico nos países africanos é, de modo geral, precária. Além disso, as medidas de controle vetorial implementadas na região ainda são insuficientes.

No Brasil em 2010, foram registrados 333.339 casos de malária, sendo 72 óbitos por essa doença (SVS, 2011). Desde o início da década de 1990, a maioria dos casos ocorridos em nosso país é devida ao *P. vivax*, tanto na Região Amazônica como nas áreas de autoctonia no Sul-Sudeste, únicas regiões onde a malária residual vem sendo atualmente estudada (Cerutti *et al.*, 2007; Limongi *et al.*, 2008).

Além disso, a prevalência da malária continua maior em homens do que em mulheres, sendo de aproximadamente 60%, tanto na região endêmica como em áreas de autoctonia residual (Marques *et al.*, 2008; SVS/MS, 2009). Do total de casos em 2010 mencionado acima, 8.059 (2,4%) foram de malária importada, incluindo os casos importados entre municípios dentro da própria Região Amazônica, os casos na Região Extra-Amazônica oriundos de municípios da área endêmica brasileira, e também os casos diagnosticados no Brasil, porém adquiridos em outros países endêmicos (SINAN Web/SVS/MS).

1.5. Breve histórico da malária no Mato Grosso do Sul

Os casos de malária no território do Mato Grosso*, embora careçam de registros oficiais até o início do século XX, muito provavelmente já ocorriam antes mesmo da chegada dos primeiros europeus, nas décadas iniciais de 1.500. A malária por *P. vivax* já era conhecida pelos nativos do continente americano (Vital, 2010). Entretanto, a infecção por *P. falciparum* deve ter chegado à América com os europeus (Vital, 2010) e, possivelmente, ao Mato Grosso com a ocupação dessa região pelos primeiros portugueses, em busca de riquezas minerais em países vizinhos, como a Bolívia e o Peru.

Em um salto histórico, no ano de 1864, com a invasão do Paraguai à Província de Mato Grosso, é registrada a ocorrência de casos de malária bem como outras doenças tropicais em relatos históricos sobre a Guerra do Paraguai (1864-1870) (Pinto de Moura, 2011). Nessa época, a província de Mato Grosso, embora dividida em quatro regiões militares (Cuiabá, Vila Maria, Baixo Paraguai e Vila Miranda), esteve despreparada para a Guerra, com poucos voluntários no “front” de batalha e um corpo médico muito reduzido (Fragoso, 1956). Por conta disso, a Província viu seus habitantes perderem vidas em decorrência dos conflitos e de doenças como a malária. “Durante a marcha a malária castigou muito aos brasileiros. Que foram sendo medicados com: sulfato de quinino ‘as colheres de sopa’, conforme Dionísio Cerqueira” (*apud* Pinto de Moura, 2011).

Entre 1905 e 1917, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, embora não existam registros de números oficiais, as vidas de muitos operários foram ceifadas pela malária e por outros agravos como a febre amarela e

* O Estado do Mato Grosso do Sul foi emancipado do Estado do Mato Grosso através da Lei Complementar nº 31, de 11 de outubro de 1977, sancionada pelo então presidente da República General Ernesto Geisel.

a varíola (Carvalho, 2009). “O traçado da ferrovia atingia áreas insalubres (...) e pantanosas, no estado de Mato Grosso, as quais eram úmidas e empestadas de mosquitos, transmissores de malária, febre amarela (...)” (Carvalho, 2009). Naquela época, pouquíssimas medidas de profilaxia contra as doenças tropicais eram adotadas e apenas os casos febris eram tratados. Somente em 1919, quase 15 anos depois do início da construção da Ferrovia, ocorreu a melhoria das condições de um hospital em Aquidauana, para tratamento dos trabalhadores da Estrada de Ferro (Carvalho, 2009).

Em 1938, foi feita a primeira de uma série de excursões científicas ao Estado do Mato Grosso, com o apoio de diferentes instituições do Rio de Janeiro e São Paulo, entre elas o Instituto Oswaldo Cruz e o Museu Nacional. O objetivo dessas excursões foi a realização de levantamentos da fauna e flora local e também a obtenção de informações sociais e epidemiológicas sobre as doenças que acometiam a população de algumas localidades desse Estado. Tais excursões tinham como apoio e itinerário a Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, que liga Bauru (SP) a Corumbá (MS) (Figura 1.4). Foram visitados diferentes municípios, entre os quais destacam-se Aquidauana, Bodoquena, Porto Esperança e Miranda. Um total de 679 indivíduos humanos foram examinados, tendo sido diagnosticados nove casos de malária nas regiões percorridas (Von Paumgarten *in* Travassos, 1939). Essa investigação ocorreu em outubro, mês de seca na região, época em que, de maneira geral, poucos casos de malária são registrados.

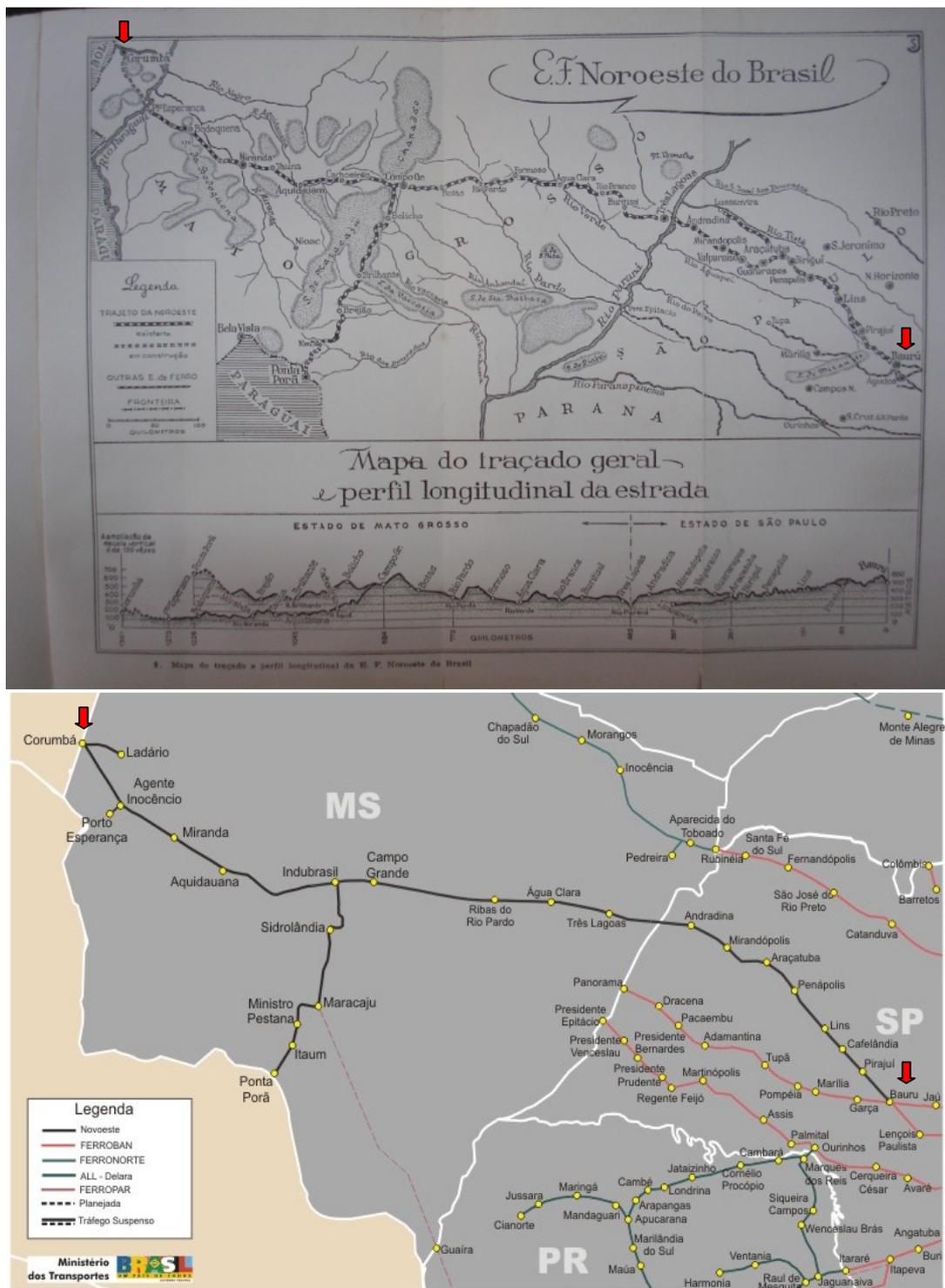


Figura 1.4. Mapas antigo e atual mostrando o trajeto da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, que liga Bauru (SP) a Corumbá (MS). Também conhecida como Trem do Pantanal, a Noroeste do Brasil percorre diversas cidades nesses dois estados. Atualmente, essa ferrovia pertence à Companhia América Latina Logística e, desde a sua privatização em 1996, faz apenas transporte de cargas. Em ambos os mapas, as estações de Corumbá e Bauru são indicadas por setas vermelhas. No mapa atual, o trajeto da Noroeste do Brasil é representado pela linha preta. Fontes dos mapas: atual – Wikipédia; antigo – Carvalho, 2009.

Uma segunda excursão científica foi realizada pelas mesmas instituições em julho de 1939, depois de passada a estação das cheias. As localidades da estrada de ferro escolhidas para tais estudos foram a cidade de Campo Grande e a vila de Salobra, no município de Miranda. Nesta segunda viagem, observou-se a ocorrência de um surto de malária em Salobra. Dos seus 50 moradores, 49 estavam parasitados por *P. vivax*. Esses indivíduos foram imediatamente tratados com comprimidos de quinino (Travassos & Teixeira de Freitas, 1941). Por causa deste surto, alguns habitantes resolveram emigrar de Salobra. Um elevado número de culicídeos foi capturado pela equipe da excursão, 95% do gênero *Anopheles* (Travassos & Teixeira de Freitas, 1941).

Em fevereiro e março de 1940 (auge das chuvas), durante a terceira excursão, também foram capturados muitos mosquitos, sendo aproximadamente 95% deles anofelinos. Entretanto, não se verificou nenhum caso de malária em Salobra nesta excursão. Dos 47 residentes na região nesta época, 26 (55,32%) já haviam contraído malária alguma vez, 15 deles dentro da própria vila de Salobra. Os demais que tiveram a doença adquiriram-na em outras localidades do Estado de Mato Grosso, as quais foram: São Luiz de Cáceres, Aquidauana, Bela Vista, Cuiabá, Guia Lopes e Guaicurus (Travassos, 1941a). Nessa terceira excursão, outros municípios cortados pela Estrada Noroeste do Brasil também foram percorridos, porém as visitas foram bastante breves, de cerca de um dia apenas, com exceção da região de Ilha Seca (SP). Aí a comissão científica permaneceu por oito dias, coletando vasto material biológico, porém sem registrar casos de malária.

A quarta excursão científica foi realizada entre os meses de agosto e setembro de 1940, época de forte seca na região. Foram observados quatro casos de malária importada em Salobra, isto é, de doentes recém-chegados ao local, única região onde foram feitas observações médicas nessa quarta excursão (Travassos, 1941b). As excursões subsequentes, em janeiro e novembro de 1941 e maio de 1942, não registraram nenhum caso da doença entre os habitantes de Salobra, única região em que a comissão científica permaneceu aprofundando seus estudos biológicos. Desse modo, Salobra foi considerada livre da malária autóctone desde 1939.

Os dados de malária compreendidos entre os anos de 1940 e 1984 para o Estado do Mato Grosso do Sul não estão disponibilizados para acesso na página virtual do Ministério da Saúde, nem encontrados nos arquivos da Secretaria de

Saúde local e nem se acham publicados em artigos científicos. Desse modo, não é possível conhecer os números da malária no Mato Grosso do Sul nesse período.

Investigações epidemiológicas dos casos de malária ocorridos no ano de 1985 em 26 unidades federativas foram realizadas pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) (Marques *et al.*, 1986). No Mato Grosso do Sul, registraram-se 1.395 casos. Deste número, 1.196 foram investigados, gerando os resultados a seguir: a grande maioria (91,5%) era de malária importada, sendo Mato Grosso do Sul o quarto estado que mais recebeu casos importados da Região Norte em 1985. Setenta e cinco (ou 6,3%) eram casos autóctones e 26 (2,2%) abrangiam casos introduzidos, induzidos ou recaídas. Os 75 casos de autoctonia foram registrados em diferentes municípios: Amambi, Aquidauana, São Gabriel do Oeste, Foz Ivinheima (atual Ivinhema), Dourados e Camapuã. Não houve nenhum caso notificado no município de Miranda. Os casos importados foram procedentes principalmente dos Estados de Rondônia (431 casos) e Mato Grosso (317) e do Paraguai (271).

Entre 1990 e 1996, foram registrados 3.515 casos de malária no Mato Grosso do Sul. Destes, 685 ocorreram na Bacia do Alto Paraguai (BAP), composta por 28 municípios, entre os quais podemos destacar, pelo número de habitantes e/ou vocação turística, Miranda, Bonito, Aquidauana, Anastácio e Corumbá (Matsumoto *et al.*, 1998) (Figura 1.5). A maior parte dos casos notificados a cada ano na BAP foi de malária importada, com exceção do ano de 1994, em que predominaram os casos de autoctonia, todos registrados no município de Bonito (Figura 1.6). A ocorrência de malária autóctone nessa região se deu também entre os anos de 1991 e 1993, e os municípios onde ocorreram tais casos foram Rochedo (1991), Pedro Gomes (1992) e Bonito (1993) (Matsumoto *et al.*, 1998).

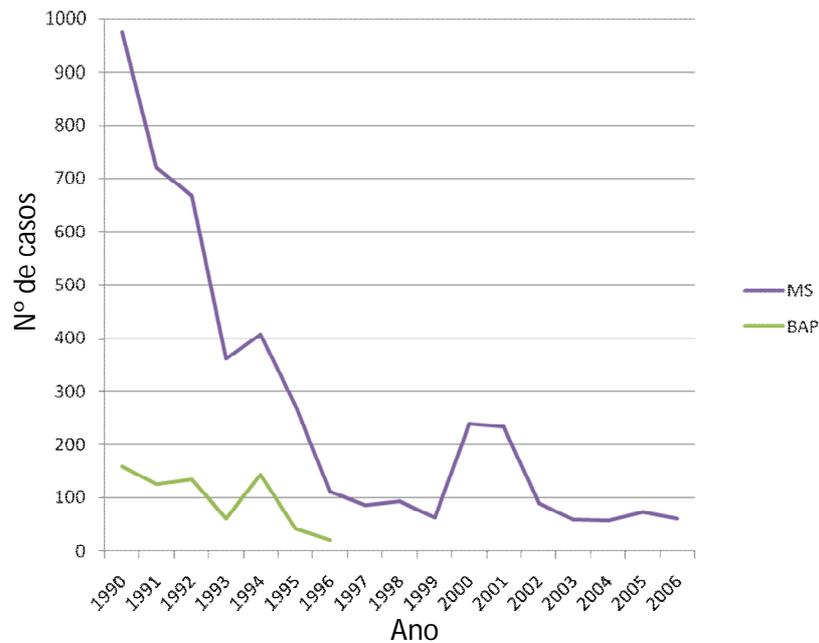


Figura 1.5. Casos notificados de malária na Bacia do Alto Paraguai (BAP) entre 1990 e 1996, e casos no Mato Grosso do Sul (MS) de 1990 a 2006. Fonte: Casos da BAP - Matsumoto *et al.*, 1998; casos do MS de 1990 a 1995: Braz & Tauil, 1999; casos do MS de 1996 a 2003: SIVEP-MALÁRIA - SVS/MS; casos do MS de 2004 a 2006: SINAN Web/SVS/MS.

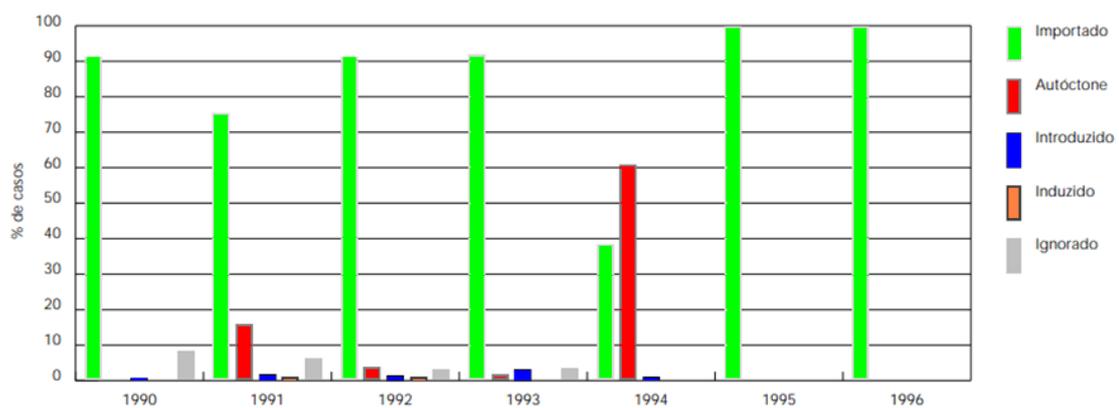


Figura 1.6. Contribuição percentual dos diferentes tipos de malária ocorridos anualmente na Bacia do Alto Paraguai, de 1990 a 1996. Adaptado de Matsumoto *et al.*, 1998.

A espécie de plasmódio predominante nas infecções detectadas na BAP, de 1990 a 1996, foi *P. vivax*, refletindo a situação epidemiológica do Estado do Mato Grosso do Sul, cuja maioria dos casos das suas demais áreas foi atribuída a essa espécie parasitária. Em todos esses sete anos, também foram notificados casos de malária por *P. falciparum* na BAP, em percentuais que variaram de 13,21% (1990) a 39,95% (1991) do total de casos registrados por ano. Infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* foram registradas nessa região nos anos de 1990, 1992 e 1993 (Matsumoto *et al.*, 1998).

A partir de 2002, o Mato Grosso do Sul começou a apresentar uma tendência geral de declínio no número de casos de malária e, atualmente, esse Estado é considerado não malarígeno, tendo registrado, desde 2003, apenas algumas dezenas de casos por ano (Figura 1.5). No município de Miranda, em particular, não existem registros de casos autóctones de malária desde 1985 até o presente; apenas em 2004 houve o registro de um caso de malária importada nesse município (Marques *et al.*, 1986; Matsumoto *et al.*, 1998; SINAN Web/SVS/MS).

1.6. Anofelinos vetores

A Subfamília Anophelinae, dentro da família Culicidae, é composta por três gêneros: *Chagasia* Cruz, 1906, *Bironella* Theobald, 1905, ambos sem importância epidemiológica conhecida, e *Anopheles* Meigen, 1818. Este último apresenta sete subgêneros, os quais são: *Anopheles* Meigen; *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & Harrison; *Cellia* Theobald; *Kerteszia* Theobald; *Lophopodomyia* Antunes; *Nyssorhynchus* Blanchard e *Stethomyia* Theobald. Entre esses, destacam-se os subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*, por apresentarem diversas espécies neotropicais vetoras de doenças, principalmente a malária, sendo que o primeiro inclui as espécies responsáveis pela transmissão da grande maioria dos casos de malária no Brasil, as quais são *Anopheles darlingi* Root, 1926, *Anopheles albicans* s.l. e *Anopheles aquasalis* Curry, 1932. Em áreas de malária residual nas Regiões Sul e Sudeste, têm sido responsáveis por alguns surtos, *Anopheles (Ker.) cruzii* Dyar & Knab, 1908 e *Anopheles (Ker.) bellator* Dyar & Knab, 1906 (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Sallum & Wilkerson, 1997).

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são facilmente distinguíveis a olho nu por sua postura em repouso e ao alimentar-se, que forma um ângulo ligeiramente agudo

com a superfície, o que facilita as coletas específicas desses mosquitos, distinguindo-os das espécies de *Chagasia* e dos demais culicídeos. São mosquitos adaptados ao ambiente silvestre, rural e peri-urbano, com hábitos em geral crepusculares e noturnos. Seus ovos apresentam flutuadores laterais únicos, e são postos isoladamente. As larvas se criam em água parada ou com pouca movimentação. Realizam as trocas gasosas com o ar atmosférico por meio de espiráculos respiratórios presentes no VIII segmento abdominal e, por isso, posicionam-se paralelamente à superfície da água.

As características do comportamento hematofágico (preferência pelo hospedeiro, local da alimentação e horário de maior atividade) das fêmeas adultas, bem como sua composição etária, são informações importantes na determinação do risco de transmissão da malária em uma região (Garret-Jones, 1964; Hiwat & Bretas, 2011). Em relação à composição etária, quanto mais longeva a população, ou quanto maior a proporção de fêmeas que já desovaram uma ou mais vezes, maior a probabilidade de haver fêmeas nas quais já se completou o ciclo esporogônico do plasmódio e, portanto, prontas a transmitir a malária. A composição etária de uma população pode variar dependendo da localidade, época do ano, período do dia e distância dos criadouros (Ulloa *et al.*, 1997; Hiwat & Bretas, 2011).

Atualmente, o subgênero *Nyssorhynchus* inclui 35 espécies formalmente descritas. Baseado em caracteres morfológicos, este subgênero foi dividido em três sessões: *Argyritarsis*, *Albimanus* e *Myzorhynchella* (Peyton *et al.*, 1992; Harbach, 2004), sendo que apenas nas duas primeiras estão as espécies transmissoras de malária (Galvão, 1941; Nagaki *et al.*, 2010). São conhecidos atualmente seis complexos de espécies crípticas entre os *Nyssorhynchus*, isto é, espécies morfológicamente indistinguíveis ou de difícil distinção, mas que podem apresentar comportamento e competência vetorial distintos: Complexo *Albitarsis* (Galvão & Damasceno, 1944; Rosa-Freitas *et al.*, 1990; Narang *et al.*, 1993; Wilkerson *et al.*, 1995a; Wilkerson *et al.*, 1995c), Complexo *Triannulatus* (Silva-do-Nascimento, 1995; Rosa-Freitas *et al.*, 1998), Complexo *Oswaldoi* (Faran, 1980; Marrelli *et al.*, 1999; Scarpassa & Conn, 2006), Complexo *Nuneztovari* (Conn *et al.*, 1993; Sierra *et al.*, 2004), Complexo *Benarrochi* (Ruiz *et al.*, 2005) e Complexo *Strodei* (Faran, 1980; Sallum *et al.*, 2010). Todos esses complexos possuem espécies ainda não totalmente caracterizadas, e algumas estão implicadas na transmissão de malária. Por isso é importante o reconhecimento, descrição e estudo da bionomia de tais espécies crípticas para o melhor entendimento da dinâmica de transmissão e da

epidemiologia da doença e para o controle vetorial direcionado e eficaz. Além de epidemiologicamente relevante, o conhecimento desses complexos de espécies permite uma estimativa mais acurada da real diversidade de anofelinos, cujo número atual de espécies está certamente subestimado.

1.7. Distribuição espacial, comportamento hematofágico, dinâmica temporal e alguns aspectos da morfologia das principais espécies do subgênero *Nyssorhynchus*

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 é o principal vetor da malária humana na Região Neotropical (Deane *et al.*, 1948; Deane, 1986; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Forattini, 2002; Sinka *et al.*, 2010). Trata-se de uma espécie polimórfica e que exibe considerável variabilidade fenotípica, genética e comportamental, existindo pelo menos seis grupos populacionais reconhecidos em distintas ecorregiões, embora não haja indícios de que *An. darlingi* seja um complexo de espécies (Rosa-Freitas, *et al.*, 1992, 1995; Freitas-Sibajev *et al.*, 1995; Manguin *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2010; Motoki *et al.*, 2012). Mosquitos desta espécie são adaptados aos ambientes silvestre e rural e periurbano com marcada ação antrópica (Deane, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Sinka *et al.*, 2010). Sua distribuição geográfica se estende do México aos territórios do Brasil e Argentina, com exceção dos países a seguir, onde, apesar das pesquisas realizadas, não se tem registro desta espécie: Uruguai no extremo sul, Chile no extremo oeste da América do Sul, e Nicarágua e Costa Rica na América Central (Forattini, 1962; Forattini, 2002; Manguin *et al.* 1996, 1999; Sinka *et al.*, 2010; Hiwat & Bretas, 2011) (Figura 1.7). Apesar da ampla distribuição, sua importância como espécie vetora de malária varia nas diferentes regiões (Hiwat & Bretas, 2011). No Brasil, *An. darlingi* é a espécie de maior capacidade vetorial, com alto grau de antropofilia na maior parte do território e suscetibilidade a diferentes espécies de plasmódios humanos, sendo portanto, o mais importante transmissor (Deane, 1986; Klein *et al.*, 1991b). Sua presença é registrada nas Regiões Amazônica, Centro-oeste e Sudeste, e nos Estados da Bahia e Maranhão. A alta sensibilidade de *An. darlingi* a umidades relativas baixas parece ser um fator que restringe a ocorrência desta espécie na maior parte do Nordeste brasileiro (Deane *et al.*, 1948; Forattini,

2002). Além disso, sua distribuição e principalmente abundância estão relacionadas com a presença dos grandes cursos ou corpos de água doce.

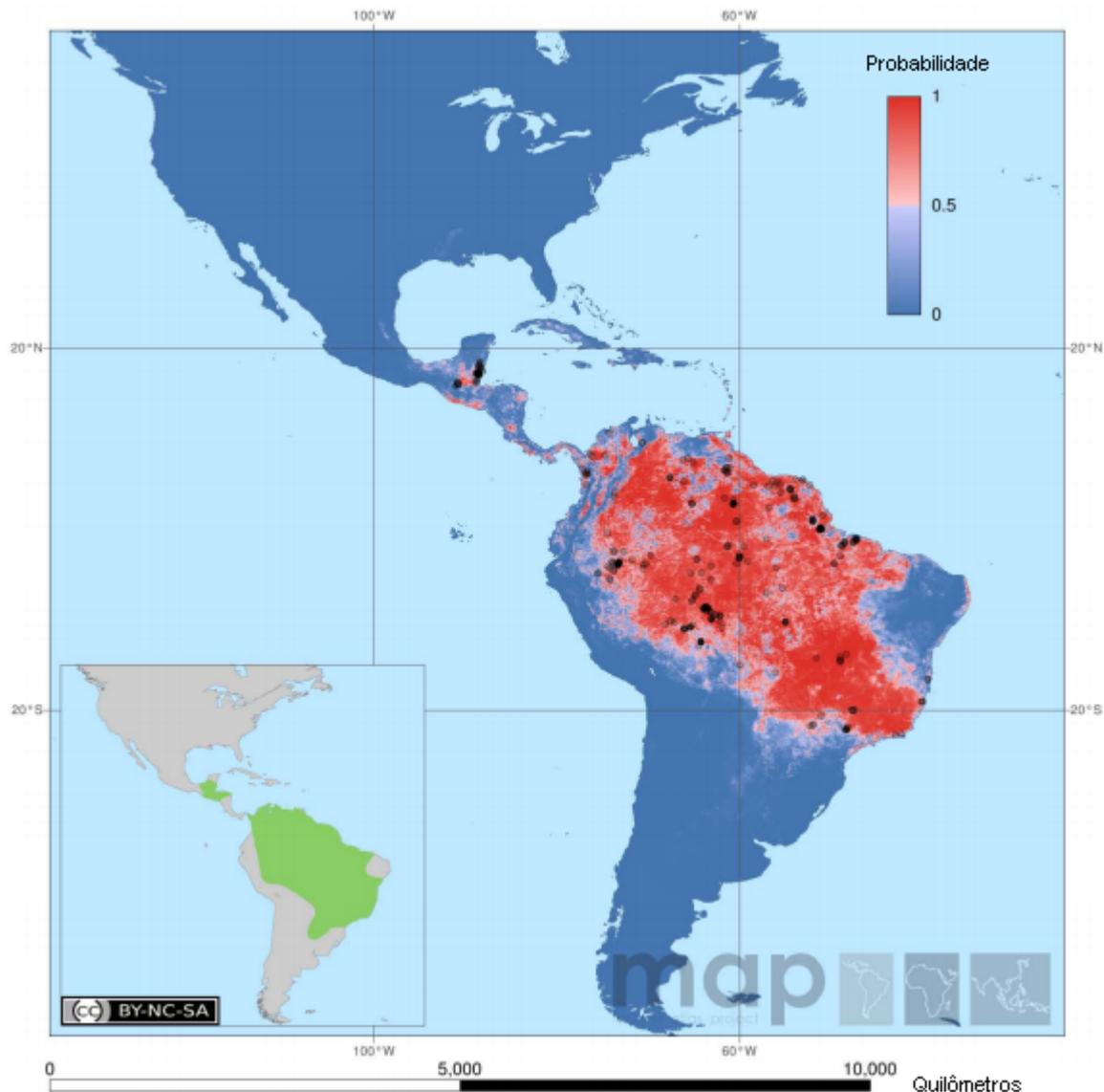


Figura 1.7. Mapa de distribuição preditiva de *An. darlingi*. Informações baseadas em dados híbridos (318 registros de ocorrência da espécie (pontos pretos) mais 500 pseudo-presenças opinadas por um quadro de especialistas). Adaptado de Sinka *et al.*, 2010.

Os criadouros empregados por *An. darlingi* são geralmente grandes corpos de água límpida e profunda, como remansos de rios e lagos e igarapés, ensolarados ou parcialmente sombreados (Giglioli, 1938; Deane *et al.*, 1948; Rachou, 1958;

Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). As larvas, em geral, ocupam as margens, onde o fluxo de água é mais lento, e normalmente estão associadas à vegetação (Deane *et al.*, 1948; Linthicum, 1988; Manguin *et al.*, 1996). Entretanto, já foram encontradas larvas desta espécie em outros tipos de criadouros, tais como pequenas poças d'água, valas, poços, canais de irrigação e tanques de cimento (Deane *et al.*, 1948; Rachou, 1958; Tadei *et al.*, 1988; Sinka *et al.*, 2010), o que indica uma adaptação ao ambiente antrópico e a versatilidade dessa espécie para adaptar-se a nichos ecológicos distintos (Brochero *et al.*, 2005). De fato, alguns estudos têm demonstrado que alterações na estrutura ecológica original, como o desmatamento, o represamento de partes da rede hidroviária e a formação de lagos para piscicultura têm propiciado a formação de novos tipos de criadouros para esse mosquito (Castro *et al.*, 2006; Vittor *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010a).

Do ponto de vista do comportamento hematofágico, *An. darlingi* é reconhecido como o anofelino mais antropofílico, apresentando esse comportamento na grande maioria das regiões onde foi estudado. Entretanto, é também uma das espécies que mais apresenta variabilidade trófica. O hábito predominantemente antropofílico é uma das características que torna o *An. darlingi* um vetor eficiente da malária humana. Em relação ao ambiente onde realizam o repasto sanguíneo, as populações dessa espécie podem apresentar comportamento exo- ou endofágico (Galvão *et al.*, 1942; Deane *et al.*, 1948; Bustamante, 1951; Bustamante *et al.*, 1952; Charlwood, 1996; Sinka *et al.*, 2010). O fato é que *An. darlingi* é o anofelino brasileiro mais encontrado picando humanos no ambiente modificado do peridomicílio e intradomicílio (Deane *et al.*, 1948; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989). Antes e após a realização do repasto, *An. darlingi* pode apresentar comportamento endofílico, fato este observado em diversas regiões da Amazônia (Galvão *et al.*, 1937; Deane *et al.*, 1948; Deane, 1989). Esse hábito foi, por muitos anos, a base para o controle vetorial na Amazônia através da borrifação das paredes internas das casas com inseticidas residuais. Entretanto, verificou-se também certo grau de exofilia em populações dessa espécie de outros lugares, como por exemplo, no Mato Grosso (Charlwood, 1980; Zeilhofer *et al.*, 2007), e no município de Acrelândia, no Acre (Moutinho *et al.*, 2011).

Assim como o local do repasto, o ciclo de picada (ou variação horária da hematofagia) de *An. darlingi* varia entre as diferentes localidades, e parece estar relacionado ao comportamento do hospedeiro em algumas regiões (Charlwood, 1996; Moreno *et al.*, 2007). Ou seja, o horário de maior atividade hematofágica pode

coincidir com o período em que os hospedeiros estão mais acessíveis. Além deste e das características endógenas da própria espécie, outros fatores que poderiam influenciar o padrão de picada são a idade do mosquito e a distância do local de oviposição (Charlwood, 1996). Em geral, tem sido observado que *An. darlingi* apresenta pico de atividade no crepúsculo vespertino (Pajot *et al.*, 1977; Charlwood & Hayes, 1978; Charlwood & Alecrim, 1989), próximo da meia-noite (Deane *et al.*, 1948; Charlwood & Hayes, 1978; Hudson, 1984; Rosa-Freitas *et al.*, 1992) e ao amanhecer (Tadei *et al.*, 1988, Klein & Lima, 1990; Tadei *et al.*, 1998).

A dinâmica sazonal de *An. darlingi* apresenta grandes diferenças dependendo do local de estudo e é altamente influenciada pelo regime de chuvas e de cheias dos rios da região (Hiwat & Bretas, 2011). É sabido que o aumento no volume de chuvas propicia a formação de novos criadouros e como consequência tem-se o aumento da densidade populacional de adultos, o qual é um parâmetro importante no cálculo de capacidade vetorial e estreitamente relacionado ao risco ou incidência de malária em uma região (Giglioli, 1938; Moreno *et al.*, 2007; Galardo *et al.*, 2009). De maneira geral, é na estação chuvosa, ou logo após, que o *An. darlingi* apresenta os maiores picos em sua densidade (Forattini, 1962; Elliott, 1968; Tadei *et al.*, 1998; León *et al.*, 2003). Por outro lado, uma alta precipitação atmosférica faz aumentar o fluxo de água em rios e lagos, prejudicando o desenvolvimento das larvas e arrastando pupas, que requerem micro-habitats de águas calmas (Pajot *et al.*, 1977; Charlwood, 1980; Forattini, 1987). Como resultado, tem-se uma diminuição no número de indivíduos adultos. Diferentemente das demais espécies de anofelinos, *An. darlingi* é a única que, mesmo em baixas densidades, é capaz de manter relativamente alto o nível de transmissão de malária em uma área (Deane *et al.*, 1948). Os ciclos sazonais, além de repercutirem na densidade, influenciam também a distribuição local desta espécie (Roberts *et al.*, 2002). Enquanto no período mais seco, se observa uma distribuição nas proximidades de criadouros permanentes, na estação chuvosa a distribuição dessa espécie tende a se expandir.

Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis Lynch-Arribalzága, 1878 há muito tem sido considerado um complexo de espécies, baseado nos distintos aspectos comportamentais que apresentam populações de diferentes regiões (Galvão & Damasceno, 1944; Rosa-Freitas & Deane, 1989; Rosa-Freitas *et al.*, 1990; Wilkerson *et al.*, 1995a). *An. albitarsis* s.l. apresenta ampla distribuição geográfica na região neotropical, indo do norte da Guatemala ao norte da Argentina, sendo registrado em praticamente todo o território brasileiro (Figura 1.8). Sua relação com

a transmissão da malária depende da população analisada e da região geográfica. Estudos sobre infecção natural por plasmódios em anofelinos, realizados no Rio de Janeiro, na Bahia e em São Paulo, colocaram essa espécie como possível transmissora da malária humana, tendo sido detectados esporozoítas em suas glândulas salivares e oocistos no estômago (Kumm, 1932; Schiavi, 1945). Foi ainda considerado importante vetor em duas localidades na Colômbia, onde foi encontrado naturalmente infectado. Mais recentemente, estudos empregando imunoensaios têm confirmado sua suscetibilidade a plasmódios humanos (Arruda *et al.*, 1986; Póvoa *et al.*, 2001; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002). Outros aspectos comportamentais do *An. albitarsis s.l.* implicados na capacidade vetorial têm demonstrado grande variabilidade, dependendo da população estudada e da espécie do complexo envolvida. Considerada espécie exofílica e zoofílica (Deane *et al.*, 1948; Deane *et al.*, 1949), já foi também encontrada dentro das casas picando o homem com avidez (Galvão & Damasceno, 1944; Schiavi, 1945).

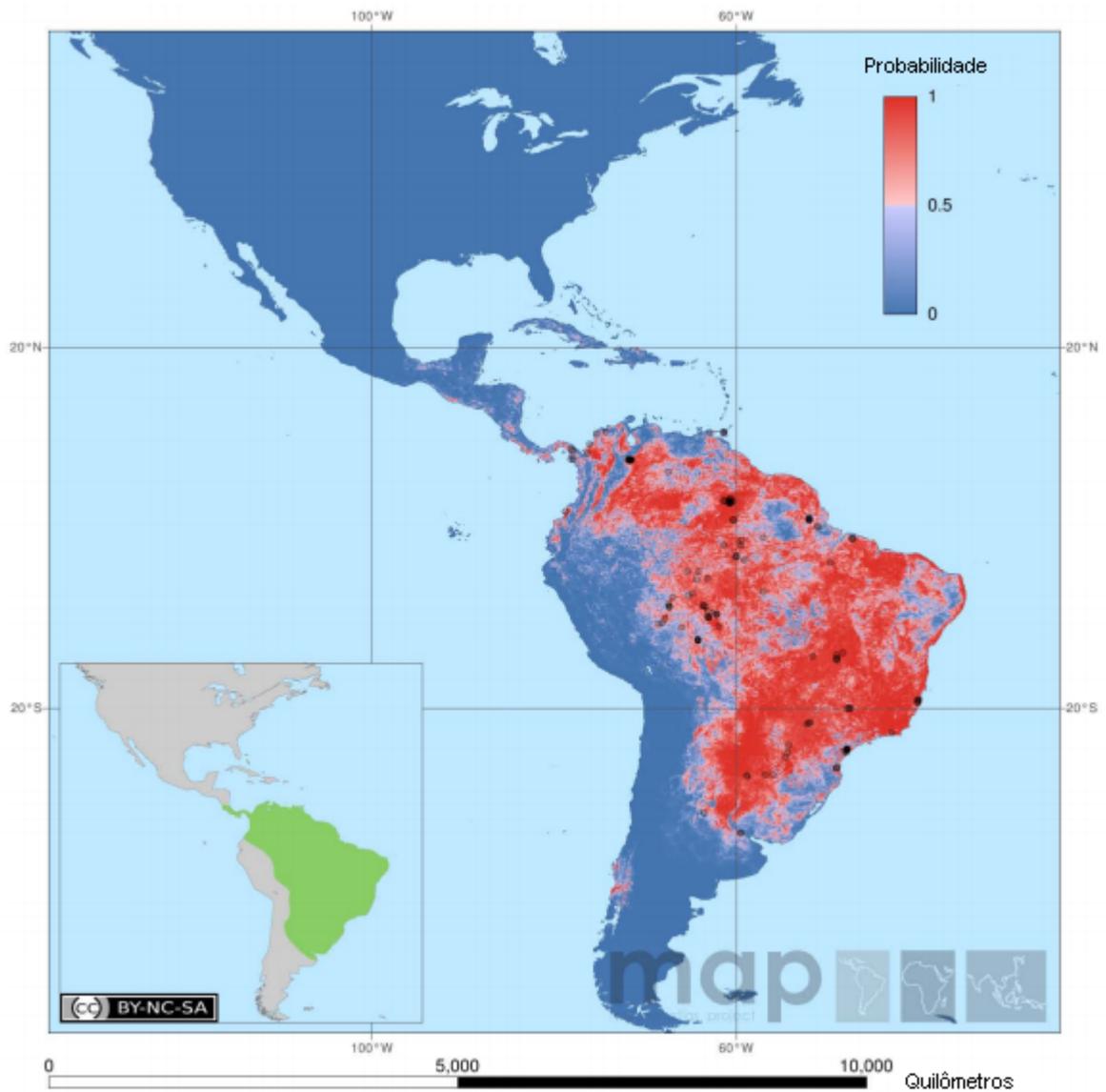


Figura 1.8. Mapa de distribuição preditiva de *An. albitarsis* s.l. Informações baseadas em dados híbridos (138 registros de ocorrência da espécie (pontos pretos) mais 500 pseudo-presenças opinadas por um quadro de especialistas). Adaptado de Sinka *et al.*, 2010.

Atualmente, o Complexo Albitarsis inclui oito espécies, das quais cinco formalmente descritas (*Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga, 1878; *Anopheles marajoara* Galvão & Damasceno, 1942; *Anopheles deaneorum* Rosa-Freitas, 1989; *Anopheles janconnae* Wilkerson & Sallum, 2009 e *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson & Motoki, 2009) e três ainda não totalmente caracterizadas (*Anopheles albitarsis* F, G e I*) (Motoki *et al.*, 2009; Ruiz-Lopez *et al.*, 2012). Das espécies desse Complexo, ao menos seis ocorrem no Brasil: *An. albitarsis* s.s., *An. deaneorum*, *An. marajoara*, *An. janconnae*, *An. oryzalimnetes* e *An. albitarsis* F (Motoki *et al.*, 2009; Ruiz-Lopez *et al.*, 2012). Dados sobre a bionomia e distribuição dessas espécies ainda são bastante escassos, devido à dificuldade de identificação e ao recente *status* específico de boa parte dos membros desse complexo.

A dinâmica sazonal das espécies do Complexo Albitarsis nos diferentes locais tem sido pouco estudada. Em geral, observa-se maior densidade desse mosquito na estação chuvosa e, diferente das outras espécies de anofelinos, *An. albitarsis* s.l. é menos suscetível ao período de estiagem, o que permite observá-lo com alguma frequência também nas demais épocas do ano (Deane *et al.*, 1948; Forattini *et al.*, 1996; Guimarães *et al.*, 1997). O incremento no número desses mosquitos tem sido relacionado não só ao período sazonal, como também ao desmatamento para a agricultura, que possibilita novos *habitats* larvares para essas populações (Conn *et al.*, 2002).

An. deaneorum, descrito a partir de espécimes coletados em Guajará-Mirim, Rondônia, distribui-se na porção noroeste do Brasil, tendo sido encontrado em Costa Marques e Ariquemes (RO) e no Rio Branco (AC). É distinguido morfológicamente de outras espécies do Complexo Albitarsis pelas características do adulto e da larva (Rosa-Freitas, 1989; Rosa-Freitas & Deane, 1989). Infecções experimentais demonstraram que *An. deaneorum* pode ser suscetível tanto ao *P. vivax* quanto ao *P. falciparum*, desenvolvendo oocistos no estômago, porém com poucos esporozoítas em suas glândulas salivares (Klein *et al.*, 1991a; Klein *et al.*, 1991b). Outros autores, utilizando o método ELISA, encontraram essa espécie naturalmente infectada, apontando-a como vetor potencial em região ribeirinha no Acre (Branquinho *et al.*, 1993). De hábitos preferencialmente crepusculares e exofílicos, *An. deaneorum* é também encontrado picando o homem dentro das habitações, o que demonstra seu envolvimento como vetor potencial da malária

* *An. albitarsis* H representa uma linhagem. Mais estudos são necessários para a confirmação do real *status* taxonômico deste membro do complexo (Ruiz-Lopes *et al.*, 2012).

humana. Seus criadouros são semelhantes aos das outras espécies do Complexo Albitarsis, em alagados e nas margens dos rios, com presença de vegetação e parcialmente sombreados.

Há autores que reconhecem *An. marajoara* como vetor primário da malária humana mais importante que o *An. darlingi*, na dinâmica da transmissão da doença no Amapá (Póvoa *et al.*, 2000; Póvoa *et al.*, 2001; Conn *et al.*, 2002; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002). Sua área de distribuição geográfica vai da Costa Rica à Bolívia, incluindo Trinidad, e está presente em grande parte da Bacia Amazônica, no Mato Grosso e em São Paulo.

Anopheles janconnae, descrito a partir de espécimes coletados em Boa Vista (RR), foi inicialmente identificado através de análise molecular como *An. albitarsis E*. Sua área de dispersão até agora conhecida abrange a região noroeste brasileira e a Venezuela. Foi encontrado naturalmente infectado por plasmódios em três localidades no estado de Roraima, onde também apresenta alta densidade e hábito antropofílico, sendo considerado vetor primário da malária humana nessas regiões (Lehr *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2006).

Anopheles oryzalimnetes, espécie encontrada no Paraguai e de ampla distribuição no Brasil, já foi registrada nos Estados do Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Bahia e Ceará. Suas formas imaturas foram coletadas em áreas de plantação de arroz, criadouros os quais parece preferir. Foi identificado inicialmente, com base em análise molecular (RAPD-PCR, *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* e gene *white*), como *An. albitarsis A* (Kakitani & Forattini, 2000) e *An. albitarsis B* (Wilkerson *et al.*, 1995a). Foi encontrado em simpatria com *An. albitarsis s.s.*, no Vale do Ribeira (SP) e com *An. deaneorum* e *An. albitarsis s.s.* no Paraguai. Pouco se sabe sobre sua biologia e envolvimento com a transmissão da malária.

O Complexo Triannulatus compreende três espécies: *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922), *Anopheles halophylus* Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002 e *Anopheles triannulatus C*, esta última vem sendo atualmente caracterizada. Pouco se sabe sobre a distribuição geográfica de cada uma dessas espécies, no entanto provavelmente *An. triannulatus s.s.* é a espécie mais difundida (Deane *et al.*, 1948; Faran, 1980; Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002). Considerando todo o complexo, já se observou *Anopheles triannulatus s.l.* a oeste da cordilheira dos Andes, nos territórios do Peru até a Nicarágua e na parte leste da cordilheira, do norte da América do Sul até o Nordeste da Argentina

(Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002) (Figura 1.9). No Brasil, *An. triannulatus s.l.* é amplamente distribuído no Nordeste e na Amazônia (Deane *et al.*, 1948) e observou-se a ocorrência das três espécies em simpatria em Salobra, no oeste do Mato Grosso do Sul (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007).



Figura 1.9. Mapa de distribuição do *An. triannulatus s.l.* Em verde, os países onde este complexo já foi registrado.

Fonte: Systematic Catalog of Culicidae

Anopheles triannulatus s.l. utiliza como criadouros grandes poças d'água, lagos e corixos (Deane *et al.*, 1948; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Raramente foram encontradas larvas desta espécie em criadouros artificiais, como represas, tanques e açudes (Deane *et al.*, 1948; Berti *et al.*, 1993). Tais criadouros são bem iluminados, embora com presença maciça de vegetação flutuante (Deane *et al.*, 1948; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). *Anopheles halophylus*, em particular, se desenvolve em criadouros com alta salinidade (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002), enquanto as outras espécies desse complexo têm preferência por água doce.

Quanto ao comportamento de hematofagia, as três espécies podem picar o homem, mas possuem hábito marcadamente zoofágico, alimentando-se principalmente em cavalos e bovídeos no ambiente extradomiciliar, onde também é normalmente encontrado após o repasto (Deane *et al.*, 1948; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007). O ciclo de picadas de *An. triannulatus* s.l. foi pouco estudado de maneira sistemática, porém observa-se que esse mosquito exerce a hematofagia principalmente no horário crepuscular. *Anopheles halophylus* inicia esta atividade um pouco antes do crepúsculo vespertino, diminuindo ou mesmo cessando alguns minutos após o término deste (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002). Já *An. triannulatus* s.s. tem seu pico de atividade logo após o horário crepuscular, continuando em menor número durante a noite (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007).

A variação sazonal da densidade populacional das três espécies foi estudada pelo período de um ano na localidade de Salobra, oeste do Mato Grosso do Sul (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007). De maneira geral, verificou-se que todas apresentam menor densidade durante o período chuvoso. Em relação ao seu papel como espécie transmissora de plasmódios, *An. triannulatus* s.s. já foi encontrado naturalmente infectado por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Arruda *et al.*, 1986; Tadei & Dutary Thatcher, 2000; Póvoa *et al.*, 2001), podendo atuar como vetor secundário, principalmente quando em altas densidades (Deane *et al.*, 1948; Forattini, 2002). Quanto às outras duas espécies, ainda não existem evidências de que sejam vetores de malária (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002).

O Complexo Oswaldoi (Faran, 1980; Marrelli *et al.*, 1999; Harbach, 2004) parece compreender uma dezena de espécies e sua formação foi sugerida após observações sobre diferenças morfológicas, comportamentais e implicações na capacidade de transmissão de plasmódios entre elas (Causey *et al.*, 1946; Faran, 1980; Arruda *et al.*, 1986; Klein & Lima, 1990; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Branquinho *et al.*, 1996). Estudos moleculares utilizando a análise de sequências de bases da região *ITS2* do DNA ribossômico de populações do Brasil, Venezuela e Peru identificaram pelo menos quatro formas distintas (Marrelli *et al.*, 1999). Entre as espécies desse Complexo, podemos destacar, por seu potencial como vetor de plasmódios, *An. konderi* Galvão & Damasceno, 1942 e *An. galvaoi* Causey, Deane & Deane, 1943, além do *An.*

aquasalis Curry, 1932, vetor da malária na região litorânea brasileira (Rezende *et al.*, 2009).

Anopheles oswaldoi s.l. apresenta comportamento hematofágico variado e tem sido considerado vetor potencial da malária em algumas localidades da Amazônia. *An. oswaldoi* s.l. tem ampla distribuição na América do Sul, estendendo-se dos Andes à Argentina, tendo sido encontrado na Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Paraguai, Venezuela, Peru e Brasil (Deane *et al.*, 1948; Faran, 1980; Faran & Linthicum, 1981; Arruda *et al.*, 1986; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Natal *et al.*, 1992; Forattini *et al.*, 1993; Scarpassa, 2005; Póvoa *et al.*, 2006) e ainda em países da América Central, como Costa Rica, Panamá e Trinidad e Tobago (Faran, 1980).

O Complexo Nuneztovari compreende atualmente três espécies: *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940 (citotipos B/C), *Anopheles goeldii* Rozeboom & Gabaldon, 1941 e *Anopheles nuneztovari* A (Conn *et al.*, 1993; Sierra *et al.*, 2004). A distribuição conhecida do *An. nuneztovari* s.l. engloba os seguintes países: Brasil, Peru, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (Sinka *et al.*, 2010). Na Amazônia brasileira, ocorrem simpatricamente duas espécies do Complexo Nuneztovari, sendo uma delas o *An. nuneztovari* A (Fritz *et al.*, 1994; Bergo *et al.*, 2007). Na Colômbia e Venezuela registra-se a ocorrência dos citotipos B e C, países onde o *An. nuneztovari* apresenta importância epidemiológica, atuando como vetor da malária (Rubio-Palis & Curtis, 1992). No Brasil, *An. nuneztovari* s.l. já foi encontrado naturalmente infectado com esporozoítas em suas glândulas salivares, podendo atuar como vetor secundário na Amazônia (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Quintero *et al.*, 1996; Galardo *et al.*, 2009). Entretanto, seu comportamento torna pouco frequente o contato com homem, já que esse anofelino em geral se alimenta em outros animais e possui hábitos exofágicos e exofílicos (Rubio-Palis & Curtis, 1992; Tadei & Dutary Thatcher, 2000; Zimmerman *et al.*, 2006).

1.8. Fauna anofélica conhecida no Mato Grosso do Sul

No Estado do Mato Grosso do Sul, já foram registradas 22 espécies de *Anopheles*, sendo 15 do subgênero *Nyssorhynchus*, seis do subgênero *Anopheles* e uma do subgênero *Stethomyia*. Na região de Salobra, em particular, já foram

registradas as espécies *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi*, *An. halophylus*, *An. mattogrossensis*, *An. rondoni*, *An. triannulatus C* e *An. triannulatus s.s.* (Tabela 1.3).

Embora o Mato Grosso do Sul apresente uma grande extensão territorial, pouco se conhece sobre sua fauna anofélica. Apenas oito dos 78 municípios possuem alguma informação sobre os anofelinos presentes em seus limites, não obstante a importância do estudo desses mosquitos para se avaliar a receptividade e, portanto, o risco de reintrodução de malária de uma região (Figura 1.10).

Tabela 1.3. Espécies de *Anopheles* registradas no Estado do Mato Grosso do Sul

Subgênero / Espécie	Municípios e localidades no MS	Referência(s)
Subgênero		
<i>Nyssorhynchus</i>		
<i>An. albitarsis s.l.</i>	Bataguassu, Cachoeirinha (Miranda), Maracaju, Pantanal de Nhecolândia, Salobra	Travassos & Teixeira de Freitas, 1941; Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007; Pauvolid-Corrêa <i>et al.</i> , 2010
<i>An. argyritarsis</i> Robineau- Desvoidy, 1827	Dourados	Xavier & Mattos, 1970
<i>An. braziliensis</i> (Chagas, 1907)	Bataguassu	Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. darlingi</i>	Bataguassu, Maracaju, Salobra	Travassos & Teixeira de Freitas, 1941; Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. deaneorum</i>	Bataguassu, Santa Rita do Pardo	Gomes <i>et al.</i> , 2007; Neves, 2009
<i>An. evansae</i> (= <i>noroestensis</i>) (Brèthes, 1926)	Bataguassu, Dourados, Maracaju	Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. galvaoi</i> Causey, Deane & Deane, 1943	Bataguassu	Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. halophylus</i>	Salobra	Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2002
<i>An. lutzii</i> Cruz, 1901	Campo Grande, Dourados, Maracaju	Xavier & Mattos, 1970

Continua

Tabela 1.3 (Continuação). Espécies de *Anopheles* registradas no Estado do Mato Grosso do Sul

Subgênero / Espécie	Municípios e localidades no MS	Referência(s)
Subgênero <i>Nyssorhynchus</i>		
<i>An. oswaldoi</i> (Peryassú, 1922)	Bataguassu, Dourados, Maracaju, Três Lagoas	Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. rondoni</i> (Neiva & Pinto, 1922)	Bataguassu, Ladário, Pantanal de Nhecolândia, Salobra	Neiva & Pinto, 1922; Travassos & Teixeira de Freitas, 1943; Gomes <i>et al.</i> , 2007; Pauvolid-Corrêa <i>et al.</i> , 2010
<i>An. strodei</i> Root, 1926	Bataguassu, Dourados, Maracaju	Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. triannulatus</i> C	Salobra	Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007
<i>An. triannulatus</i> s.l.	Bataguassu; Campo Grande, Maracaju, Pantanal de Nhecolândia, Salobra	Travassos & Teixeira de Freitas, 1941; Xavier & Mattos, 1970; Gomes <i>et al.</i> , 2007; Pauvolid-Corrêa <i>et al.</i> , 2010
<i>An. triannulatus</i> s.s.	Salobra , Santa Rita do Pardo	Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007; Neves, 2009
Subgênero <i>Anopheles</i>		
<i>An. fluminensis</i> Root, 1927	Dourados, Maracaju	Xavier & Mattos, 1970
<i>An. intermedius</i> (Peryassú, 1908)	Maracaju	Xavier & Mattos, 1970

Continua

Tabela 1.3 (Continuação). Espécies de *Anopheles* registradas no Estado do Mato Grosso do Sul

Subgênero / Espécie	Municípios e localidades no MS	Referência(s)
Subgênero <i>Anopheles</i>		
<i>An. mattogrossensis</i> Lutz & Neiva, 1911	Salobra	Oliveira, 1942
<i>An. mediopunctatus</i> (Lutz, 1903)	Maracaju	Xavier & Mattos, 1970
<i>An. peryassui</i> Dyar & Knab, 1908	Bataguassu	Gomes <i>et al.</i> , 2007
<i>An. tibiamaculatus</i> (Neiva, 1906)	Maracaju	Xavier & Mattos, 1970
Subgênero <i>Stethomyia</i>		
<i>An. kompi</i> Edwards, 1930	Maracaju	Xavier & Mattos, 1970

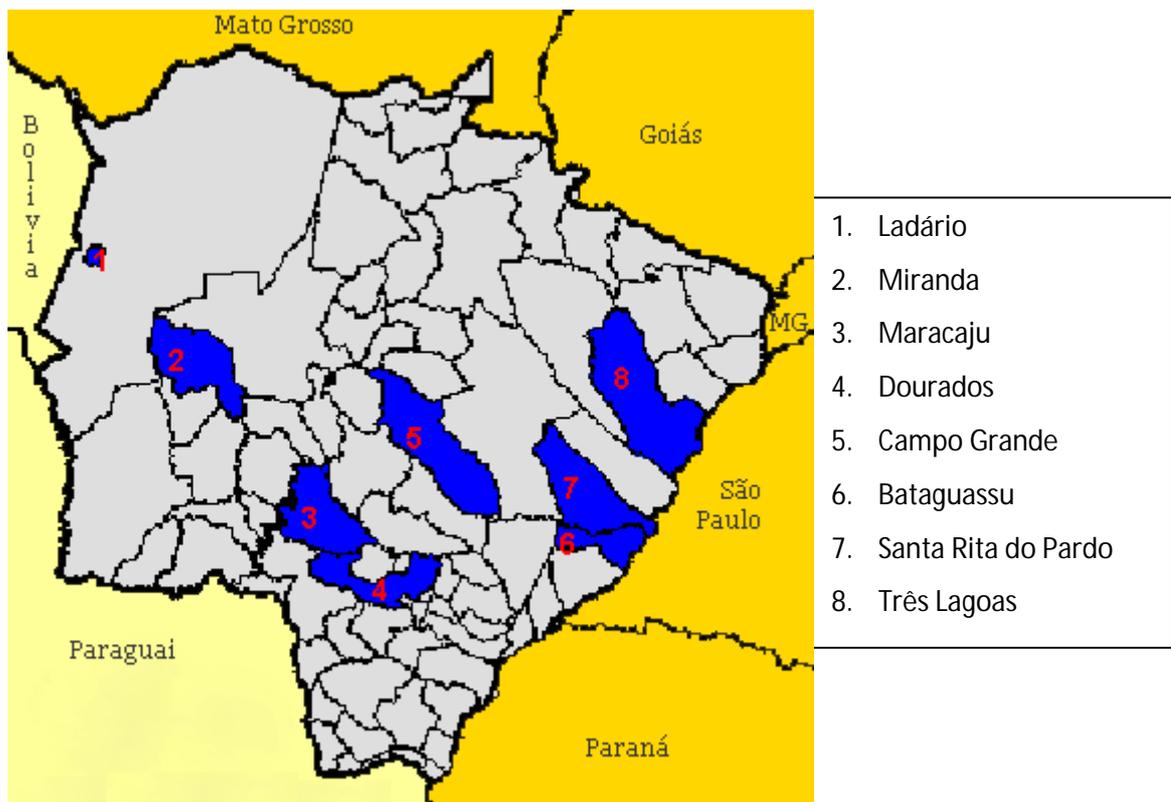


Figura 1.10. Municípios do Mato Grosso do Sul que conhecem parte de sua fauna anofélica.

Fonte: <http://www.mochileiro.tur.br/tres-lagoas.htm> (com modificações).

1.9. Justificativa

Verifica-se, pelas informações acima, que ainda são escassos os trabalhos voltados para a fauna de anofelinos no Mato Grosso do Sul, situação semelhante ao que se refere ao Brasil Central. Nenhum estudo sistemático sobre a dinâmica sazonal das espécies de *Anopheles* do Pantanal do Rio Miranda foi realizado. Considerando a peculiaridade dessa região do Pantanal, seja em relação às características geográficas seja de ecologia humana, torna-se importante a realização de estudo sobre a diversidade e ecologia de mosquitos vetores, em especial dos anofelinos (Cunha & Atanaka-Santos, 2011).

Dentro do Pantanal do Rio Miranda, a localidade de Salobra se mostra como um local de grande interesse para estudos da fauna anofélica e investigações quanto à receptividade e à vulnerabilidade quanto à malária, uma vez que ali confluem rios com águas de distintas características (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007). As características da água dos rios que formam os

criadouros por alagamento das margens são determinantes na escolha das espécies de mosquitos no momento da desova (Cerqueira, 1961; Forattini, 1962; Faran, 1980; Consolim & Fagundes, 1981; Lopes & Lozovei, 1995; Ribeiro, 2000). Essa diversidade de águas com diferentes características físico-químicas pode ter forçado a segregação de algumas espécies e favorecido a ocorrência de espécies crípticas de anofelinos em simpatria (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007).

O local está situado no eixo rodo-ferroviário leste-oeste mais importante no estado do Mato Grosso do Sul, que conecta a Bolívia, o Paraguai e áreas malarígenas do Brasil a este estado. A presença de vetores potenciais e primários da malária e a circulação de indivíduos de áreas endêmicas de malária representam riscos de reinstalação da transmissão da doença, outrora muito prevalente (Travassos & Teixeira de Freitas, 1941).

Considerando-se ainda que a distribuição e a densidade das espécies de *Anopheles* são influenciadas pelo regime hidrológico e pelos ciclos sazonais (Hiwat & Bretas, 2011), e que condições ambientais, como a temperatura, interferem na atividade desses mosquitos, identificar corretamente as espécies que habitam uma região e conhecer o seu comportamento e sua dinâmica sazonal torna-se útil para a determinação do risco de transmissão de malária e para o controle eficaz desses mosquitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a composição da fauna de anofelinos, alguns aspectos do comportamento hematofágico e da dinâmica sazonal das espécies vetoras de malária mais abundantes em Salobra, Pantanal do Mato Grosso do Sul.

2.2. Objetivos específicos

Estudar a diversidade de espécies de *Anopheles* de Salobra.

Avaliar a influência de alguns fatores abióticos sobre a variação da frequência de picadas das espécies de anofelinos mais abundantes na região.

Avaliar o comportamento hematofágico quanto ao horário, hospedeiro e local, e a composição etária das espécies de *Anopheles* mais abundantes.

Avaliar o risco de reintrodução da malária na região de Salobra e no Pantanal do Rio Miranda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Características do local do estudo

O trabalho foi realizado na localidade de Salobra (20°12'40" S, 56°29'30" O), situada às margens do Rio Miranda, no município de Miranda, porção oeste do Mato Grosso do Sul (Figura 3.1). Esse Estado, localizado no Centro-Oeste brasileiro, possui população de 2.449.024 habitantes (6,86 hab./km²). O município de Miranda dista cerca de 200 km de Campo Grande, capital do Mato Grosso do Sul (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010). Esse Estado faz fronteira com a Bolívia e o Paraguai e divisa com os Estados do Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Figura 3.2). Segundo o IBGE, o Índice de Eficácia Migratória* do Mato Grosso do Sul em 2009 foi de 0,0712, o que significa a ocorrência de rotatividade migratória. As principais fontes econômicas do Estado são a agricultura e pecuária, embora a vocação turística das cidades localizadas no Complexo do Pantanal seja também grande geradora de renda para o Mato Grosso do Sul. Tais atividades turísticas proporcionam a circulação constante de pessoas entre esse e outros Estados brasileiros e países, por via terrestre e, principalmente, por via aérea (Tabela 3.1). Em 2010, 68.140 turistas estrangeiros chegaram ao Brasil tendo como "porta de entrada" o Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDTUR/MS, 2011). Desse número, 65.597 foram provenientes de países da América do Sul, principalmente Bolívia e Paraguai (FUNDTUR/MS, 2011).

* O Índice de Eficácia Migratória resulta da razão entre o saldo migratório (Nº de Imigrantes – Nº de Emigrantes) e o número total de imigrantes e emigrantes $(I - E / I + E)$. O Índice de Eficácia Migratória varia de -1 a 1. Valores próximos de 1 indicam forte absorção de imigrantes e valores próximos de -1 indicam forte evasão populacional. Valores próximos a zero indicam rotatividade migratória.

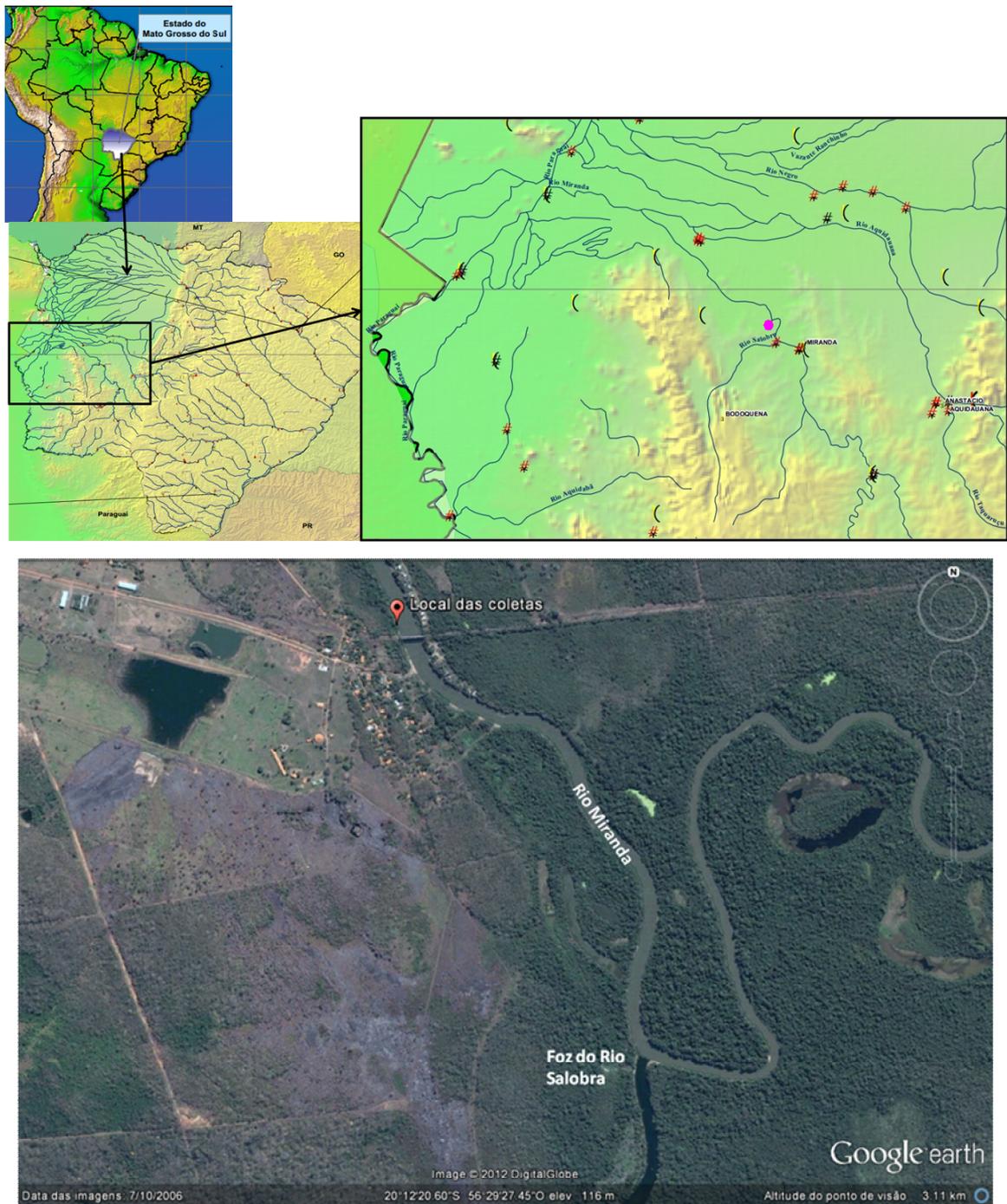


Figura 3.1. Mapa com a localização de Salobra (ponto rosa no mapa) no estado do Mato Grosso do Sul e fotografia aérea da região. Na fotografia aérea, durante o período de seca, observa-se parte do Rio Miranda e a foz do Rio Salobra, e o local onde foram realizadas as coletas. Fontes: mapa – <http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx> (com modificações); fotografia – Google Earth.

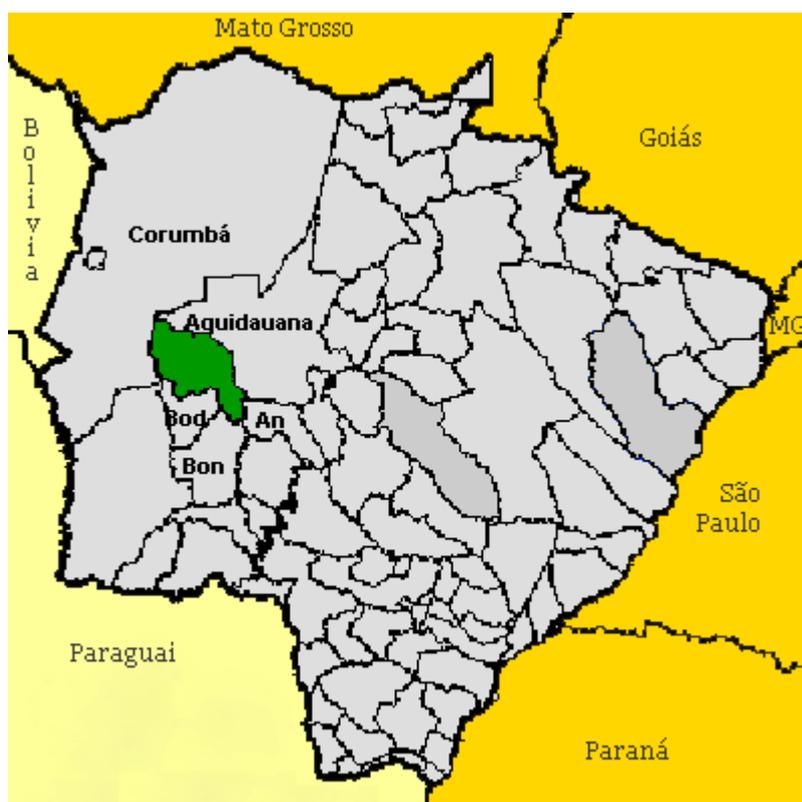


Figura 3.2. Mapa político do Mato Grosso do Sul, com destaque para o município de Miranda (em verde) e seus municípios limítrofes. An – Anastácio; Bod – Bodoquena; Bon – Bonito.

Fonte: <http://www.mochileiro.tur.br/tres-lagoas.htm> (com modificações).

Tabela 3.1. Fluxo de passageiros, por via aérea e terrestre, no Mato Grosso do Sul, de 2007 a 2010

Tipo de Transporte	Ano			
	2007	2008	2009	2010
Rodoviário interestadual	701.161	909.515	1.018.768	989.676
Rodoviário internacional	76.271	109.176	136.217	108.952
Aéreo nacional e internacional	1.523.340	1.757.074	2.087.778	2.607.521

Fonte dos dados: Agência Nacional de Transportes Terrestres – ANTT; Agência Nacional de Aviação Civil – ANAC; Ministério do Turismo – MTUR e Empresa Brasileira de Infraestrutura Aeroportuária – INFRAERO *in* FUNDTUR/MS, 2011.

O Mato Grosso do Sul está dividido em nove regiões geoambientais de planejamento: Região de Campo Grande, da Grande Dourados, do Bolsão, Norte, do Pantanal, Sudoeste, Leste, Cone-Sul e Sul-Fronteira (SEMAG/MS, 2011). O município de Miranda está inserido na Região do Pantanal e possui como municípios limítrofes Aquidauana, Bodoquena, Bonito, Corumbá e Anastácio (Figura 3.2). Miranda possui área de 5.478 km² e uma população de 25.595 habitantes (4,67 hab./km²), sendo que cerca de 37% de sua população localiza-se na zona rural (IBGE, Censo Demográfico 2010). É conhecida como o “Portal do Pantanal” e sua atividade econômica se baseia essencialmente no ecoturismo e no turismo de pesca, mas também na cultura de arroz e pecuária extensiva (FUNDTUR/MS, 2012). A economia de seus municípios limítrofes também se fundamenta no turismo contemplativo e de pesca, além da agropecuária e mineração.

A população da localidade de Salobra é bastante reduzida e concentra-se principalmente às margens do Rio Miranda, próximo à estação ferroviária e entre a rodovia BR-262 (liga Vitória (ES) a Corumbá (MS), passando por Belo Horizonte (MG) e Campo Grande (MS)) e a ponte da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, que atravessa o citado rio. Em geral, as casas próximas ao Rio Miranda são construídas em madeira sobre palafitas, o que evita a inundação daquelas durante o período de alagamento da região. Mas, há também casas construídas em alvenaria, especialmente quando localizadas em terra firme, nos bancos altos das margens do Rio Miranda ou afastadas deste e das áreas de abrangência de sua inundação, tanto no núcleo populacional quanto nas chácaras e fazendas dispersas. Não há calçamento nas ruas e o esgoto é drenado para fossas; somente parte das casas recebe água encanada, pois a grande maioria extrai água de poços. A economia de Salobra e de seu entorno é baseada principalmente no turismo ecológico e de pesca.

Salobra encontra-se a aproximadamente 117 metros acima do nível do mar e está inserida no Complexo do Pantanal, uma grande área de planície de 150.355 km² que apresenta períodos de cheia e seca em geral bem definidos. As chuvas e o conseqüente transbordamento dos rios locais tornam essa região alagada durante boa parte do ano, pois a baixa declividade do terreno não permite o escoamento rápido e eficaz das águas (Ministério do Interior, 1974; Galdino & Silva, 2006). Na localidade de Salobra e no seu entorno em particular, a declividade é de apenas 3-15 cm/km no sentido norte-sul e 30-50 cm/km no sentido leste-oeste (Artioli & Resende, 2005).

O Pantanal, por sua vez, encontra-se inserido na Bacia do Rio Paraguai, sendo este o principal rio de drenagem da região. A bacia do Rio Paraguai se divide em 30 sub-bacias hidrográficas, sendo uma delas a sub-bacia do Rio Miranda, no Mato Grosso do Sul, formada pelo Rio Miranda e seus tributários, dentre os quais o Rio Salobra.

A região da localidade de Salobra, situada no Pantanal do Rio Miranda, apresenta uma vegetação de contato, formada pelo cerrado e por uma floresta estacional decidual (SEMAC/MS, 2011). O nome é uma referência ao Rio Salobra, tributário do Miranda, cuja foz se localiza nessa região. Diferentemente do Rio Miranda, o Salobra, como o próprio nome indica, apresenta maior concentração de sais. A diferente composição química desses rios é devida à origem de cada um deles. O Rio Salobra nasce na Serra da Bodoquena, formada principalmente por rochas calcárias e dolomíticas, conferindo a esse rio um acúmulo de íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e CO_3^{2-} , tornando suas águas cristalinas. O Rio Miranda, em contrapartida, apresenta uma água bastante turva. Sua nascente se situa na Serra de Maracaju, na qual predominam rochas basálticas (Mendes *et al.*, 2004). O Miranda percorre cerca de 750 km no sentido leste-oeste até desaguar no Rio Paraguai (Moss & Moss, 2007). Durante a estação chuvosa, o Miranda e o Salobra, assim como os demais rios do Pantanal, transbordam e, devido à topografia plana da região, essas águas não escoam de maneira eficaz, ficando então represadas e formando pântanos e pequenos lagos nas áreas próximas a esses rios. Essas coleções líquidas são utilizadas como criadouros para diferentes espécies de mosquitos, de acordo com suas particularidades biológicas.

No Pantanal do Mato Grosso do Sul, a precipitação pluviométrica anual varia entre 1.000 e 1.400 milímetros (SEMAC/MS, 2011). Usualmente, o período de maior volume de chuva vai de outubro a março, ao passo que a época seca se estende de maio a setembro, quando a precipitação mensal pode chegar a zero nesta parte do Pantanal (SEMAC/MS, 2011). O clima é classificado como sub-úmido mega-térmico ou Aw (invernos secos e verões chuvosos) segundo a classificação de Köppen, e a média anual de temperatura e umidade relativa gira em torno de 24°C e 72,7%, respectivamente (Galdino & Silva, 2006; SUPLAN/SEMAC/MS, 2011).

3.2. Coletas de mosquitos anofelinos

As coletas de anofelinos foram realizadas a cada dois meses: setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011 (Tabela 3.2). Em cada mês, foram realizadas capturas durante cinco dias consecutivos, das 17h às 20h, em três ambientes distintos simultaneamente: intra, peri e extradomicílio (Figura 3.3).

Tabela 3.2. Datas das coletas e estações do ano e fases lunares correspondentes

	Período seco	Período chuvoso			Período seco	
Data da coleta	14 a 18 set/10	08 a 12 nov/10	17 a 21 jan/11	21 a 25 mar/11	23 a 27 mai/11	11 a 15 jul/11
Estação do ano	Final do inverno	Início da primavera	Início do verão	Início do outono	Final do outono	Início do inverno
Fase lunar	Quarto crescente	Lua nova	Quarto crescente / Lua cheia	Lua cheia	Lua cheia / Quarto minguante	Quarto crescente / Lua cheia



Figura 3.3. Pontos de coleta sistematicamente empregados no intradomicílio (I) ($20^{\circ}11'51,53''$ S, $56^{\circ}30'14,25''$ O), peridomicílio (P) ($20^{\circ}11'51,74''$ S, $56^{\circ}30'13,58''$ O) e extradomicílio (E) ($20^{\circ}11'51,21''$ S, $56^{\circ}30'10,33''$ O) em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Esses pontos localizam-se próximo à ponte da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, a qual atravessa o Rio Miranda. O ponto adicional no extradomicílio (A) ($20^{\circ}11'57,31''$ S, $56^{\circ}30'09,08''$ O) está mostrado na parte inferior direita da foto. Fonte: Google Earth

A residência selecionada para as coletas intradomiciliares é de alvenaria, não tem telas nas portas e janelas e é habitada por uma mesma família (seis pessoas) há décadas. A casa está localizada a cerca de 100 metros da margem esquerda do Rio Miranda, local onde se executaram as capturas sistemáticas extradomiciliares (Figura 3.3). No interior da residência, os mosquitos foram coletados quando em repouso nas paredes e mobília; nunca em moradores. Ou seja, esta amostragem pretendeu investigar que espécies de anofelinos e com que frequência entram nas casas.

O ponto escolhido para as coletas peridomiciliares se encontrava a aproximadamente 6 metros de distância do citado domicílio. Trata-se de terreno aberto, contendo algumas árvores frutíferas, e intensamente usado para a criação

de animais domésticos confinados (porcos e galinhas). Ali foi instalada uma armadilha para a coleta de mosquitos com atrativo humano protegido (Figura 3.4). Essa armadilha, recentemente criada pelo Dr. José Bento Pereira Lima, do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, consiste numa adaptação da armadilha de Shannon (Shannon, 1939). Ela é composta por três compartimentos de paredes de filó: um interno (1 x 1 m), telado até o nível do solo e fechado por meio de zíper, onde o atrativo/coletor deve se posicionar; um intermediário, telado até o solo e apresentando orifícios em todo o seu perímetro, onde o coletor se posiciona, em intervalos (por ex. a cada 15 ou 20 min), a fim de aspirar os mosquitos, que estarão pousados no compartimento intermediário ou no compartimento externo, este telado até a altura de ~ 60 cm a partir do teto da armadilha (Figura 3.4). A armadilha é fixada, pelas suas extremidades, a uma tenda, ficando suspensa no interior da mesma. A armadilha possui altura aproximada de 2 m e ocupa uma área de aproximadamente 6,25 m². Ela permite avaliar a tendência antropofílica e, possivelmente, o grau de endofagia das espécies, já que o mosquito precisa passar pelos orifícios de uma tela a fim de alcançar a fonte sanguínea.



Fotos: Mariana Marinho

Figura 3.4. Armadilha com atrativo humano protegido, utilizada para avaliar a tendência antropofílica das espécies.

O local selecionado para as capturas extradomiciliares localiza-se na margem esquerda do Rio Miranda, a cerca de 1,5 km de distância do ponto de confluência do Rio Salobra com o Miranda (Figuras 3.1 e 3.2) e a 100 m do ponto domiciliar e a 94

m do ponto peridomiciliar. Ali, as capturas de mosquitos foram realizadas com armadilha Shannon tradicional com uma égua no interior (Apêndice: Autorização para atividades com finalidade científica, código de autenticação nº 64458983, expedida pelo SISBIO/ICMBio/MMA). A égua empregada como isca vive e pernoita na mesma área, e não realizamos na mesma nenhum tipo de procedimento.

Para avaliação da variação horária da hematofagia, foram realizadas capturas de 18 horas consecutivas, de 17h a 11h, em março, maio e julho, todas com armadilha Shannon utilizando-se uma égua como atrativo, no ponto de amostragem extradomiciliar.

A fim de se obter uma maior representatividade da diversidade de mosquitos de Salobra, nos meses de setembro e maio, um segundo ponto, além do sistematicamente usado no extradomicílio, foi escolhido para a amostragem de mosquitos, nos quais utilizaram-se atrativo luminoso em armadilha Shannon e atrativo animal.

Nos meses de maio e julho, foi feita também coleta em atração humana no peridomicílio, para comparação deste tipo de coleta com o atrativo humano protegido.

Para cada coleta, foi preenchida uma “ficha de campo” contendo as informações a seguir: número da ficha, data, local (intra, peri ou extradomicílio), tipo de captura e coletor, além de alguns dados abióticos, como temperatura, umidade relativa do ar e ocorrência de chuvas e ventos fortes (Apêndice). Assim, durante as coletas, incluindo também aquelas de 18 horas, a temperatura e umidade relativa foram registradas na ficha de campo, a cada hora cheia, por meio de termo-higrômetros devidamente aferidos, sendo um termo-higrômetro para cada ponto (intra, peri e extradomicílio).

Os mosquitos foram coletados com aspirador manual (capturador de Castro) e imediatamente transferidos para gaiolas cilíndricas de 950 cm³, feitas de papelão grosso, e teladas em ambas as extremidades. Essas gaiolas foram identificadas com o número da ficha de campo correspondente, data, local, horário de captura e nome do coletor.

Logo após cada coleta, os mosquitos foram mortos a -20°C por 20 min e deixados secar sobre papel filtro a temperatura ambiente. Para o transporte, armazenamento e conservação dos exemplares, foram utilizados frascos de plástico cilíndricos (volumes de 37, 75 e 78 cm³) contendo de 3 a 5 g de naftalina em pó, uma camada de algodão (1-1,5 cm) e uma rodela de papel filtro (mesmo diâmetro do

frasco), sobrepostos nessa ordem. Sobre o papel filtro, foram colocados os mosquitos capturados no mesmo dia, local e horário, porém não ultrapassando o limite de 50 exemplares por frasco. Os frascos receberam uma etiqueta com as mesmas informações contidas nas respectivas gaiolas. Parte dos mosquitos de algumas coletas foi conservada viva, na própria gaiola de coleta, seja para a obtenção de proles com a finalidade de determinação da composição da fauna anofélica, seja para a dissecação dos ovários.

3.3. Dissecação dos ovários para determinação de fêmeas nulíparas e paridas

Uma parte das fêmeas capturadas no extradomicílio em maio e julho teve seus ovários dissecados para comparação da proporção de nulíparas e paridas em períodos distintos. A dissecação dos ovários foi feita em campo, em, no máximo, até 12 horas após a coleta dos anofelinos. A dissecação foi realizada segundo técnica descrita por Detinova (1962) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). As fêmeas foram anestesiadas em uma pequena câmara contendo vapor de acetato de etila (Merck). Em seguida, foram posicionadas ventralmente em uma lâmina de vidro, onde os últimos segmentos abdominais (a partir do segmento VII) juntamente com os ovários foram tracionados, com auxílio de estilete, para uma gota de água potável. Esse conjunto foi coberto com uma pequena lamínula e examinado ao microscópio óptico para a observação do sistema traqueolar, permitindo assim a clara visualização das traqueias e traqueíolas.

3.4. Criação dos mosquitos para obtenção de proles individuais

As fêmeas capturadas no extradomicílio no penúltimo dia de cada coleta bimestral foram transportadas vivas para o insetário do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) - IOC/FIOCRUZ, seguindo-se todas as normas vigentes de biossegurança e transporte de material biológico (Apêndice: Autorização para atividades com finalidade científica, código de autenticação nº 64458983, expedida pelo SISBIO/ICMBio/MMA). Os mosquitos foram transportados nas gaiolas de captura, sobre as quais se colocou um chumaço de algodão umedecido em água potável, para criação de um microambiente úmido requerido

pelos anofelinos. A tampa de uma placa de Petri foi colocada sobre o algodão e fixada a cada gaiola durante o transporte.

No insetário do LATHEMA, as fêmeas foram identificadas ainda vivas. Aquelas que correspondiam ao Complexo *Triannulatus* foram imediatamente criopreservadas a -196°C , para posterior análise isoenzimática que permite a determinação específica. As fêmeas das demais espécies ou complexo de espécies que vieram do campo ingurgitadas com sangue foram imediatamente separadas para desova em frascos individuais rotulados com número da fêmea e dados da coleta (data, local, horário de captura e coletor). Tais frascos, cilindros transparentes de 34 cm^3 , foram telados em uma de suas extremidades e continham no fundo uma rodela de papel filtro (de mesmo diâmetro do frasco) sobre uma fina camada de algodão embebido em água sem cloro, simulando assim um local de oviposição. Um chumaço de algodão umedecido com solução de sacarose 10% foi colocado sobre a tela do frasco para alimentação.

Os ovos provenientes de cada desova foram semeados em cubas contendo cerca de 200 mL de água desclorada e um canudo de plástico dobrado em forma de triângulo, em sua superfície. Os ovos foram semeados no espaço delimitado pelo triângulo, de forma que, caso houvesse pequena evaporação da água, os ovos não estariam expostos à dessecação. Além disso, o canudo serviu como um suporte de apoio para as larvas quando em repouso, alimentando-se ou respirando na superfície. Para a alimentação das larvas, utilizou-se uma mistura de ração para peixe (AlconBasic[®] ou TetraMin[®]) e pólen desidratado na proporção 1:1. Ambos foram devidamente triturados e peneirados e, então, polvilhados sobre a superfície da água. A cada três dias, a água das cubas foi trocada e o alimento foi oferecido novamente.

As pupas foram transferidas para um copo plástico (50 mL) contendo água desclorada, o qual foi colocado no interior de uma pequena gaiola [195 x 92 mm (Bioquip[®])] para emersão dos adultos.

Todo este procedimento foi realizado em insetário com temperatura e umidade relativa controladas em torno de $26-28^{\circ}\text{C}$ e 70-80%, respectivamente.

As exúvias das larvas de quarto estágio e das pupas foram armazenadas em tubos tipo Eppendorf (1,5 mL) contendo etanol 80%, para posterior montagem e identificação. Parte dos adultos foi separada para análise morfológica e montagem da genitália masculina, e parte foi armazenada em nitrogênio líquido (-196°C) para

estudos futuros. Todos os espécimes (exúvias e adultos) receberam a mesma numeração das fêmeas que lhes deram origem.

3.5. Diagnóstico morfológico dos espécimes

As fêmeas adultas foram identificadas por meio da observação, em estereomicroscópio [Stemi 2000 (Zeiss)], de seus caracteres morfológicos externos, utilizando-se chaves dicotômicas específicas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002), além da consulta de descrições originais de espécies mais recentemente descritas e revisões e redescrições das espécies (por ex., Sallum *et al.*, 2002; Flores-Mendoza *et al.*, 2004; Motoki *et al.*, 2009). Com o intuito de tornar a análise morfológica mais precisa, algumas estruturas foram desenhadas e medidas, como por exemplo, as manchas claras e escuras, a porção escura basal do tarsômero posterior II, especialmente no caso de anofelinos dos Complexos Strodei e Oswaldoi. As estruturas foram medidas utilizando-se ocular milimetrada e desenhadas sob estereomicroscópio com câmara clara [Stemi SV 6 (Zeiss)].

As genitálias masculinas dos machos criados e daqueles ocasionalmente capturados em campo foram montadas com base nas técnicas descritas em Causey *et al.* (1946) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). Ao estereomicroscópio, cortou-se, utilizando tesoura entomológica (Sigma[®]), o abdome do mosquito (previamente montado em alfinete entomológico) na altura do segmento VIII. Transferiu-se a genitália para o poço de um godê contendo solução de hidróxido de potássio 20% (Vetec). A genitália foi mantida nesta solução por 40 min em estufa a 40°C e, depois, por 24 horas a temperatura ambiente (~ 25-26°C). Utilizando uma pipeta plástica, retirou-se o hidróxido de potássio e adicionou-se água potável à genitália, deixando-a imersa por 10 min, a fim de remover aquela solução. Essa etapa de lavagem foi novamente repetida e, após, adicionou-se à genitália solução de fucsina ácida [fucsina ácida 1 g; ácido acético 1 mL; água tipo II 20 mL]. Após 10 min, retirou-se a fucsina e adicionou-se água para remover o excesso do corante. Mais uma etapa de lavagem foi feita e, em seguida, passou-se a genitália em série alcoólica (etanol 70, 80, 90 e 100%, nesta ordem), deixando a mesma por 10 min em cada uma das concentrações, exceto no etanol absoluto, em que ficou imersa por 5 min. Retirou-se o excesso de álcool do godê com auxílio de uma tira de papel filtro e adicionou-se eugenol (Merck) à genitália, a qual foi mantida nessa substância por 24

horas a temperatura ambiente. Após esse período, a genitália foi transferida para uma lâmina de vidro e montada em Bálsamo do Canadá (Merck). A lâmina foi deixada em estufa a 40°C por 24 horas para secagem. Após esse tempo, a preparação foi coberta com lamínula (5 x 5 mm) e observada ao microscópio óptico [Axiolab (Zeiss)]. A identificação da espécie foi feita de acordo com a literatura supracitada.

Os ovos de cada fêmea eram observados ao microscópio estereoscópio antes da semeadura em água, de modo que se registrassem as suas principais características morfológicas, tal como o formato e tamanho dos flutuadores.

As exúvias larvais e pupais dos mosquitos criados foram montadas segundo a metodologia descrita abaixo, baseada em Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). A exúvia foi transferida do tubo tipo Eppendorf para um poço do godê contendo álcool 90%, ficando imersa nesta solução por 10 min. A seguir, retirou-se cuidadosamente o álcool 90% utilizando-se uma pipeta plástica, e adicionou-se álcool absoluto à exúvia, deixando a mesma submersa por 5 min. Retirou-se o etanol e manteve-se a exúvia em eugenol por 24 horas. Após esse tempo, a mesma foi transferida delicadamente do godê para uma lâmina de vidro e montada dorsalmente em uma gota de Bálsamo do Canadá. Deixou-se a lâmina secar em estufa a 40°C por 24 horas e após esse tempo cobriu-se a exúvia com Bálsamo do Canadá e lamínula. O espécime foi identificado ao microscópio óptico, utilizando-se, essencialmente, a chave para identificação de larvas presente em Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), complementada pelas revisões, descrições e redescrições de anofelinos citadas anteriormente.

3.6. Diagnóstico isoenzimático das espécies do Complexo Triannulatus

Para a identificação das espécies do Complexo Triannulatus, foi realizada eletroforese da enzima manose-6-fosfato isomerase (MPI; EC 5.3.1.8) em gel de agarose 1% (Silva-do-Nascimento *et al.*, 2006).

No preparo do gel, 1 g de agarose (Sigma[®]) foi solubilizado em 50 mL de água tipo II e 50 mL de tampão maleico 0,1 M pH 7,4 [Trizma[®] base 0,1 M (Sigma[®]); ácido maleico 0,001 M (Sigma[®]); EDTA 0,001 M (Sigma[®]); MgCl₂ (Sigma[®]); água tipo II 2 L]. A agarose foi fundida em micro-ondas até que a mistura ficasse completamente homogênea. Esta foi, então, vertida em uma película GelBond[®] (GE)

sobre placa de vidro (12,5 x 26,2 cm) para a formação da malha do gel, cujo tempo é de cerca de 6 horas. O gel foi, então, armazenado a 4°C para utilização no dia seguinte.

Os mosquitos, retirados do nitrogênio líquido e mantidos sob constante refrigeração dentro de isopor com gelo picado, foram macerados em 25 µL de tampão de lise [Tris-HCl 0,05 mM pH 8,0 (Sigma®); EDTA 0,01 mM (Sigma®); DTT 15 mM (Sigma®); ácido ε-amino-n-caproico 0,01 mM (Sigma®); Triton X-100 1% (Sigma®)] e, em seguida, 2 µL de cada amostra foram aplicados no gel. Um microlitro de solução corante indicadora [Xileno cianol FF 28 mg (Sigma®); azul de bromofenol 24 mg (Sigma®); água tipo II 10 mL] foi adicionado a três amostras (uma do centro e uma de cada extremidade do gel), a fim de acompanhar a velocidade de migração da enzima. Adicionaram-se 2 L de tampão maleico 0,1 M pH 7,4 à cuba horizontal [modelo Multiphor II (Pharmacia Biotech)] e, então, as amostras foram submetidas à eletroforese à temperatura de 4°C [fonte geradora de campo elétrico Electrophoresis Power Supply EPS 1001 (Amersham Pharmacia Biotech); circulador termostático MultiTemp III (Pharmacia Biotech)], por cerca de 2 horas a 300 V, 400 mA e 90 W.

A revelação das bandas no gel foi feita utilizando-se o sistema enzimático a seguir: 4 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (Sigma®); 2 mL do substrato M-6-P 200 mg/10 mL (Sigma®); 1 mL da coenzima NADP 40 mg/10 mL (Sigma®); 100 µL do ativador MgCl₂ 4 g/20 mL (Sigma®); 20 µL da enzima de ligação G6PDH 4 U/mL (Sigma®); 10 µL da enzima de ligação GPI 2 U/mL (Sigma®); 2 mL do visualizador MTT 30 mg/10 mL (Sigma®); 1 mL do visualizador PMS 20 mg/10 mL (Sigma®); 10 mL de agarose 1% (1 g de agarose em 100 mL de água tipo II). Preparada a solução reveladora, esta foi imediatamente vertida sobre o gel, o qual foi mantido ao abrigo da luz em estufa a 37°C, por cerca de 30 min ou até que as bandas fossem visualizadas. Após a revelação destas, a reação foi interrompida adicionando-se ácido acético 5% [100 mL de ácido acético (Proquímios); 1.900 mL de água tipo II]. O gel foi seco a temperatura ambiente e, posteriormente, analisado.

3.7. Diagnóstico molecular de espécies dos Complexos Oswaldoi e Albitarsis

Com o propósito de confirmar o diagnóstico morfológico, foram realizadas análises moleculares de sequências nucleotídicas da região “barcode” do gene

mitocondrial *citocromo oxidase subunidade I* (*COI*). Para esta técnica, foram utilizados mosquitos adultos fêmeas e machos, criopreservados ou conservados em naftalina. Foi empregado um grupo de fêmeas dos complexos Oswaldoi e Albitarsis. Algumas fêmeas identificadas como *An. benarrochi* e *An. galvaoi*, duas espécies muito similares morfológicamente, foram também sequenciadas para o fragmento do gene *COI*. Machos com genitálias muito similares à de *An. oryzalimnetes* (Complexo Albitarsis) foram sequenciados para confirmação da presença desta espécie. Machos de *An. konderi* (Complexo Oswaldoi), cujas genitálias apresentaram variabilidade morfológica ainda não descrita, foram também utilizados nesta técnica.

3.7.1. Extração do DNA total

Para a extração de DNA, mosquitos inteiros (ou somente o abdome) foram macerados em tubo tipo Eppendorf (1,5 mL) contendo 300 µL de tampão de extração TNES [Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (Merck); NaCl 400 mM (Merck); EDTA 100 mM pH 8,0 (Synth[®]); SDS 0,6% (Sigma[®])]. Pistilos autoclavados foram utilizados para a maceração. Adicionou-se 1 µL de proteinase K (~ 20 mg/mL; Sigma[®]) a cada amostra, e estas foram incubadas por 4 horas a 56°C, com agitação por 10 segundos a cada 15 min [Thermomixer comfort (Eppendorf)]. Após esse tempo, foram adicionados 85 µL de cloreto de sódio 5 M (Merck), homogeneizando-se o conteúdo do tubo com pipeta automática. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente [centrífuga modelo 5415R (Eppendorf)]. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf contendo 300 µL de etanol absoluto gelado (Merck). O tubo foi invertido manualmente para homogeneização do álcool e sobrenadante. As amostras foram mantidas a 4°C por aproximadamente 18 horas. Após esse tempo, foram centrifugadas a 13.000 rpm à temperatura de 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se ao precipitado 500 µL de etanol 70% (Merck). O tubo foi invertido manualmente apenas uma vez e foi novamente centrifugado a 13.000 rpm a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e deixou-se o precipitado secar em concentrador a vácuo [Concentrator plus (Eppendorf)] à temperatura de 60°C por 8 min. Após a secagem, o DNA foi diluído em 100 µL de TE [Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (Merck); EDTA 1 mM pH 8,0 (Synth[®])] no caso de mosquitos

inteiros, ou 50 μL quando apenas o abdome foi utilizado para a extração. As amostras foram mantidas a 56°C por 10 min e, a seguir, adicionou-se 1 μL de RNase 10 mg/mL (Fermentas) para cada 100 μL de DNA extraído. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C .

3.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação da região “barcode” do gene *COI* (tamanho do fragmento: ~ 650 pb), foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais LCO1490 (5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3') e HCO2198 (5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'), descritos por Folmer *et al.* (1994). Para o preparo da reação em cadeia da polimerase, foram utilizados os reagentes relacionados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Reagentes utilizados na amplificação, por PCR, da região “barcode” do gene *COI*

Reagentes	Concentração final	$\mu\text{L}/\text{tubo}$
Tampão de PCR 10X (Invitrogen™)	1X	2,5
MgCl_2 50 mM (Invitrogen™)	1,5 mM	0,75
dNTPs 10 mM cada (Kapa Biosystems)	200 μM cada	0,5
LCO1490 10 μM (IDT®)	2,5 pmol	0,25
HCO2198 10 μM (IDT®)	2,5 pmol	0,25
Taq DNA polimerase 5 U/ μL (Invitrogen™)	0,625 U	0,125
Água ultrapura	-	19,625
DNA genômico	60 – 100 ng/ μL	1
Volume total		25

As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 40 ciclos de 3 minutos, sendo 1 min para desnaturação da molécula de DNA (94°C), 1 min para pareamento dos oligonucleotídeos (55°C) e 1 min para extensão da molécula de DNA (72°C); extensão final de 7 minutos a 72°C . As reações foram submetidas a tais ciclos de temperatura em

termociclador Mastercycler epgradient (Eppendorf). Após a amplificação, as reações foram armazenadas a -20°C.

3.7.3. Eletroforese em gel de agarose 1%

A fim de avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados e o rendimento da reação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

Adicionou-se 0,2 g de agarose (BioAgency) a 20 mL de TAE 1X [Tris 40 mM (Merck); ácido acético 20 mM (Merck); EDTA 1 mM (Synth[®])]. A agarose foi fundida em micro-ondas e, a seguir, vertida para uma cuba de eletroforese horizontal (BioAmerica). Foi adicionado à cuba o tampão TAE 1X em quantidade suficiente para que o gel ficasse totalmente submerso. Adicionou-se 1 µL de “loading buffer” 6X (RBC) e 1 µL do corante GelRed[™] 1:5.000 (Biotium) a 2 µL de cada produto de PCR e a 2 µL do marcador molecular Low DNA Mass[™] Ladder (Invitrogen[™]). As amostras e o marcador molecular foram aplicados no gel, e a eletroforese foi realizada a 40 V e 50 mA por 30 min [fonte EV231 (Consort)]. O gel foi fotografado em sistema de imagem MultiDoc-It (UVP).

3.7.4. Purificação dos produtos de PCR por polietileno glicol 20%

Para a purificação dos produtos da PCR, 20 µL do produto e 20 µL de polietileno glicol (PEG) 20% [PEG 8.000 3 g (Amresco[®]); cloreto de sódio 2,19 g (Merck); água ultrapura 15 mL] foram adicionados a um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram agitadas em “vortex” [Vortex-Genie[®] 2 (Scientific Industries, Inc.)] e, a seguir, incubadas por 15 min a 37°C. Após esse tempo, foram centrifugadas a 13.200 rpm por 15 min a temperatura ambiente [centrífuga modelo 5415R (Eppendorf)]. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionaram-se 200 µL de etanol 80% gelado, homogeneizando-se com a pipeta. Os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados mais 200 µL de etanol 80% gelado (Merck). Uma segunda centrifugação a 13.200 rpm por 15 min a 4°C foi

realizada e, em seguida, descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi seco em concentrador a vácuo a 60°C [Concentrator plus (Eppendorf)] por aproximadamente 10 min. O mesmo foi, então, ressuspensão em 10 µL de água ultrapura.

3.7.5. Eletroforese em gel de agarose 1,5%

A estimativa da concentração dos fragmentos gênicos após a purificação destes por PEG 20% foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Adicionou-se 0,3 g de agarose (BioAgency) a 20 mL de TAE 1X [Tris 40 mM (Merck); ácido acético 20 mM (Merck); EDTA 1 mM (Synth[®])]. Foi feita a dissolução em micro-ondas e, a seguir, a mistura foi vertida para uma cuba de eletroforese horizontal (BioAmerica). Adicionou-se o tampão TAE 1X em quantidade suficiente para cobrir o gel. A 1 µL de cada purificado, foi adicionado 1 µL de “loading buffer” 6X (RBC) e 1 µL do corante GelRed[™] 1:5.000 (Biotium). Os dois últimos foram também adicionados a 2 µL do marcador molecular Low DNA Mass[™] Ladder (Invitrogen[™]). As amostras e o marcador molecular foram aplicados no gel, e a eletroforese foi realizada a 40 V e 50 mA por 30 min [fonte EV231 (Consort)]. O gel foi fotografado em sistema de imagem MultiDoc-It (UVP), e a concentração de fragmentos gênicos em cada amostra foi estimada comparando-se as bandas do gel com bandas cujo DNA havia sido previamente quantificado em espectrofotômetro.

3.7.6. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento da fita F da região “barcode” do gene *COI* foram realizadas utilizando-se o “kit” de sequenciamento BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™]). Para um volume total de 10 µL, foi adicionado 1 a 1,5 µL do purificado, dependendo da intensidade da banda no gel feito após purificação por PEG; 5 a 5,5 µL de água ultrapura; 1 µL de oligonucleotídeo LCO1490 a 3,6 pmol (IDT[®]); 0,5 µL de tampão de sequenciamento 5X (MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 200 mM pH 9,0) (Applied Biosystems[™]); 0,5 µL do “mix” BigDye[®] (Applied Biosystems[™]). As

amostras foram sequenciadas em termociclador Mastercycler epgradient (Eppendorf), empregando-se 25 ciclos de temperatura (96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 min).

3.7.7. Purificação dos produtos do sequenciamento por cromatografia de gel filtração

Para a remoção dos ddNTPs não incorporados à molécula de DNA, sais e demais reagentes, os produtos do sequenciamento foram purificados por cromatografia de gel filtração.

Foram adicionados 700 µL de Sephadex™ [Sephadex™ G-50 Medium 10 g (GE Healthcare); água ultrapura 200 mL] a cada coluna (GE Healthcare) e, em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 1.500 rpm a temperatura ambiente por 5 min [centrífuga modelo 5415R (Eppendorf)]. As colunas foram colocadas no interior de tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL e, a seguir, os produtos do sequenciamento foram cuidadosamente aplicados no centro da coluna. As amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm a temperatura ambiente por 5 min e, após a centrifugação, as colunas foram retiradas. As amostras foram secas em concentrador a vácuo [Concentrator plus (Eppendorf)] a 60°C, por cerca de 8 min, protegidas da luz. Em seguida, as amostras foram armazenadas em papel alumínio a -20°C e, posteriormente, submetidas a eletroforese em sequenciador modelo 3130xl (Applied Biosystems™).

3.7.8. Análise das sequências

As sequências foram editadas utilizando-se os programas Sequencher 4.10.1 Versão “Demo” para Windows (Gene Codes Corporation) e BioEdit v7.1.3 (Hall, 1999), e salvas em formato FASTA. A seguir, as sequências foram alinhadas com sequências similares depositadas no Genbank®, utilizando-se o algoritmo megablast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.8. Dados climatológicos e epidemiológicos

Os dados fluviométricos, pluviométricos e climatológicos foram obtidos junto à Agência Nacional de Águas (ANA/MMA). Foram fornecidos níveis diários do Rio Miranda coletados na estação fluviométrica 66910000 (20°14'27" S, 56°23'46" O), a mais próxima ao local de coleta dos mosquitos. Dados diários do volume de chuva no município de Miranda (estação pluviométrica 66910000) e registros diários de temperatura [estação climatológica 02056005 (20°06'07" S, 56°47'43" O)] também foram fornecidos.

O número de habitantes do Mato Grosso do Sul que contraíram malária entre os anos de 2002 a 2011 foi obtido por meio de consulta ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN Web/SVS/MS, <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>). Registros completos de casos de malária autóctone ocorridos nos municípios de Mato Grosso do Sul, no período de 2007 a 2011, foram obtidos junto à Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso do Sul.

3.9. Análise dos dados

A organização e a apresentação gráfica dos dados bióticos, abióticos e epidemiológicos, bem como o cálculo de médias e percentuais, foram realizados utilizando-se o programa Microsoft Office Excel 12.0 (Sistema Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação morfológica e molecular das espécies do gênero *Anopheles*

Foram coletadas e identificadas morfológicamente 24.894 fêmeas de anofelinos, assim distribuídas: 310 e 640 espécimes em setembro e novembro de 2010; 327, 3.722, 16.951 e 2.944 em janeiro, março, maio e julho de 2011, respectivamente. O esforço total de captura foi de 330 horas. Em todos os meses, exceto novembro, foram capturados, ocasionalmente, anofelinos machos, totalizando 91 exemplares: 75 foram capturados no ambiente peridomiciliar, 9 no interior da residência e 7 no extradomicílio. A maioria dos machos foi capturada nos meses de janeiro (n = 41) e março (n = 31) de 2011. Um total de 265 fêmeas foi separada para desova, embora somente 101 (38,11%) tenham desovado. A análise isoenzimática foi realizada em uma amostra de 336 indivíduos do Complexo *Triannulatus* capturados no extradomicílio, sendo 59 exemplares de setembro e 72 de novembro de 2010, e 34 de janeiro, 41 de março, 29 de maio e 101 de julho de 2011 (Tabela 4.1 e Figura 4.1). O sequenciamento da região “barcode” do gene *COI* foi realizado em uma amostra de 30 mosquitos, previamente caracterizados morfológicamente, de diferentes meses de coleta (Tabela 4.2).

Tabela 4.1. Resultado do diagnóstico isoenzimático realizado em uma amostra de 336 indivíduos do Complexo *Triannulatus* capturados no extradomicílio em Salobra, Pantanal de Miranda, MS

Mês da coleta	Determinação das espécies								Total
	<i>An. halophylus</i>		<i>An. triannulatus</i> C		<i>An. triannulatus</i> s.s.		Indeterminadas		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Set-10	17	28,81	2	3,39	35	59,32	5	8,48	59
Nov-10	40	55,56	1	1,39	13	18,06	18	25	72
Jan-11	15	44,12	12	35,29	0	0	7	20,59	34
Mar-11	5	12,19	1	2,44	35	85,37	0	0	41
Mai-11	11	37,93	2	6,89	16	55,17	0	0	29
Jul-11	82	81,19	6	5,94	11	10,89	2	1,98	101
Total									336



Figura 4.1. Gel de agarose 1% da enzima MPI mostrando o padrão de bandas das espécies do Complexo Triannulatus, *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* e *An. triannulatus* C, capturadas em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. *An. triannulatus* s.s.: amostras T246, T248 e amostra padrão s.s.; *An. halophylus*: amostras T247, T249, T250, T252 e amostra padrão halo; *An. triannulatus* C: amostra T251 e amostra padrão C.

Tabela 4.2. Resultados da identificação específica por meio de sequências “barcode” do gene *COI* em 30 mosquitos dos Complexos Albitarsis e Oswaldoi cujas análises morfológicas não foram conclusivas

Código	Data da coleta	Sexo	Identificação morfológica preliminar	Identificação molecular	Proporção da mancha basal no tarsômero posterior II da escura
BM1	21.01.11	F	<i>An. albitarsis s.l.</i>	<i>An. deaneorum</i>	ND
BM2	25.03.11	F	<i>An. albitarsis s.l.</i>	<i>An. oryzalimnetes</i>	ND
BM3	23.05.11	F	<i>An. albitarsis s.l.</i>	<i>An. deaneorum</i>	ND
BM4/C95	25.05.11	F	<i>An. albitarsis s.l.</i>	<i>An. deaneorum</i>	ND
BM5/C183	26.05.11	F	<i>An. albitarsis s.l.</i>	<i>An. deaneorum</i>	ND
BM11	23.05.11	F	<i>An. benarrochi (?)</i>	<i>An. konderi</i>	35%
BM13	23.05.11	F	<i>An. benarrochi (?)</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM18	23.05.11	F	<i>An. benarrochi (?)</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM29	23.05.11	F	<i>An. benarrochi (?)</i>	<i>An. konderi</i>	34% e 35%
BM30	22.03.11	F	<i>An. evansae</i>	<i>An. konderi</i>	35%
BM17	23.05.11	F	<i>An. evansae (?)</i>	<i>An. konderi</i>	35%
BM12	23.05.11	F	<i>An. galvaei</i>	<i>An. galvaei</i>	ND
BM14	23.03.11	F	<i>An. galvaei</i>	<i>An. galvaei</i>	ND
BM15	23.03.11	F	<i>An. galvaei</i>	<i>An. arthuri</i>	ND
BM19	25.03.11	F	<i>An. galvaei (?)</i>	<i>An. galvaei</i>	ND
BM24/♀13	25.03.11	F	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. konderi</i>	Menos de 20%
BM25/♀2	22.03.11	F	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. konderi</i>	Menos de 20%
BM26/♀12	23.03.11	F	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. konderi</i>	Menos de 20%
BM7/C111	26.05.11	F	<i>An. oswaldoi/An. evansae</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM8/C114	26.05.11	F	<i>An. oswaldoi/An. evansae</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM9/C130	26.05.11	F	<i>An. oswaldoi/An. evansae</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM10/C220	14.07.11	F	<i>An. oswaldoi/An. evansae</i>	<i>An. konderi</i>	Mais de 20%
BM6/C66	25.05.11	F	<i>An. oswaldoi/An. konderi</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM16/C125	26.05.11	F	<i>An. oswaldoi/An. konderi</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM20/♂58	23.03.11	M	<i>An. konderi</i>	*	ND
BM23/♂13	20.01.11	M	<i>An. konderi</i>	*	ND
BM21/♂62	23.03.11	M	<i>An. konderi</i>	<i>An. konderi</i>	ND
BM22/♂33	21.01.11	M	<i>An. konderi</i>	**	ND
BM27/♂10	20.01.11	M	<i>An. oryzalimnetes (?)</i>	**	ND
BM28/♂39	21.01.11	M	<i>An. oryzalimnetes (?)</i>	**	ND

* Não foi possível a identificação molecular devido à baixa qualidade da sequência gerada.

** Não foi possível a identificação molecular devido à não amplificação do DNA.

ND: Não Disponível

As identificações morfológica e molecular dos mosquitos revelaram a presença de 13 espécies ou complexos de espécies de anofelinos em Salobra (MS): *An. albitarsis s.l.*, *An. arthuri*, *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. halophylus*, *An. konderi*, *An. mattogrossensis*, *An. oryzalimnetes*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. rondoni*, *An. triannulatus C* e *An. triannulatus s.s.*

A espécie *An. arthuri* foi identificada pela sequência “barcode” (COI) de uma fêmea classificada morfológicamente como *An. galvaoi* (Tabela 4.2). Devido ao fato de que essas duas espécies não podem ser diferenciadas pelos caracteres de fêmeas adultas, ressalva-se que os resultados apresentados mais adiante sobre as variações sazonal e horária do que chamamos *An. galvaoi* podem corresponder àqueles das espécies *An. arthuri* e *An. galvaoi*.

Ressalvamos ainda que as informações referentes a *An. albitarsis s.l.* incluem as espécies *An. deaneorum*, *An. oryzalimnetes* e, possivelmente, outras espécies do Complexo Albitarsis, já que poucos indivíduos foram analisados molecularmente e a diferenciação morfológica dessas espécies em geral é feita por caracteres da genitália masculina (Motoki *et al.*, 2009).

Para os resultados e discussão referentes à variação da frequência dos anofelinos, variação horária da frequência, composição etária, distribuição no intra, peri e extradomicílio, e comparação entre capturas em atrativo humano e em atrativo humano protegido, consideraremos as sete espécies ou grupos de espécies a seguir: *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi*, *An. galvaoi* + *An. arthuri*, *An. mattogrossensis*, *An. oswaldoi s.l.* + *An. konderi*, *An. rondoni* e *An. triannulatus s.l.*

4.2. Variação da frequência dos anofelinos

Na Tabela 4.3 apresentamos a fauna total de anofelinos capturada em todas as coletas realizadas, incluindo os pontos adicionais no peri e extradomicílio e as coletas de 18 horas. No total, as espécies (ou complexos de espécies) mais frequentes foram *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.*, que juntas corresponderam a 82,86%. As outras espécies capturadas, em menor frequência, foram: *An. albitarsis s.l.* (4,46%), *An. oswaldoi s.l.* + *An. konderi* (2,11%), *An. mattogrossensis* (1,36%), *An. galvaoi* + *An. arthuri* (0,67%) e *An. rondoni* (0,6%) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Total de indivíduos, por espécie, capturados no total das coletas bimestrais em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Foram consideradas todas as capturas: as coletas sistemáticas de 17h a 20h nos pontos sistemáticos, as coletas de 18 horas nos meses de março, maio e julho, e as coletas adicionais no atrativo humano e no 2º ponto extradomiciliar

Espécie	Mês						Total	%
	set-10	nov-10	jan-11	mar-11	mai-11	jul-11		
<i>An. darlingi</i>	75	4	46	1.425	12.843	1.319	15.712	63,12%
<i>An. triannulatus</i>								
<i>s.l.</i>	202	323	156	1.332	2.305	595	4.913	19,74%
<i>An. albitarsis s.l.</i>	6	8	26	259	502	309	1.110	4,46%
<i>An. oswaldoi s.l.</i>								
+ <i>An. konderi</i>	0	1	71	112	305	36	525	2,11%
<i>An.</i>								
<i>mattogrossensis</i>	1	0	16	71	241	9	338	1,36%
<i>An. galvaoi</i> +								
<i>An. arthuri</i>	4	7	0	8	93	55	167	0,67%
<i>An. rondoni</i>	0	0	2	46	100	2	150	0,6%
<i>An. sp</i>	22	297	10	469	562	619	1.979	7,95%
Total	310	640	327	3.722	16.951	2.944	24.894	100,01%

A fim de comparar, entre os meses, a variação na frequência e a contribuição percentual das espécies de anofelinos (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4), foram considerados apenas os mosquitos coletados nas capturas sistemáticas, isto é, aquelas realizadas no intra, peri e extradomicílio durante cinco dias de cada mês, entre 17h e 20h, já que tais capturas foram realizadas em todos os seis meses de coleta. A frequência de indivíduos de cada espécie (ou complexo) nos diferentes meses é apresentada na Figura 4.2, exceto para *An. triannulatus s.l.*, que é apresentada na Figura 4.3. Em ambas as figuras, observa-se que todas as espécies apresentaram maior frequência no mês de maio, no qual não ocorreu nenhuma chuva e no qual se registrou o maior nível do Rio Miranda (Figura 4.5). *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.* e *An. galvaoi* apresentaram a menor frequência em janeiro, mês em que se registrou o maior volume de chuva em Salobra. Já *An. albitarsis s.l.*, *An. oswaldoi s.l.* + *An. konderi* e *An. rondoni* tiveram a frequência mais baixa em setembro, o mês mais seco. *An. mattogrossensis* foi menos frequente em novembro.

Considerando-se as três espécies do Complexo *Triannulatus* separadamente, *An. halophylus* foi mais frequente em julho (mês de seca) e menos frequente em março (mês chuvoso). Aparentemente, houve maior frequência de indivíduos *An. triannulatus* s.s. em março e uma menor frequência dessa espécie em janeiro. Com efeito, em janeiro, nenhum dos 34 espécimens do Complexo *Triannulatus* testados correspondeu a *An. triannulatus* s.s., ao passo que as outras duas outras espécies conhecidas do complexo foram frequentes. *An. triannulatus* C parece ser mais frequente em janeiro. Já novembro e março parecem ser os meses de menor frequência dessa espécie (Figura 4.3).

A contribuição percentual de cada espécie nos diferentes meses, apresentada na Figura 4.4, mostra que *An. darlingi* predominou nos meses chuvosos em relação às outras espécies, e que a proporção de *An. triannulatus* s.l. foi maior nos meses mais secos.

Na Figura 4.5, observa-se que os meses de maior precipitação foram janeiro e março, que tiveram 215,2 e 164,2 mm de chuva, respectivamente. Já os meses de menor volume de chuva foram setembro (final da seca) e maio (início da seca). Entretanto, em setembro foi registrado o menor nível de água do Rio Miranda (169 cm), enquanto em maio obteve-se uma altura 3,5 vezes maior desse rio (590 cm). O nível alto registrado para o Rio Miranda nesse mês é devido ao acúmulo de água das chuvas abundantes ocorridas nos meses finais da estação chuvosa.

Deve-se observar que, em novembro, houve grande dano aos mosquitos durante o transporte dos mesmos vivos em gaiolas, impossibilitando a identificação de 297 exemplares (46,41%) do total coletado nesse mês. Assim, o número de indivíduos de algumas espécies (por exemplo, *An. darlingi*) em novembro está, muito provavelmente, subestimado (Figura 4.4).

As coletas de novembro de 2010 e janeiro de 2011 foram feitas no horário habitual, ou seja, de 17h a 20h. Entretanto, nesses dois meses, devido à vigência do horário de verão no Mato Grosso do Sul, as coletas deveriam ter sido realizadas de 18h a 21h, a fim de abranger os mesmos períodos claros e escuros do dia das outras quatro coletas. Desse modo, ressalvamos que o número total de mosquitos capturados em novembro e janeiro pode estar subestimado, em virtude de que a amostragem incluiu menor tempo de coletas em horário noturno após o crepúsculo vespertino que nos outros quatro meses, embora o esforço de captura tenha sido sempre o mesmo.

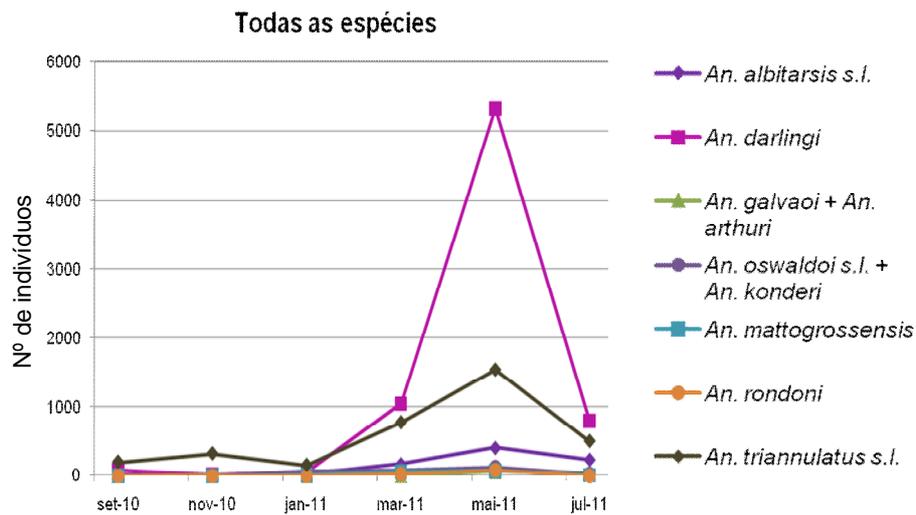


Figura 4.2. Variação bimestral das espécies de anofelinos em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. A variação bimestral de todas as espécies em um único gráfico e de cada uma separadamente é apresentada. Nos gráficos da variação bimestral de cada espécie, são apresentados, em azul, os volumes totais de chuva no período* considerado. O número de indivíduos em cada mês corresponde ao total capturado nos três pontos de coleta sistemáticos entre 17h e 20h.

* Período: dos 15 dias anteriores ao 1º dia da coleta até o 5º dia da mesma.

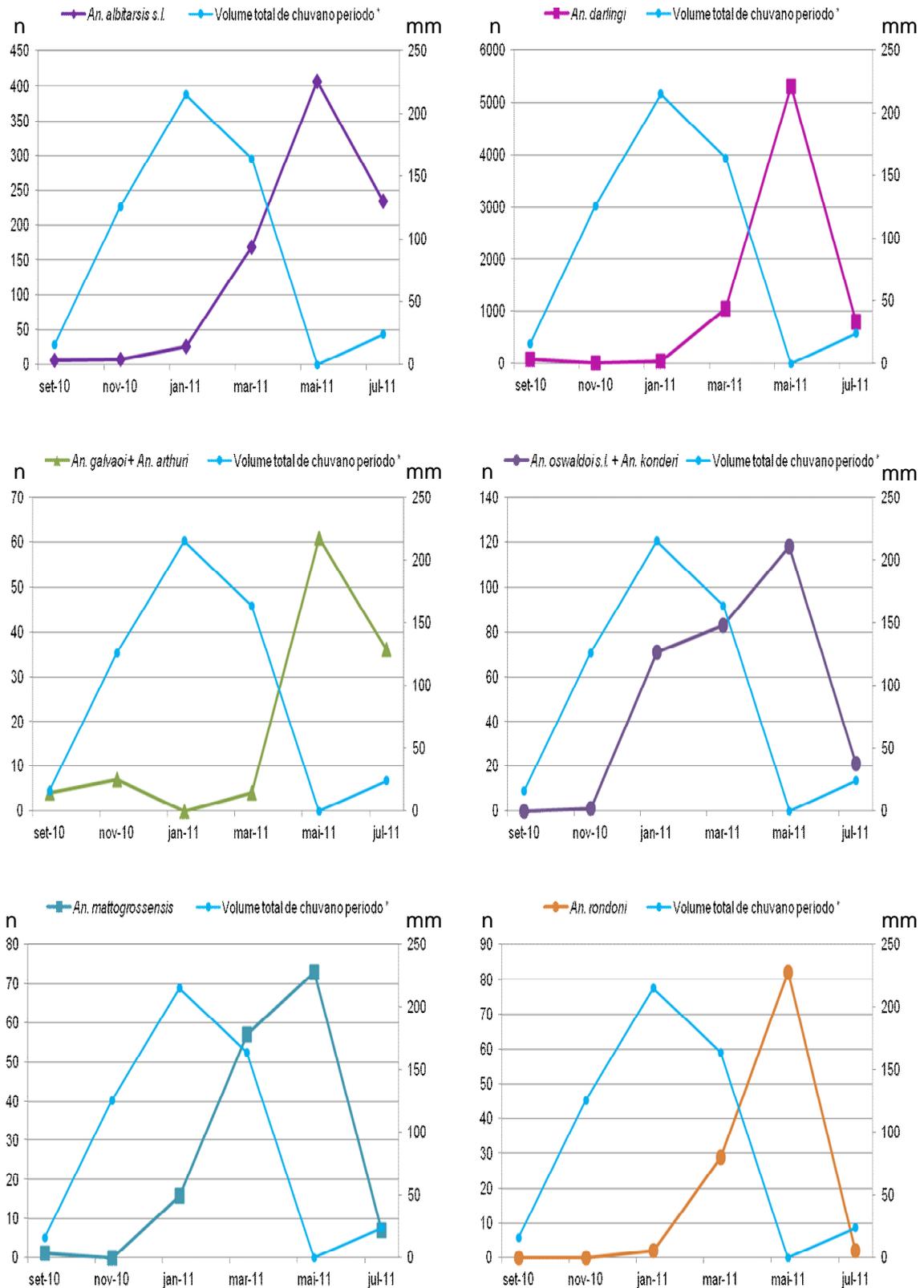


Figura 4.2 (Continuação). Variação bimestral das espécies de anofelinos em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. A variação bimestral de todas as espécies em um único gráfico e de cada uma separadamente é apresentada. Nos gráficos da variação bimestral de cada espécie, são apresentados, em azul, os volumes totais de chuva no período* considerado. O número de indivíduos em cada mês corresponde ao total capturado nos três pontos de coleta sistemáticos entre 17h e 20h.

* Período: dos 15 dias anteriores ao 1º dia da coleta até o 5º dia da mesma.

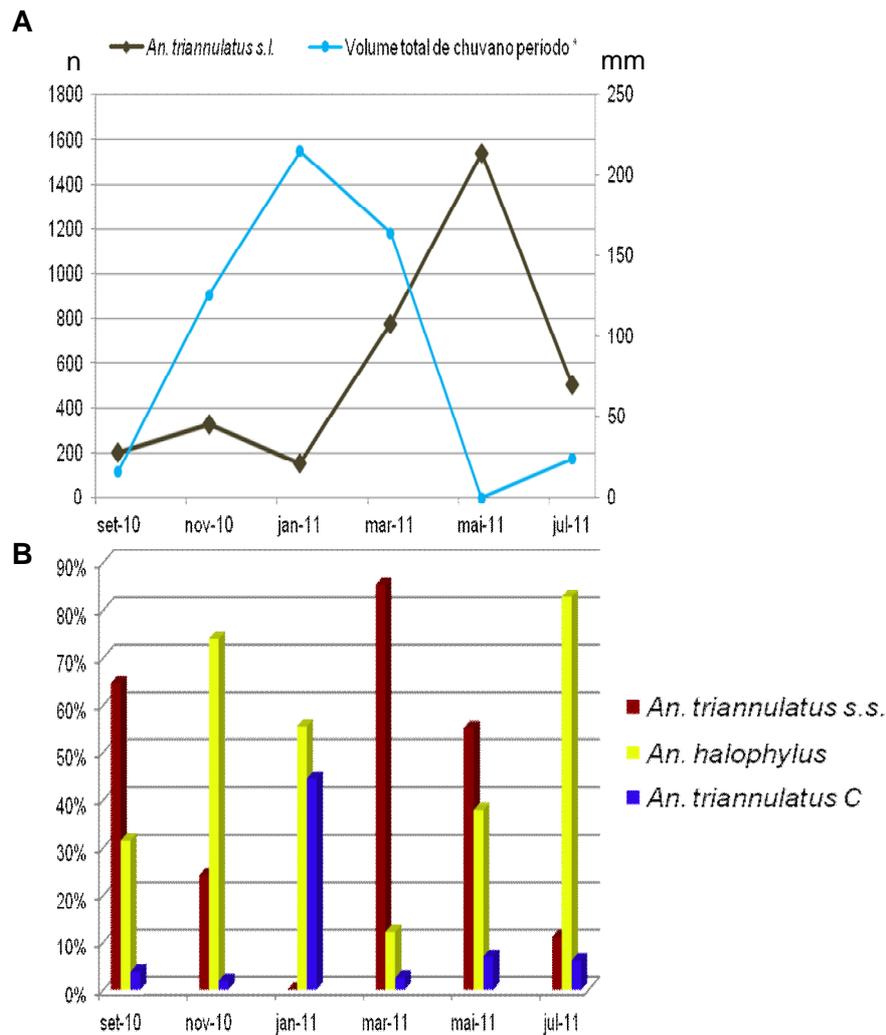


Figura 4.3. Variação bimestral de *An. triannulatus s.l.* (A) e contribuição percentual de *An. triannulatus s.s.*, *An. halophylus* e *An. triannulatus C* (B) em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. **A**: O número de indivíduos em cada mês corresponde ao total capturado nos três pontos de coleta sistemáticos, entre 17h e 20h. Em azul, é mostrado volume total de chuva no período* considerado. **B**: Contribuição percentual de *An. triannulatus s.s.*, *An. halophylus* e *An. triannulatus C*, calculada sobre uma amostra de indivíduos proveniente do total de *An. triannulatus s.l.* coletado em cada mês.

* Período: dos 15 dias anteriores ao 1º dia da coleta até o 5º dia da mesma.

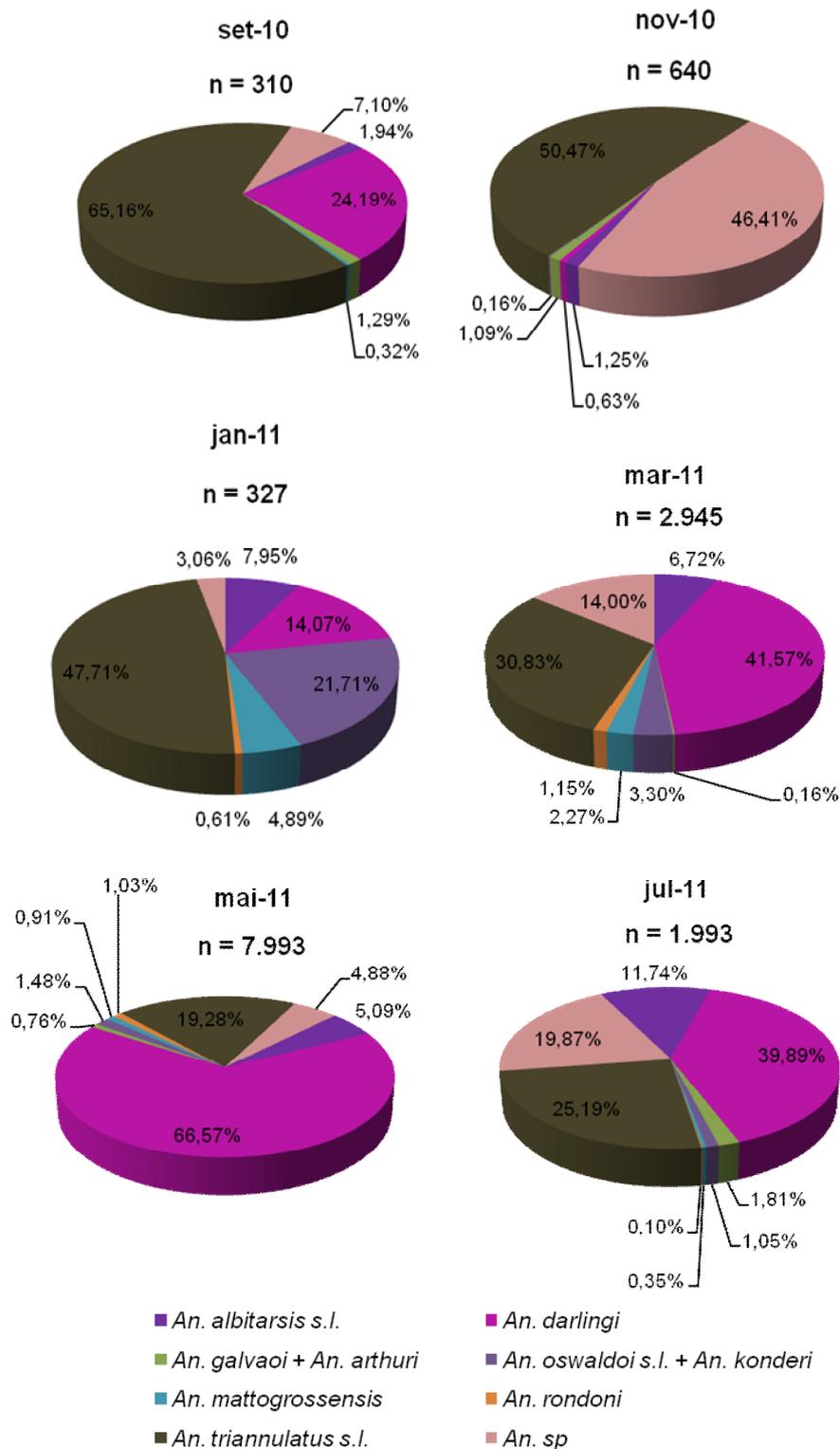


Figura 4.4. Contribuição percentual das espécies em cada mês de coleta (setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011) e no total dos meses em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Foram considerados os indivíduos capturados nos três pontos de coletas sistemáticas, entre 17h e 20h, durante cinco dias em cada mês.

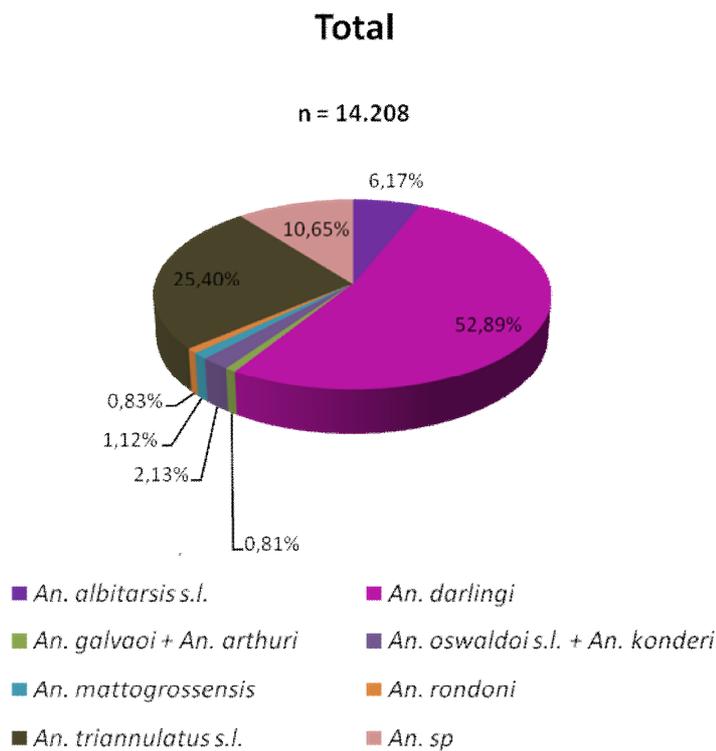


Figura 4.4 (Continuação). Contribuição percentual das espécies em cada mês de coleta (setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011) e no total dos meses em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Foram considerados os indivíduos capturados nos três pontos de coletas sistemáticas, entre 17h e 20h, durante cinco dias em cada mês.

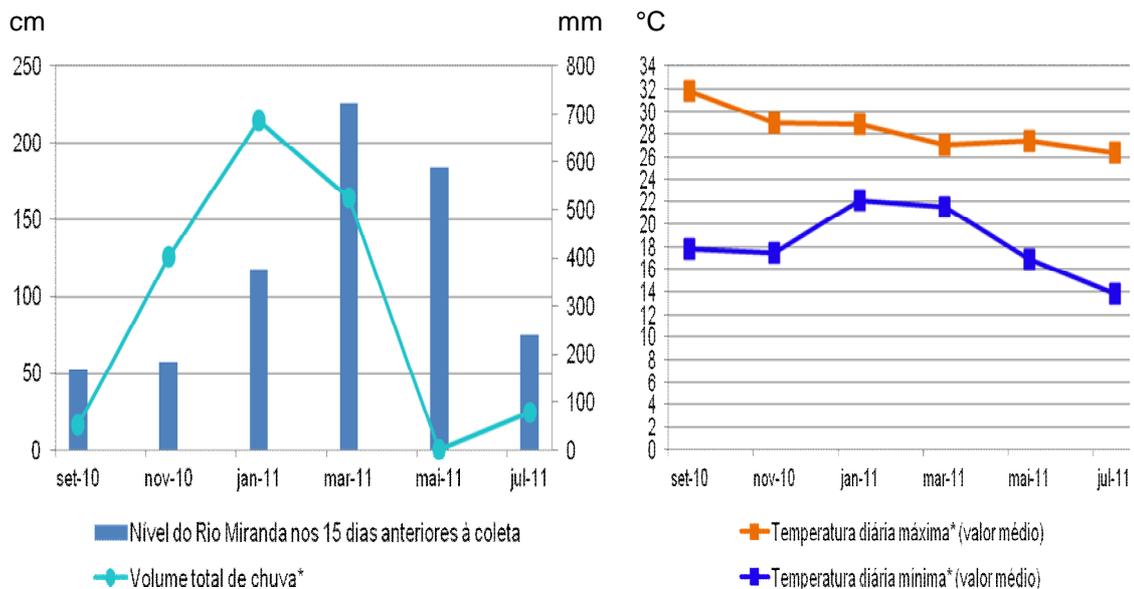


Figura 4.5. Níveis de água do Rio Miranda, volumes de chuva e temperaturas máxima e mínima nos períodos considerados nos meses de setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, no município de Miranda, MS. No gráfico à esquerda: nível de água do Rio Miranda (em cm) nos 15 dias anteriores à coleta em cada mês, e volume total de chuva (em mm) em Miranda no período*. No gráfico à direita: temperatura diária máxima e mínima (valor médio para o período*). Dados fornecidos pela Agência Nacional de Águas.

* Período: dos 15 dias anteriores ao 1º dia da coleta até o 5º dia da mesma.

4.3. Variação horária da frequência dos anofelinos

A frequência horária de picadas de cada espécie (ou complexo) nos meses de março, maio e julho, no extradomicílio, é apresentado nas Figuras 4.6-4.13.

Essencialmente, os picos de maior atividade hematofágica de *An. darlingi* ocorreram no crepúsculo matutino e nos momentos peri-crepusculares ao amanhecer. Na coleta de março de 2011 (início do outono), observou-se um ligeiro aumento na densidade de *An. darlingi* entre 4h e 5h da manhã, horário em que foi capturado o maior número de indivíduos. Em maio (final do outono), o maior número de anofelinos desta espécie foi capturado no horário de 6h a 7h da manhã. Em julho (início do inverno), houve um pico único e bastante nítido de 6h a 7h. Dois ligeiros picos secundários em março (18-19h e 23-00h) e dois em julho (18-19h e 00-01h) podem ser observados. Em maio, o ciclo de picadas apresentou-se muito irregular, com diversos picos e quedas bruscas no número de *An. darlingi*, ao longo da noite e

da madrugada. Entretanto, mesmo quando ocorreu a diminuição acentuada no número de mosquitos, este não ficou abaixo de 150 por horário neste mês (Figuras 4.6 e 4.7).

Anopheles triannulatus s.l. apresentou um pico de atividade de 18h a 19h nas três coletas de 18 horas seguidas, mas também um pico próximo ou ao amanhecer, sendo 4h a 5h em março e 6h a 7h em maio e julho. Ao longo da madrugada, a atividade de *An. triannulatus s.l.* variou entre os meses, não apresentando um padrão (Figura 4.8). Para as demais espécies, o número de indivíduos capturados não ultrapassou 25 por horário em todos os meses, não sendo possível avaliar o padrão de atividade hematofágica devido à baixa amostragem. Desse modo, as atividades horárias das demais espécies são aqui apresentadas apenas com intuito ilustrativo, principalmente pelo fato de que não se tem disponível na literatura dados sobre este aspecto comportamental de algumas delas (Figuras 4.9 a 4.13).

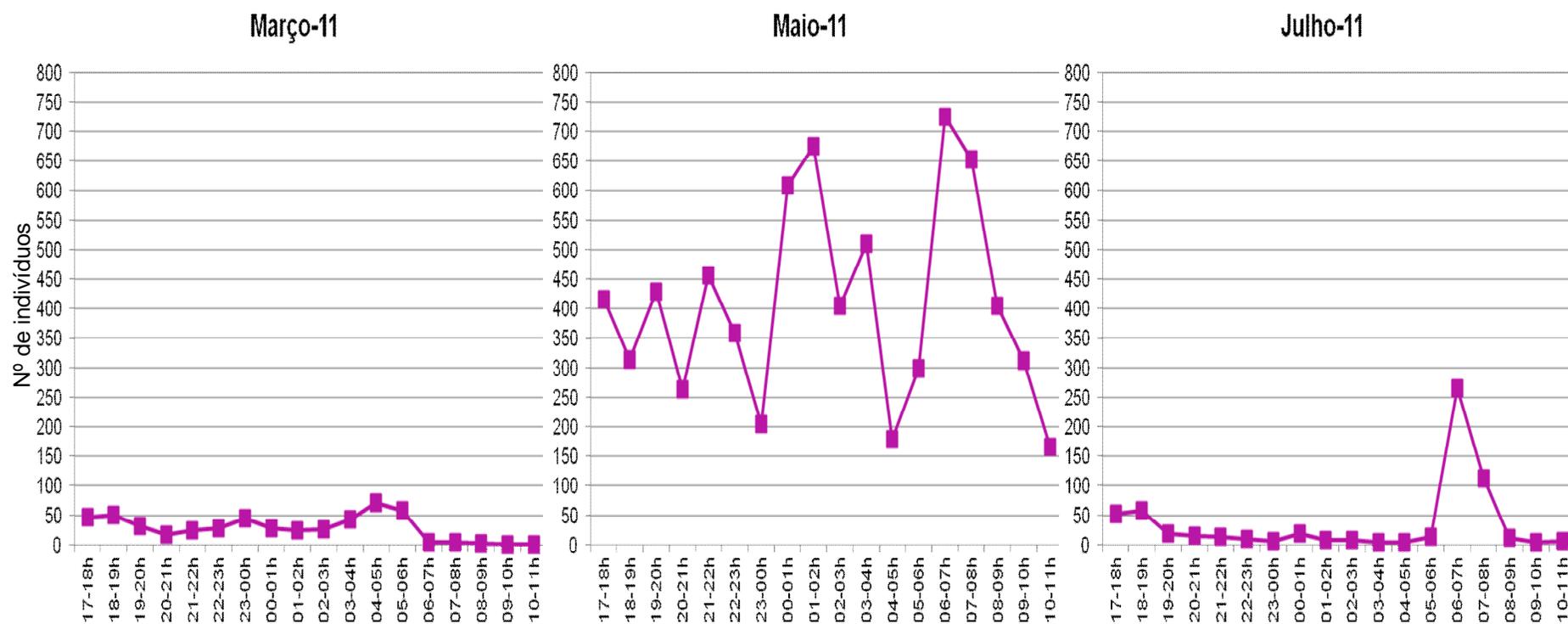


Figura 4.6. Ciclo de picadas de *An. darlingi*, em números absolutos, entre 17h e 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

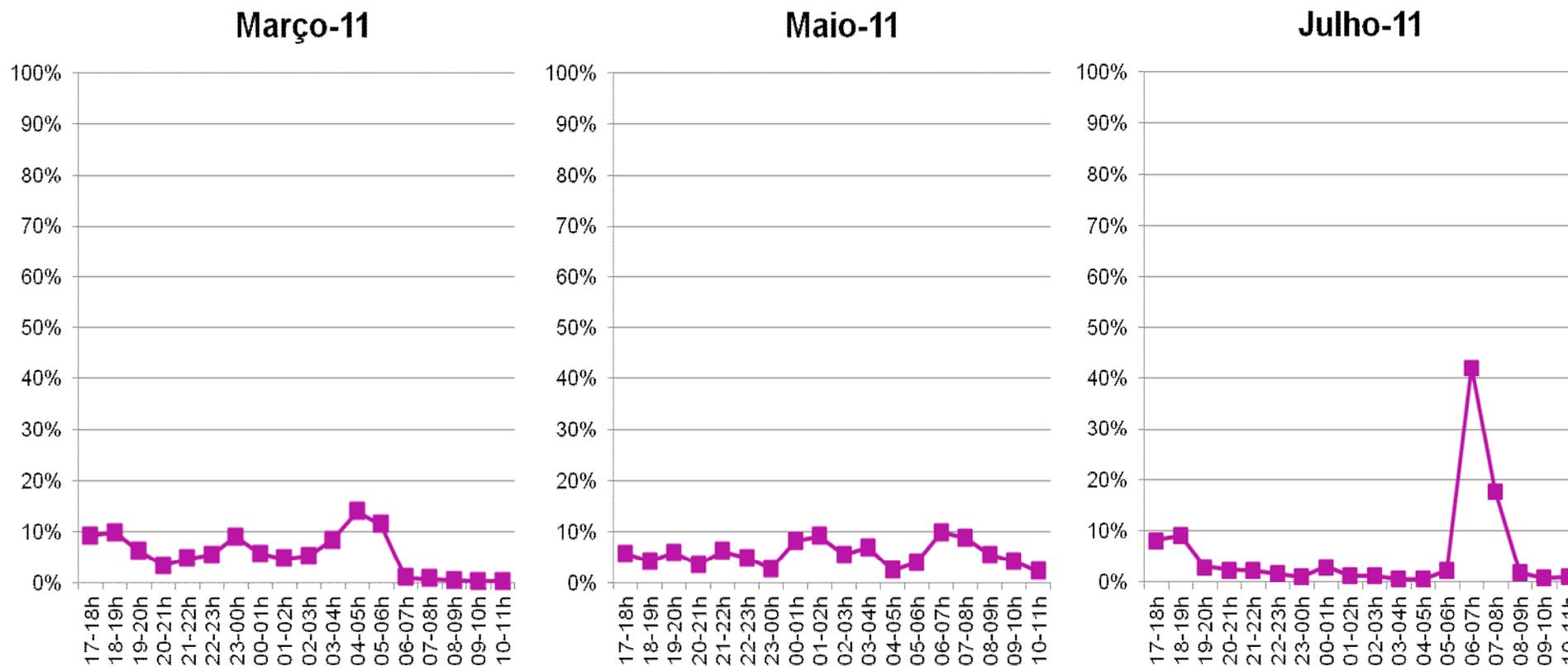


Figura 4.7. Ciclo de picadas de *An. darlingi*, em valores percentuais, entre 17h e 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

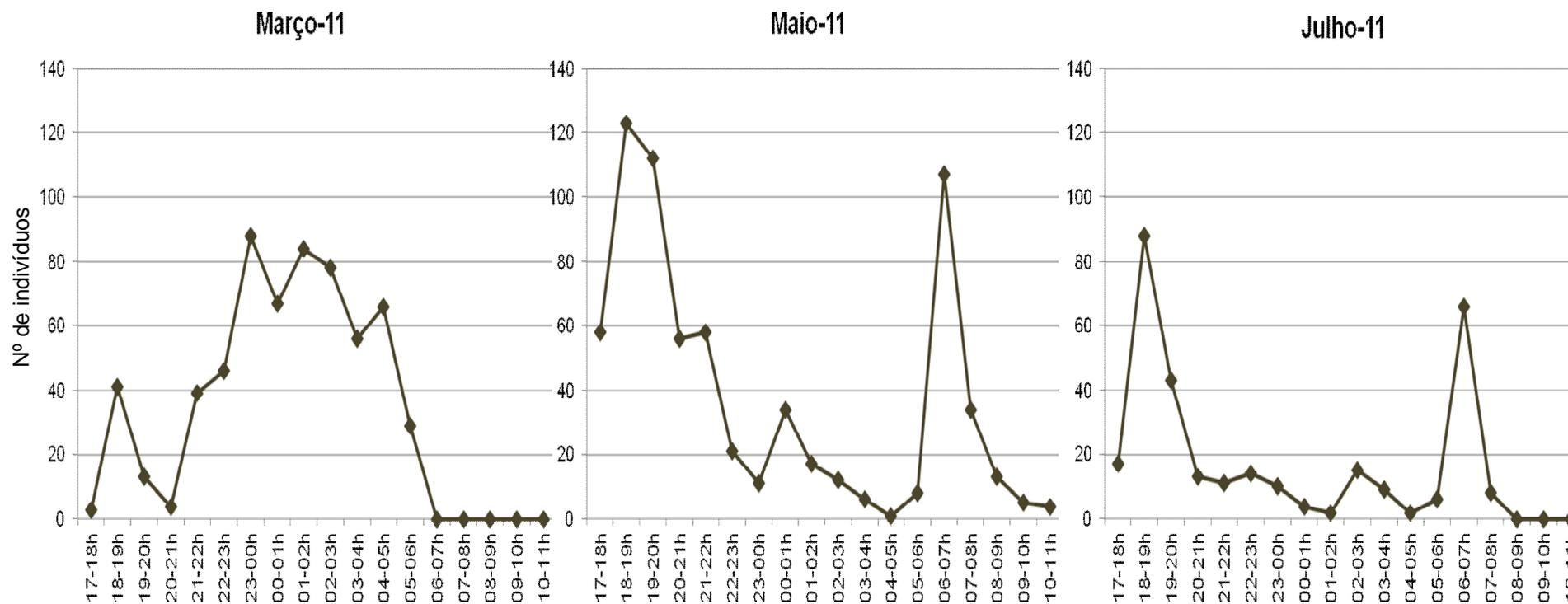


Figura 4.8. Ciclo de picadas de *An. triannulatus* s.l. de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

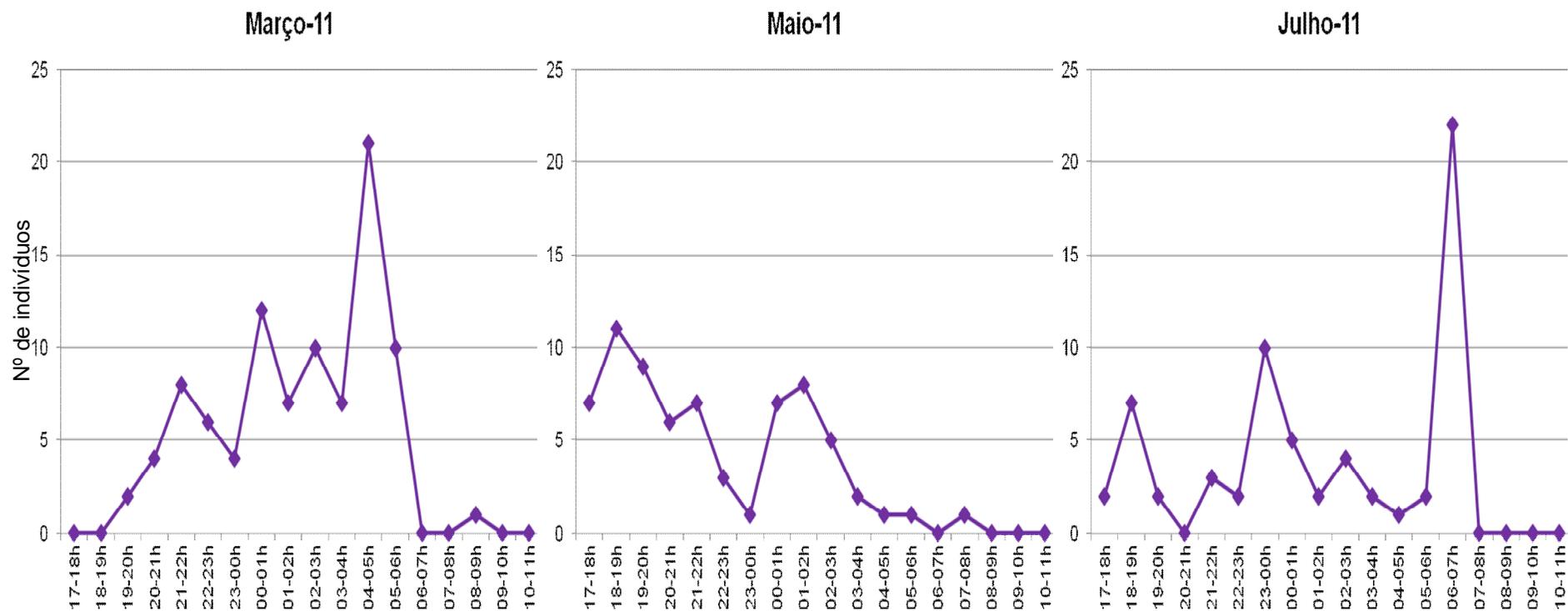


Figura 4.9. Ciclo de picadas de *An. albitarsis s.l.* de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Ciclo de picadas apresentado apenas com intuito ilustrativo, devido à baixa amostragem de indivíduos.

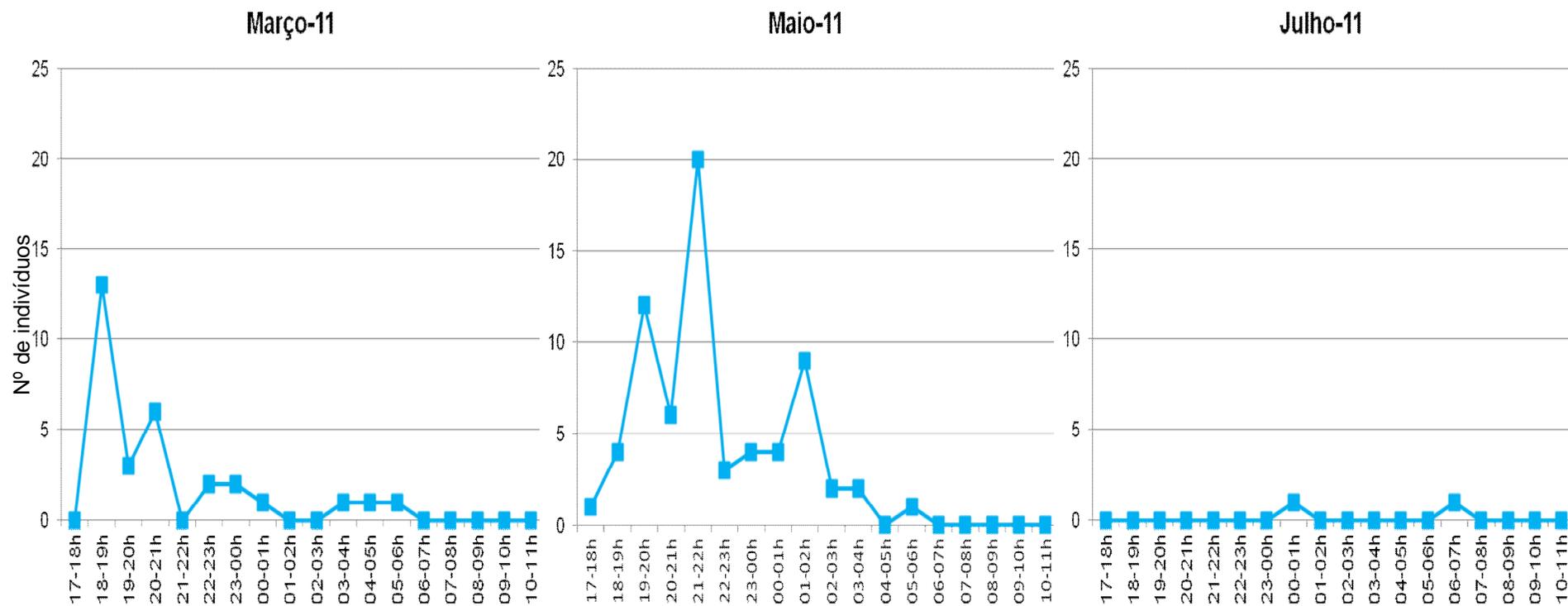


Figura 4.10. Ciclo de picadas de *An. mattogrossensis* de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Ciclo de picadas apresentado apenas com intuito ilustrativo, devido à baixa amostragem de indivíduos.

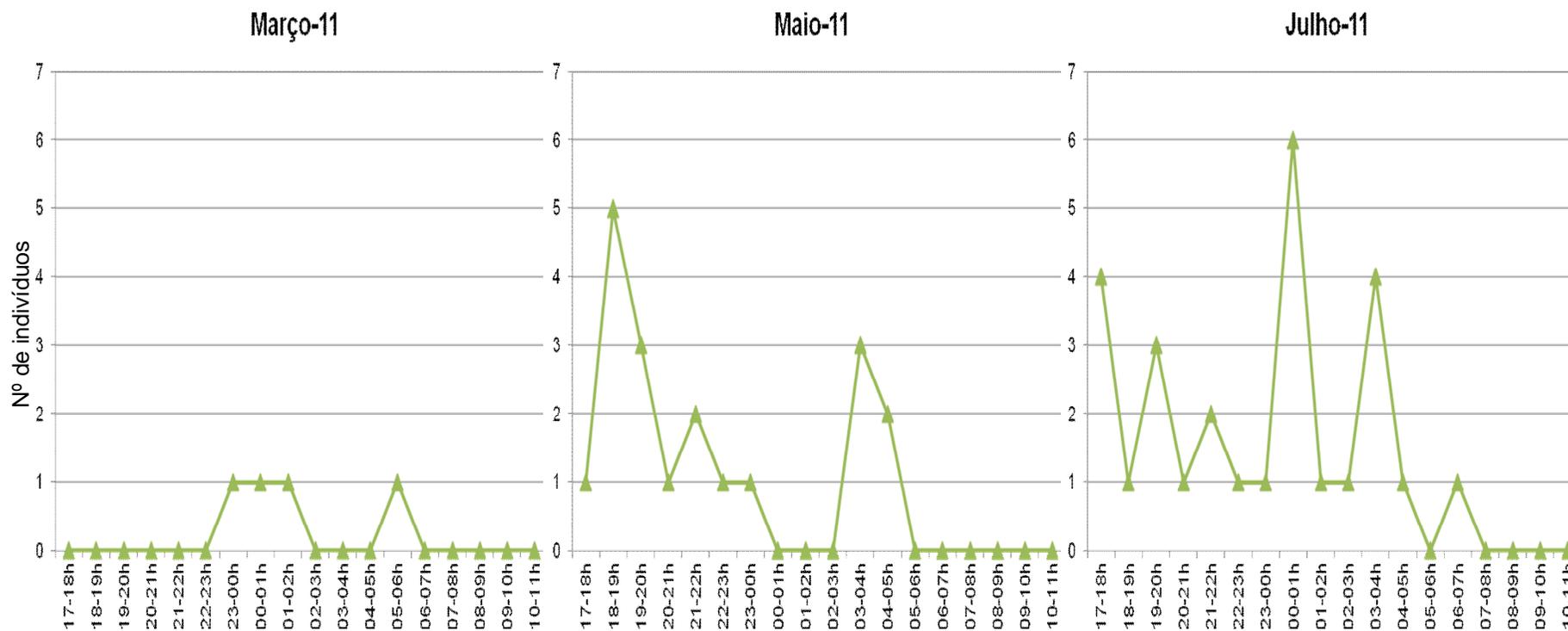


Figura 4.11. Ciclo de picadas de *An. galvaoui* + *An. arthuri* de 17h a 11h, no extradomicílio nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Ciclo de picadas apresentado apenas com intuito ilustrativo, devido à baixa amostragem de indivíduos.

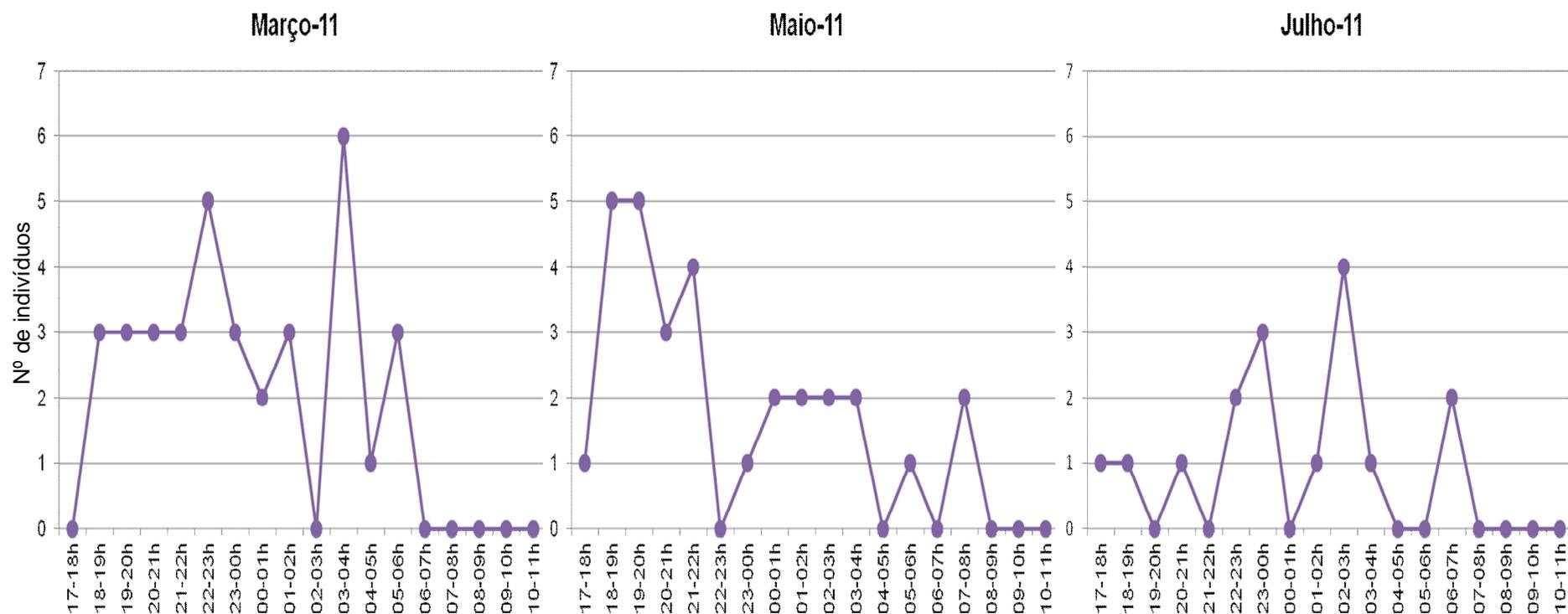


Figura 4.12. Ciclo de picadas de *An. oswaldoi* s.l. + *An. konderi* de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Ciclo de picadas apresentado apenas com intuito ilustrativo, devido à baixa amostragem de indivíduos.

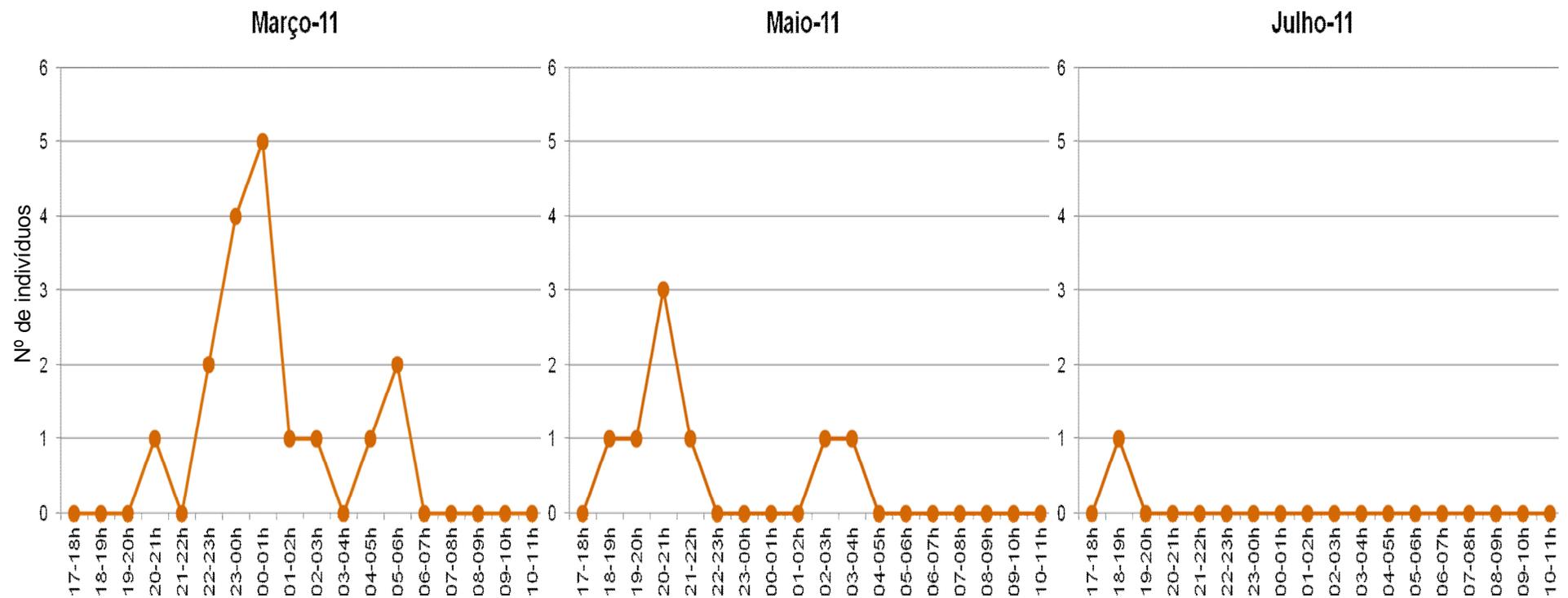


Figura 4.13. Ciclo de picadas de *An. rondoni* de 17h a 11h, no extradomicílio, nos meses de março, maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Ciclo de picadas apresentado apenas com intuito ilustrativo, devido à baixa amostragem de indivíduos.

4.4. Composição etária

Foram dissecados 309 mosquitos, amostrados aleatoriamente, do total coletado no extradomicílio nos meses de maio (n = 136) e julho (n = 173) (Figura 4.14). A proporção de fêmeas de *An. darlingi* paridas não variou essencialmente entre os dois meses de observação, estando entre 38-40%. Ou seja, de 121 fêmeas de *An. darlingi* dissecadas em maio, 73 (60,33%) eram nulíparas e 46 (38,02%) já tinham parido ao menos uma vez. Em julho, a proporção de nulíparas foi de 57,69% e a de paridas, 39,74% (Figura 4.15). Em maio e julho, foram dissecadas 6 e 83 fêmeas de *An. triannulatus s.l.*, respectivamente. Em julho, a proporção de paridas nesta espécie foi bem maior que em *An. darlingi*, isto é, 60,24% (Figura 4.16). Nestas figuras aparecem como indeterminados os ovários de fêmeas cujo estágio de desenvolvimento do ovário estava muito avançado, impedindo a determinação exata do enovelamento ou não das traqueíolas.

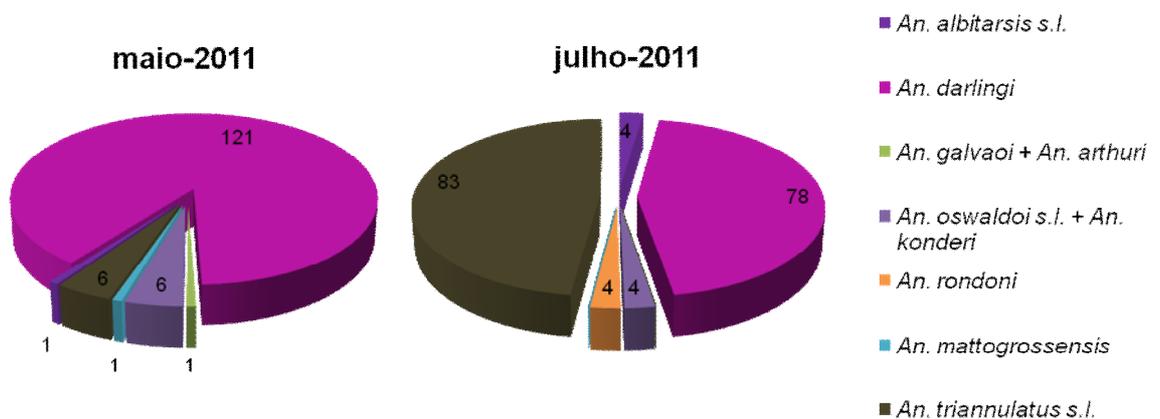


Figura 4.14. Número de fêmeas, por espécie, que tiveram seus ovários dissecados nos meses de maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Todos os indivíduos foram capturados no extradomicílio.

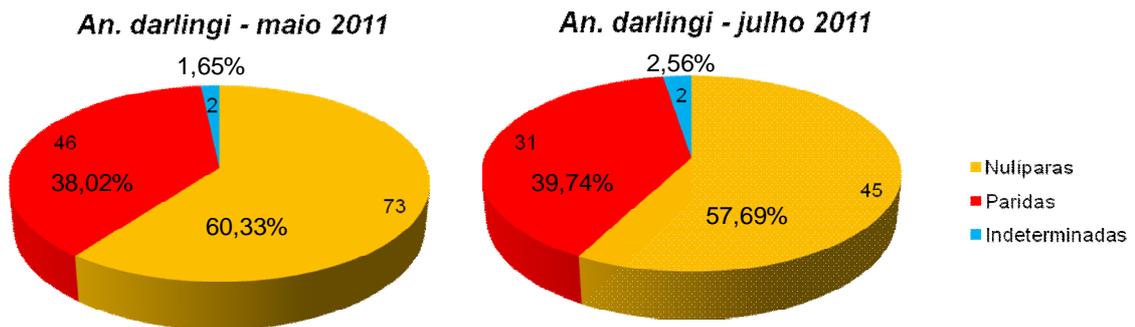


Figura 4.15. Número de fêmeas de *An. darlingi* nulíparas e paridas, capturadas no extradomicílio, em maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

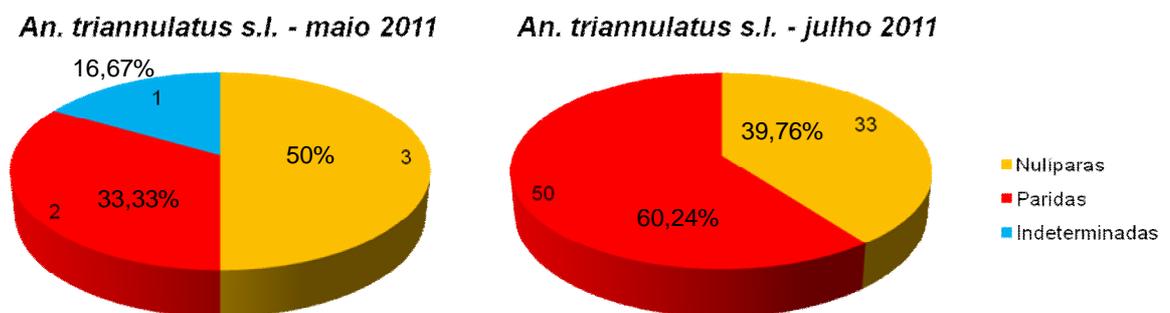


Figura 4.16. Número de fêmeas de *An. triannulatus s.l.* nulíparas e paridas, capturadas no extradomicílio, em maio e julho de 2011, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

4.5. Distribuição dos anofelinos no intra, peri e extradomicílio

As coletas comparativas e simultâneas nos três ambientes indicaram considerável diferença de frequência de picadas, em animal, no extradomicílio, e em humanos no peridomicílio e nas paredes da casa, com grande vantagem para as primeiras, sugerindo que as espécies de anofelinos de Salobra, incluindo *An. darlingi*, apresentam hábitos essencialmente exofágicos (Tabela 4.4 e Figura 4.17). Na Figura 4.17, observa-se que praticamente não há diferença entre a composição da fauna anofélica coletada nos três ambientes. Exceto por *An. rondoni*, que nunca foi coletado dentro da casa, as demais espécies foram detectadas, embora em diferentes números e proporções, tanto dentro da casa quanto no peridomicílio com atrativo humano protegido e no fragmento de mata ciliar em cavalo. Na Figura 4.18, a distribuição das espécies nos três ambientes é mostrada em cada mês individualmente. A curva sazonal das espécies, apresentada na Figura 4.3, reflete, essencialmente, a variação da frequência extradomiciliar nos diferentes meses.

Cabe ressaltar que as coletas sistemáticas feitas em atrativo humano protegido nos seis meses de coleta foram pouco produtivas. Já as coletas diretamente em atração humana, realizadas apenas em maio (um dia) e julho (dois dias), foram mais produtivas em termos quantitativos. Dessa forma, o número de anofelinos picando o homem no ambiente peridomiciliar é muito provavelmente maior do que o resultado apresentado na Tabela 4.4 e na Figura 4.17.

Tabela 4.4. Comparação entre o nº de indivíduos capturados nos ambientes intra, peri (atração humana + atrativo humano protegido) e extradomiciliar (ponto sistemático), no total das coletas bimestrais entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS

	Intra	%	Peri (atração humana + atrativo humano protegido)	%	Extra (ponto sistemático)	%	Total	%
<i>An. albitarsis s.l.</i>	26	2,98	69	7,90	778	89,12	873	100
<i>An. darlingi</i>	12	0,16	84	1,15	7.221	98,69	7.317	100
<i>An. galvaoi + An. arthuri</i>	2	1,79	3	2,69	107	95,54	112	100,02
<i>An. mattogrossensis</i>	4	2,59	11	7,14	139	90,26	154	99,99
<i>An. oswaldoi s.l. + An. konderi</i>	5	1,81	30	10,87	241	87,32	276	100
<i>An. rondoni</i>	0	0	3	2,61	112	97,39	115	100
<i>An. triannulatus s.l.</i>	24	0,68	70	1,98	3.442	97,34	3.536	100

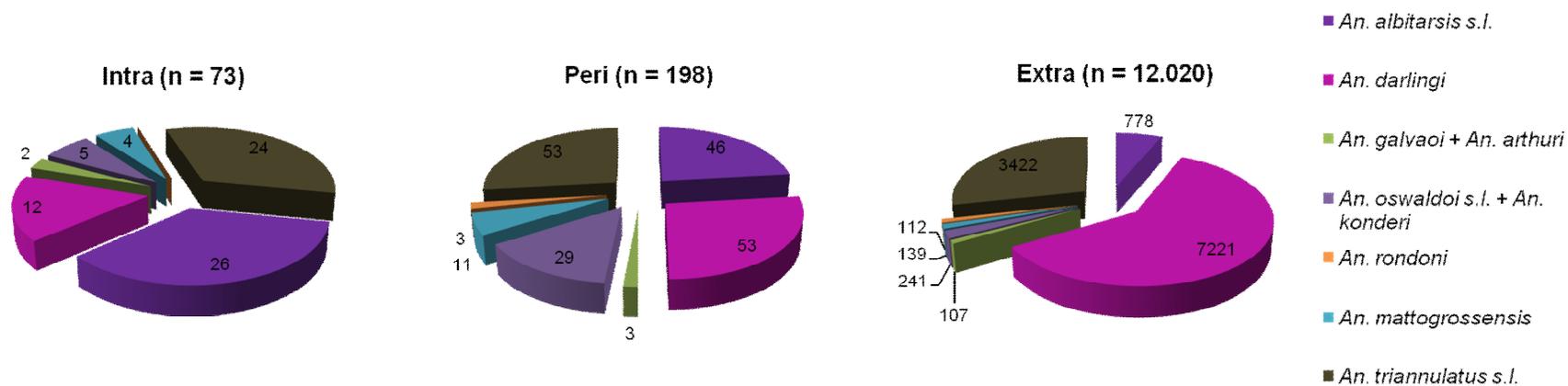


Figura 4.17. Número total de indivíduos de cada espécie capturados por ambiente [intra, peri (apenas atrativo humano protegido) e extradomiciliar], no total das coletas bimestrais (setembro e janeiro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011) entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

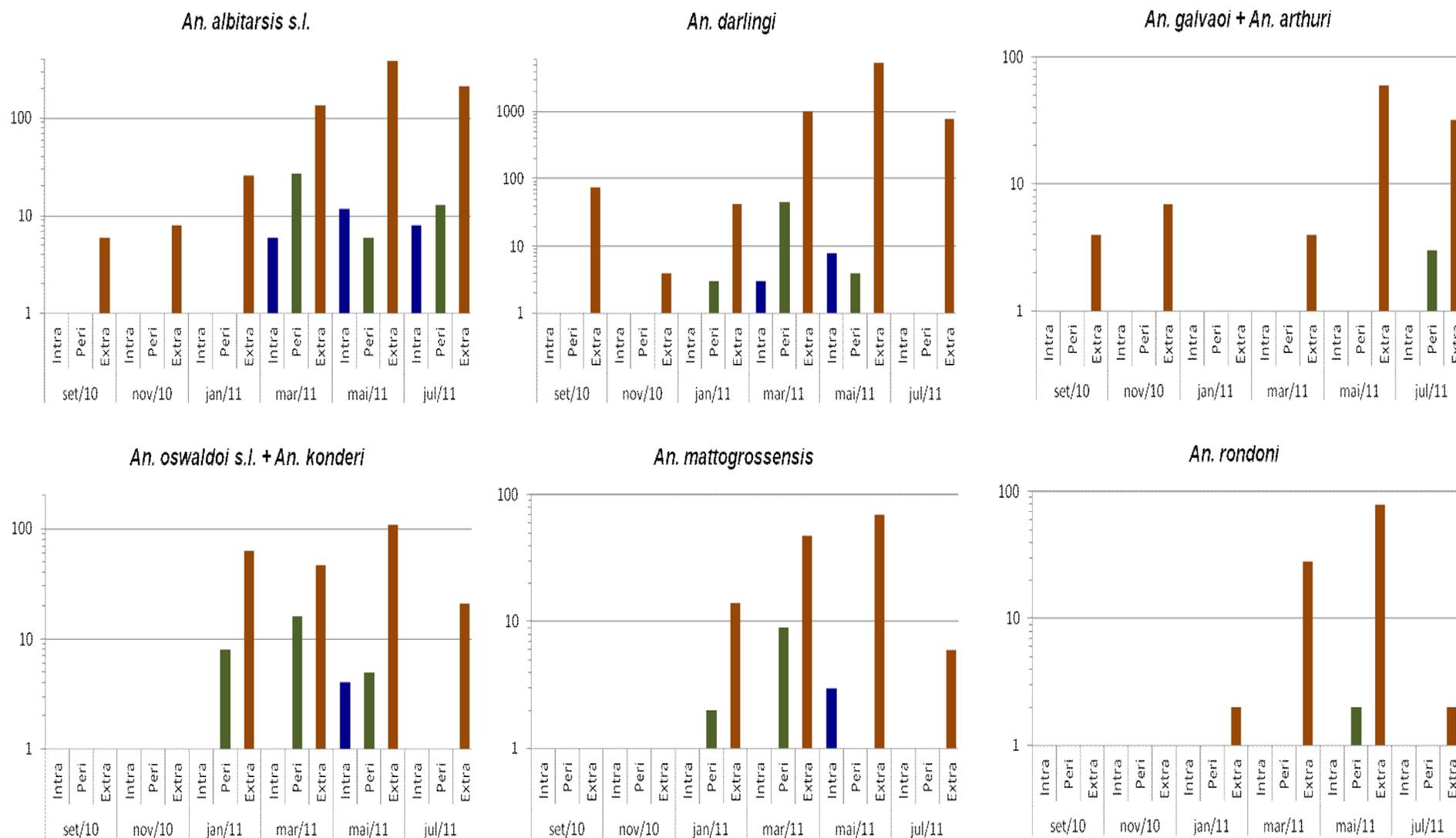


Figura 4.18. Distribuição de indivíduos, em escala logarítmica, no intra, peri (apenas atrativo humano protegido) e extradomicílio, em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

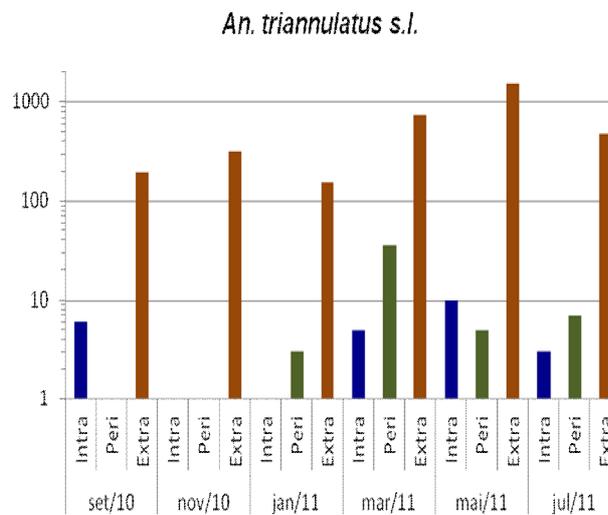


Figura 4.18 (Continuação). Distribuição de indivíduos, em escala logarítmica, no intra, peri (apenas atrativo humano protegido) e extradomicílio, em setembro e novembro de 2010, e janeiro, março, maio e julho de 2011, entre 17h e 20h, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS.

4.6. Comparação entre capturas de anofelinos feitas diretamente em atração humana e em atrativo humano protegido, e sua frequência segundo as iscas

Nas Tabelas 4.5 a 4.7, são apresentados os resultados das coletas em atração humana em comparação com aquelas realizadas no atrativo humano protegido simultaneamente, isto é, nos mesmos dias e horários. Na Tabela 4.8, os dois tipos de captura em humanos são comparados com aquela realizada no atrativo animal simultaneamente.

A atração humana e o atrativo humano protegido estiveram posicionados a cerca de 9 m de distância um do outro. Observa-se que o número de mosquitos capturado em atração humana foi expressivamente maior do que aquele capturado no atrativo humano protegido. Em uma coleta de 17h a 20h no mês de maio, foi capturado um total de 19 anofelinos em atração humana, cerca de 6 vezes mais do que no atrativo humano protegido no mesmo período. Em julho, foi capturado um total de 55 indivíduos, contra apenas 12 na armadilha.

Anopheles darlingi e *An.albitarsis s.l.* são as espécies mais antropofílicas da localidade. Ambas foram predominantes nas coletas feitas diretamente em humano no peridomicílio, com vantagens para a primeira no mês de maio. No total das coletas em atração humana não protegida, mais indivíduos *An. darlingi* (n = 31) foram capturados nesse tipo de isca do que *An. albitarsis s.l.* (n = 23) (Tabela 4.8). O mesmo não se verificou na armadilha onde também havia o atrativo humano protegido. Portanto, os resultados quantitativos e qualitativos entre as coletas feitas com os dois métodos não se assemelham. Isso significa que a frequência de mosquitos no peridomicílio observada ao longo de todo o estudo, empregando a armadilha com atrativo humano protegido, pode não corresponder qualitativa e quantitativamente à fauna anofélica que pica humanos na localidade junto à casa.

Tabela 4.5. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de maio. As duas capturas foram realizadas simultaneamente no horário de 17h a 20h

Espécie	Maio-11							
	Atração humana				Atrativo humano protegido			
	17-18h	18-19h	19-20h	Total dos 3 horários	17-18h	18-19h	19-20h	Total dos 3 horários
<i>An. albitarsis s.l.</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>An. darlingi</i>	8	3	0	11	0	0	1	1
<i>An. rondoni</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>An. triannulatus s.l.</i>	4	2	0	6	0	1	0	1
<i>An. sp</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
Total	13	6	0	19	0	2	1	3

Tabela 4.6. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de julho (1º dia). As duas capturas foram realizadas simultaneamente no horário de 17h a 20h

Espécie	Julho-11 (1º dia)							
	Atração humana				Atrativo humano protegido			
	17-18h	18-19h	19-20h	Total dos 3 horários	17-18h	18-19h	19-20h	Total dos 3 horários
<i>An. albitarsis s.l.</i>	1	4	5	10	0	1	0	1
<i>An. darlingi</i>	6	1	4	11	0	0	0	0
<i>An. galvaoi</i> + <i>An. arthuri</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>An. oswaldoi s.l.</i> + <i>An. konderi</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>An. triannulatus s.l.</i>	6	2	1	9	0	1	0	1
Total	14	7	10	31	0	3	0	3

Tabela 4.7. Número de indivíduos capturados, por espécie, em atração humana e em atrativo humano protegido, no mês de julho (2º dia). As duas capturas foram realizadas simultaneamente no horário de 17h a 20h

Espécie	Julho-11 (2º dia)				
	Atração humana*	Atrativo humano protegido			
	Total dos 3 horários	17-18h	18-19h	19-20h	Total dos 3 horários
<i>An. albitarsis s.l.</i>	12	0	2	0	2
<i>An. darlingi</i>	9	0	0	0	0
<i>An. galvaoi</i> + <i>An. arthuri</i>	0	0	2	0	2
<i>An. triannulatus s.l.</i>	2	0	1	4	5
<i>An. sp</i>	1	0	0	0	0
Total	24	0	5	4	9

* Os mosquitos desta coleta não foram separados por horário.

Tabela 4.8. Total de mosquitos de cada espécie capturado nas três coletas simultâneas (um dia em maio e dois em julho) em atração humana, em atrativo humano protegido e em atrativo animal de 17h a 20h

Espécie	Total na atração humana		Total no atrativo humano protegido		Total no atrativo animal		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>An. albitarsis s.l.</i>	23	32,39	3	4,23	45	63,38	71	100
<i>An. darlingi</i>	31	2,26	1	0,07	1.341	97,67	1.373	100
<i>An. galvaoi</i> + <i>An. arthuri</i>	0	0	3	8,33	33	91,67	36	100
<i>An. oswaldoi s.l.</i> + <i>An. konderi</i>	1	4,35	0	0	22	95,65	23	100
<i>An. rondoni</i>	0	0	1	20	4	80	5	100
<i>An. triannulatus s.l.</i>	17	2,82	7	1,16	578	96,01	602	99,99
<i>An. sp</i>	2	2	0	0	98	98	100	100

4.7. Investigações epidemiológicas sobre malária no Mato Grosso do Sul

Segundo os dados obtidos junto ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN Web/SVS/MS) e junto à Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso do Sul, de 2002 a 2011, 413 indivíduos residentes no Mato Grosso do Sul tiveram o diagnóstico de malária confirmado: 37 casos autóctones adquiridos dentro

do Mato Grosso do Sul e 376 casos de malária importada ou introduzida de outros estados (Tabela 4.9). Os casos autóctones foram registrados em diversos municípios, entre os quais destacam-se Tacuru, Nova Andradida e Sonora (Tabela 4.10). Já os casos importados foram provenientes principalmente de Rondônia, Pará e Mato Grosso (Tabela 4.11). A maioria dos indivíduos que tiveram malária importada reside no município de Campo Grande. Em 2004, houve um caso importado no município de Miranda, o qual foi, provavelmente, advindo do estado de Rondônia. Tanto os casos classificados como autóctones quanto como importados ou introduzidos foram, em sua maioria, devidos a infecções pelo *P. vivax*.

Os casos autóctones registrados de 2007 a 2011 são detalhados na Tabela 4.12. Desses, oito teriam sido adquiridos no próprio município de residência e um foi contraído em outro município dentro do estado. Os indivíduos teriam sido infectados nos seguintes municípios do Mato Grosso do Sul: Campo Grande (3 casos), Sidrolândia (1), Nova Alvorada do Sul (2), Aparecida do Taboado (1), Aquidauana (1) e Camapuã (1) (Tabela 4.12 e Figura 4.19).

Segundo consultas à Secretaria Municipal de Saúde e Saneamento de Miranda, nenhum caso de malária teria sido adquirido em Miranda nos últimos 10 anos. Entretanto, em consulta ao SINAN, verificamos que ocorreu um caso confirmado de malária importada em 2004 (nº do caso 0050281). O local provável da infecção foi o Estado de Rondônia e este indivíduo foi infectado por *P. vivax*.

Cabe ressaltar que o banco de dados do SINAN Web é atualizado periodicamente, e os dados epidemiológicos aqui apresentados foram obtidos em meados de 2011 através de consulta a esse sistema e às Secretarias Estadual e Municipal de Saúde já referidas.

Tabela 4.9. Casos de malária registrados no Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2002 e 2011

Ano	Nº de casos autóctones	Nº de casos importados	Total de casos
2002	11	31	42
2003	10	44	54
2004	4	54	58
2005	3	70	73
2006	0	61	61
2007	1	26	27
2008	0	19	19
2009	4	29	33
2010	1	21	22
2011	3	21	24
Total	37	376	413

Fonte dos dados: SINAN Web/SVS/MS.

Tabela 4.10. Número de casos autóctones anuais registrados no Mato Grosso do Sul entre 2002 e 2011, e municípios onde os indivíduos se infectaram

Ano	N	Municípios onde foi adquirida a infecção
2002	11	Tacuru (5), Sonora (3), Japorã (1), Pedro Gomes (1) e Sidrolândia (1)
2003	10	Nova Andradina (5), Sonora (3), Coxim (1) e Camapuã (1)
2004	4	Nova Andradina (1), Coxim (1) e Antônio João (1) e Alcinópolis (1)
2005	3	Tacuru (1), Ivinhema (1) e Inocência (1)
2006	0	-
2007	1	Aparecida do Taboado
2008	0	-
2009	4	Campo Grande (3) e Sidrolândia (1)
2010	1	Aquidauana
2011	3	Nova Alvorada do Sul (2) e Camapuã (1)
Total	37	

Entre parênteses, está o nº de casos.

Exceto pelo único caso de 2010, todos os demais foram adquiridos dentro do próprio município de residência do indivíduo.

Fonte dos dados: SINAN Web/SVS/MS.

Tabela 4.11. Casos importados ocorridos no Mato Grosso do Sul, entre 2002 e 2011, e municípios que receberam o maior número de casos importados em cada ano

Ano	N	Estados dos quais se originaram a maior parte dos casos importados	Município de residência dos indivíduos que adquiriram malária fora do MS*
2002	31	Pará (11)	Coronel Sapucaia e Paranhos
2003	44	Rondônia (21) e Mato Grosso (9)	Campo Grande
2004	54	Rondônia (20), Mato Grosso (11) e Pará (10)	Campo Grande
2005	70	Rondônia (44)	Campo Grande e São Gabriel do Oeste
2006	61	Rondônia (27)	Campo Grande
2007	26	Rondônia (17)	Campo Grande
2008	19	Rondônia (11) e Pará (5)	Campo Grande
2009	29	Rondônia (12) e Amazonas (4)	Campo Grande
2010	21	Rondônia (11) e Amazonas (5)	Campo Grande
2011	21	Rondônia (12) e Pará (4)	Campo Grande e Sonora
Total	376		

* São listados apenas os municípios que receberam o maior número de casos importados.

Fonte dos dados: SINAN Web/SVS/MS.

Tabela 4.12. Informações epidemiológicas sobre os casos de malária autóctone ocorridos no Mato Grosso do Sul entre 2007 e 2011

Número do caso	Sexo	Idade (em anos)	Mês/Ano dos primeiros sintomas	Mês/Ano da notificação	Município de residência	Município provável de infecção	Ocupação	Espécie de Plasmodio	Nº de parasitos por mm ³ de sangue
0010837	ND	ND	ND	?/2007	Aparecida do Taboado	Aparecida do Taboado	ND	<i>P. falciparum</i>	ND
0012949	M	39	Dez/2008	Set/2009	Campo Grande	Campo Grande	ND	<i>P. vivax</i>	99
0012951	F	2	Dez/2008	Set/2009	Campo Grande	Campo Grande	ND	<i>P. vivax</i>	99
0012954	M	45	Fev/2007	Set/2009	Campo Grande	Campo Grande	Motorista de caminhão (rotas regionais e internacionais)	<i>P. vivax</i>	99
0005732	M	45	Fev/2009	Fev/2009	Sidrolândia	Sidrolândia	ND	<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	99
0011244	M	44	Fev/2010	Mar/2010	Três Lagoas	Aquidauana	ND	<i>P. vivax</i>	10.000
0030873	M	18	Mar/2011	Abr/2011	Nova Alvorada do Sul	Nova Alvorada do Sul	Exploração de árvores e arbustos	<i>P. vivax</i>	2.500
0016632	M	52	Abr/2011	Abr/2011	Nova Alvorada do Sul	Nova Alvorada do Sul	Agropecuária	<i>P. vivax</i>	2.500
0000434	ND	ND	ND	?/2011	Camapuã	Camapuã	ND	ND	ND

ND – Não Disponível

Informações adquiridas junto à Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso do Sul.

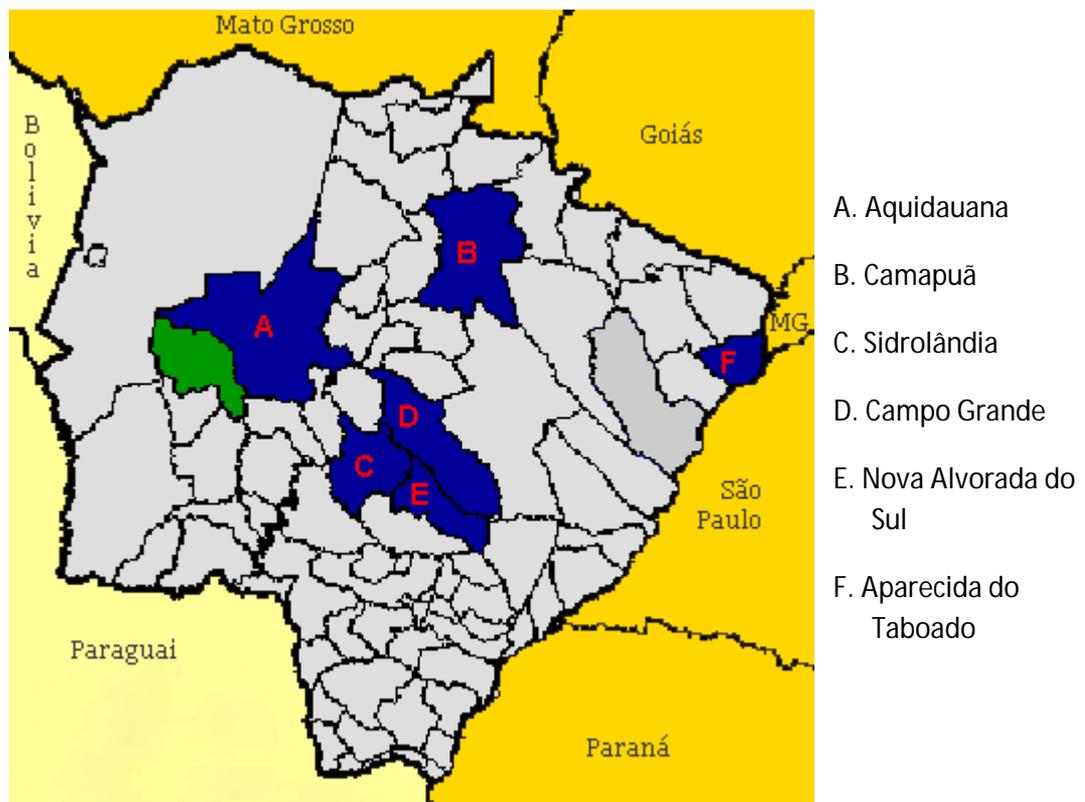


Figura 4.19. Mapa do Mato Grosso do Sul mostrando os municípios (em azul) onde foram registrados casos autóctones de malária entre 2007 e 2011. Em verde, o município de Miranda. Fonte: <http://www.mochileiro.tur.br/tres-lagoas.htm> (com modificações).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo identificou a presença de 13 espécies ou complexos de espécies de anofelinos em Salobra: *An. albitarsis s.l.*, *An. arthuri*, *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. halophylus*, *An. konderi*, *An. mattogrossensis*, *An. oryzalimnetes*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. rondoni*, *An. triannulatus C* e *An. triannulatus s.s.* Nosso estudo faz o primeiro registro da ocorrência das espécies *An. arthuri*, *An. konderi* e *An. oryzalimnetes* no Estado do Mato Grosso do Sul.

Embora não tenhamos tido a confirmação molecular, muitas fêmeas coletadas tinham características morfológicas idênticas ou muito próximas a *An. benarrochi*, *An. oswaldoi s.s.* e *An. albitarsis s.s.*, porém muito poucas puderam ser examinadas ao nível molecular para a confirmação da identificação, razão pela qual decidimos não desconsiderar a possibilidade da ocorrência das mesmas em Salobra, principalmente porque as suas respectivas distribuições geográficas são essencialmente compatíveis.

A variabilidade morfológica observada no edeago de alguns exemplares de *An. konderi* e algumas diferenças apresentadas por um grupo de fêmeas de *An. galvaoi* sugerem a existência de outras espécies ainda não descritas, necessitando-se de estudos taxonômicos mais aprofundados.

Seis das sete excursões científicas à Salobra, realizadas entre os anos de 1939 e 1942, identificaram seis espécies de anofelinos: *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi*, *An. mattogrossensis*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. rondoni* e *An. triannulatus s.l.* (Travassos & Teixeira de Freitas, 1941; Travassos, 1941a; Travassos, 1941b; Travassos, 1941c; Oliveira, 1942; Travassos & Teixeira de Freitas, 1943). Nosso estudo registra pela primeira vez a ocorrência das espécies *An. deaneorum* e *An. oryzalimnetes* em Salobra, a primeira evidenciada pela morfologia de fêmeas, genitálias masculinas e exúvias larvais, além da sequência “barcode” do gene *citocromo oxidase subunidade I*, e a segunda, pela identificação de genitália masculina e sequenciamento da mesma região do gene *COI*. No entanto, cabe ressaltar que, na época de realização das excursões, a única espécie formalmente descrita do Complexo Albitarsis era o *An. albitarsis s.s.* Assim, é possível que no início dos anos 40, já se tivesse a ocorrência em simpatria de mais de uma espécie desse complexo. Acreditamos que a maior parte da população do Complexo Albitarsis de Salobra seja composta de indivíduos *An. deaneorum* já que a maioria dos espécimes analisados morfológicamente possuíam características dessa espécie, como anel escuro basal medindo de 51 a 90% do tarsômero posterior II e

presença de anel de escamas claras na porção apical do tarsômero posterior I (Motoki *et al.*, 2009).

Foram coletadas duas fêmeas identificadas como *An. oswaldoi* s.s. em janeiro de 1941 (Travassos, 1941c) e 329 fêmeas e 13 machos identificados como pertencentes a esta espécie, em maio de 1942, em Salobra (Travassos & Teixeira de Freitas, 1943). Em nossas coletas, obtivemos 525 fêmeas de anofelinos morfológicamente identificáveis como pertencentes ao Complexo Oswaldoi, podendo corresponder tanto a *An. oswaldoi* s.s. como *An. konderi*. Porém, o exame dos caracteres morfológicos da genitália de 22 exemplares machos correspondentes ao Complexo Oswaldoi coletados em Salobra eram semelhantes aos de *An. konderi*.

Anopheles konderi, tendo características morfológicas das fêmeas e formas imaturas muito semelhantes ao *An. oswaldoi* s.s., por muito tempo foi considerado sinonímia dessa espécie (Lane, 1953). Entretanto, vários outros autores os consideravam como espécies distintas (Deane *et al.*, 1946, 1948; Causey *et al.*, 1946). Em 2004, *An. konderi* foi removido da sinonímia, com eleição de um neótipo e descrição detalhada dos adultos, genitália masculina e formas imaturas, com considerações sobre ambas as espécies (Flores-Mendoza *et al.*, 2004). Distinção morfológica importante entre *An. oswaldoi* s.s. e *An. konderi* foi verificada na forma do ápice do edeago (Flores-Mendoza *et al.*, 2004). Estudos comparativos da genitália de um topotipo de *An. konderi* de Coari (AM) com exemplares coletados no Amapá e no Acre evidenciaram maior semelhança entre os espécimes de Coari e do Amapá (Bergo *et al.*, 2007). Recentemente foi feita a recharacterização morfológica e molecular do *An. oswaldoi* s.s. a partir de espécimes coletados na Mata Atlântica, nos Estados do Espírito Santo e São Paulo (Motoki *et al.*, 2007).

Com o objetivo de confirmar a ocorrência de *An. oswaldoi* s.s. em Salobra, sete machos coletados em 1942 em Salobra e depositados na Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, foram cuidadosamente revistos por nós. A montagem da genitália de quatro desses machos revelou caracteres morfológicos idênticos aos espécimes coletados por nós, ou seja, correspondem aos descritos na literatura atual como *An. konderi*. Ressalta-se que o artigo com a primeira descrição do *An. konderi* se deu no final de 1942, pouco antes da realização da publicação de Travassos & Teixeira de Freitas (1943). Além disso, ressalta-se novamente que esta espécie foi colocada em sinonímia com *An. oswaldoi* s.s. por Lane em 1953, tendo sido restabelecida como uma espécie distinta somente 51 anos depois, por Flores-Mendoza *et al.* (2004). Conclui-se assim que, até o momento atual, não existe

confirmação da presença de *An. oswaldoi* s.s. na região de Salobra. Mas também não podemos descartar a possibilidade da ocorrência desta espécie nesta localidade, uma vez que a distribuição da mesma essencialmente abrange grande parte da América do Sul e também porque não pudemos submeter todos os exemplares às análises moleculares e nem realizamos coletas em diferentes ecossistemas na localidade, como o interior de grandes matas, local de preferência de *An. oswaldoi* s.s. Desse modo, os indivíduos denominados *An. oswaldoi* por S. J. Oliveira (in Travassos 1941c e Travassos & Teixeira de Freitas, 1943), nós chamaremos, deste ponto em diante, de *An. oswaldoi* s.l. + *An. konderi* ou simplesmente *An. oswaldoi* s.l.

A ocorrência de *An. galvaoi* em Salobra é registrada pela primeira vez no presente estudo. Além da identificação morfológica de fêmeas adultas, a presença desta espécie foi também confirmada por meio da genitália de dois machos capturados em campo e de uma exúvia larval obtida a partir da desova de uma fêmea coletada na região. Além disso, as sequências da região “barcode” do gene *COI* de três fêmeas corresponderam a *An. galvaoi*. O presente trabalho também registra, pela primeira vez, a ocorrência de *An. arthuri* na localidade de Salobra. Esta espécie, retirada de sinonímia com *An. strodei* por Sallum *et al.* em 2010, foi identificada pela sequência “barcode” (*COI*) de uma fêmea classificada morfológicamente como *An. galvaoi*. De fato, fêmeas destas duas espécies se confundem em sua morfologia e, até o momento atual, só podem ser perfeitamente diferenciadas por caracteres do ovo e da genitália masculina.

Em relação ao *An. rondoni*, destacamos que, em Salobra, ocorre a presença de indivíduos sem a mancha escura basal no tarsômero posterior III, caráter primeiramente descrito por Wilkerson *et al.* (1995b) em uma população de *An. rondoni* de Peixoto de Azevedo, no Mato Grosso. Entretanto, a maioria dos indivíduos identificados como *An. rondoni* em nossa amostra corresponderam àqueles com mancha escura basal no referido tarsômero.

Dentre os cinco dias de coleta no extradomicílio em cada mês, houve sempre um dia em que um número expressivamente maior de anofelinos foi capturado. A grande variação na densidade de anofelinos dentro de poucos dias foi também observada por Lauro Travassos em 1940, que relata: “... os mosquitos tiveram sua frequência muito irregular, havendo noites quasi (*sic*) sem mosquitos e outras em

que eles eram insuportáveis, dependendo este fato da maior ou menor rapidez na queda (*sic*) da temperatura.” (Travassos, 1941b).

Comparando-se a variação sazonal de setembro de 2010 a julho de 2011 com as coletas realizadas nos mesmos meses (exceto julho*) entre 1940 e 1942, foram obtidos resultados semelhantes, com o maior número de anofelinos, das seis espécies, capturado no mês de maio (Travassos & Teixeira de Freitas, 1941; Travassos, 1941a; Travassos, 1941b; Travassos, 1941c; Oliveira, 1942; Travassos & Teixeira de Freitas, 1943) (Figura 5.1).

* No relatório referente à coleta de julho de 1939, não foi apresentado o nº de indivíduos coletados, apenas as espécies: *An. albitarsis* s.l., *An. darlingi* e *An. triannulatus* s.l.

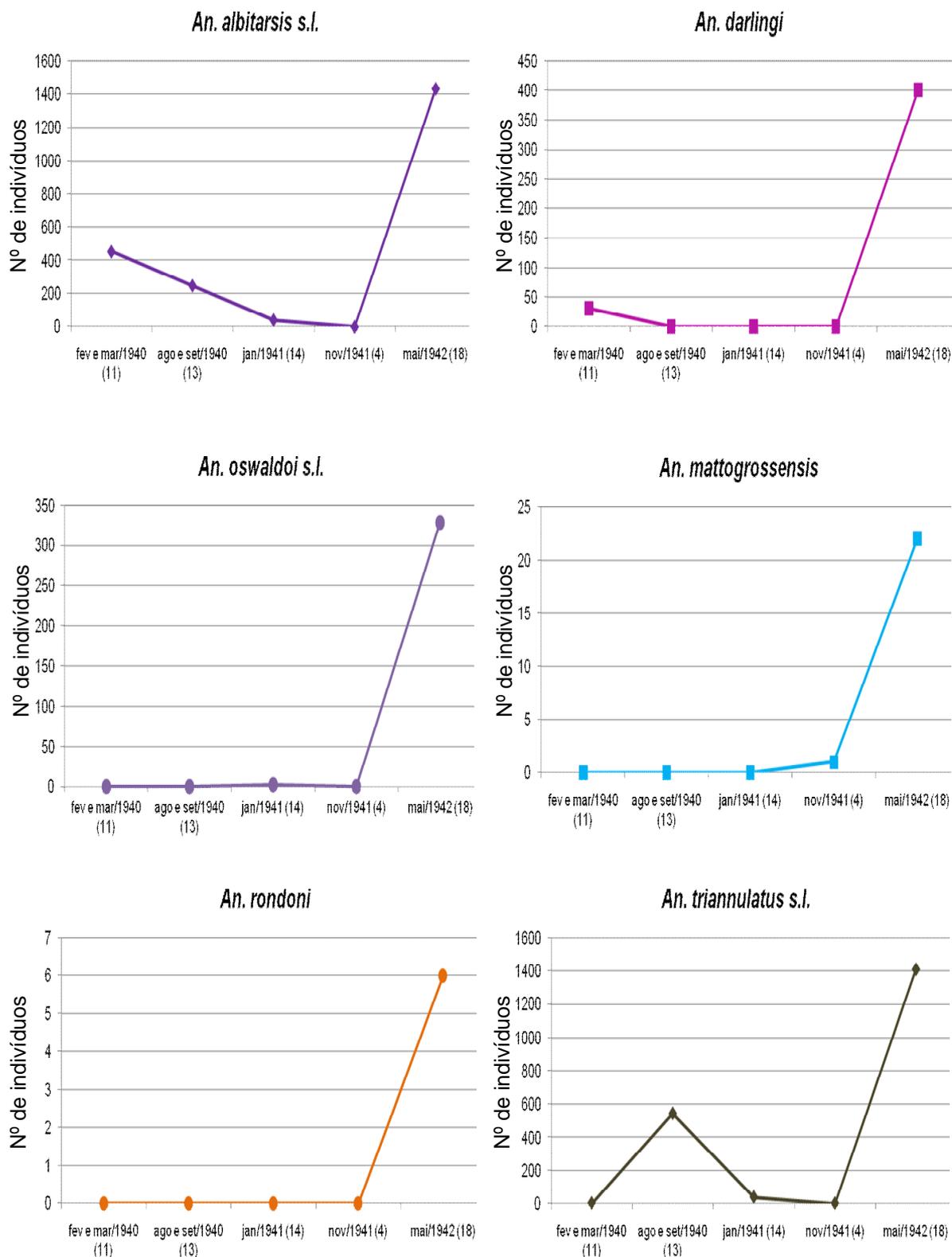


Figura 5.1. Variação sazonal das espécies *An. albitarsis s.l.*, *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. mattogrossensis*, *An. rondoni* e *An. triannulatus s.l.* observada pelas excursões científicas realizadas entre 1940 e 1942, e lideradas por Lauro Travassos, em Salobra, Pantanal de Miranda, MS. Entre parênteses, encontra-se o número aproximado de dias de coleta em cada período.

Em nosso estudo, as espécies mais abundantes no total das coletas foram *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.* Comparando-se com as demais espécies, a frequência relativa de *An. darlingi* foi maior em março, maio e julho, período em que o Pantanal encontra-se alagado. Já *An. triannulatus s.l.* foi, proporcionalmente, mais abundante nos meses de setembro, novembro e janeiro, em relação às outras espécies (Figura 4.4). Entretanto, *An. triannulatus s.l.* inclui três espécies, as quais tem dinâmica populacional diferente, conforme relatado por Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira (2007). A observação sobre a dinâmica do *An. darlingi* está de acordo com informações da literatura, que afirmam que a abundância dessa espécie está relacionada com a presença de grandes corpos d'água, os quais se formam após o período de chuva no Pantanal (Deane *et al.*, 1948).

Em capturas simultâneas em atrativo animal, atração humana e atrativo humano protegido entre 17h e 20h, dos 1.373 indivíduos capturados, 97,67% foi coletado picando o cavalo ou repousado na armadilha Shannon. Em contrapartida, apenas 1 e 31 indivíduos (2,33%) foram capturados em atrativo humano protegido e não protegido, respectivamente, ambos localizados no peridomicílio (Tabela 4.8).

Estes dados sugerem, simultaneamente, que a frequência de anofelinos era, nesta ocasião, bem mais elevada na margem do rio que nas proximidades da casa. Porém, os atrativos empregados eram diferentes segundo a localização, o que, em parte, traz limitações às comparações quanto à sinantropia e antropofilia das espécies locais.

Ainda assim, esses dados em particular e os demais obtidos nas amostragens bimestrais revelam que dentre os anofelinos de Salobra, *An. darlingi*, juntamente com *An. albitarsis s.l.* e *An. triannulatus s.l.*, são os que mais frequentemente atacaram humanos e mais ocorreram no domicílio e no peridomicílio. Apesar disso, a população de *An. darlingi* local também mostrou caráter zoofágico e extradomiciliar, diferente da maioria das populações desta espécie estudadas em diferentes localidades da Amazônia do Brasil, que apresentam hábito predominantemente antropofágico, picando dentro das casas e, principalmente, no peridomicílio (Deane *et al.*, 1948; Lourenço-de-Oliveira, 1989; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Klein & Lima, 1990; Quintero *et al.*, 1996; Tadei *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2007; Moutinho *et al.*, 2011). Entretanto, ressalta-se novamente aqui que o número de anofelinos (*An. darlingi* e demais espécies) capturados no ambiente peridomiciliar picando o homem está provavelmente subestimado, pois comparando-se as coletas com atrativo humano protegido, a única empregada ao

longo de todo o estudo, com aquelas feitas simultaneamente em atração humana, não foram obtidos resultados similares, tanto qualitativa como quantitativamente.

Populações de *An. darlingi* como a de Salobra, ou seja, com hábito zoofágico foram também observadas em Belém (PA) por Deane *et al.* (1948) e na Vila de Aripuanã (MT) por Charlwood (1980). A sugerida “preferência” do *An. darlingi* de Salobra pelo hospedeiro animal não humano pode ser uma adaptação do mosquito ao próprio ambiente, considerando-se que em Salobra a população humana é bastante reduzida. Desse modo, a importante característica de se alimentar preferencialmente no extradomicílio, em maiores proporções em animais que em humanos, seja protegido ou não, no peridomicílio, talvez seja um dos elementos que explicam os raros episódios de transmissão de malária atualmente na região, especialmente quando esta espécie se acha em baixa densidade populacional. Contudo, os habitantes locais, especialmente os pescadores residentes em Salobra, relataram a dificuldade em trabalharem ou frequentarem as margens dos rios à noite e especialmente ao amanhecer, devido ao ataque de numerosos anofelinos. De fato, em coletas realizadas em isca humana por Lourenço-de-Oliveira em 1985 e 1986 (dados não publicados) no mesmo local extradomiciliar onde fizemos as coletas em animal, a quantidade de anofelinos, especialmente *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.*, era elevadíssima e muito mais alta que quando as coletas foram feitas pelo mesmo autor no peridomicílio.

A variação bimestral de *An. darlingi* entre setembro de 2010 e julho de 2011 mostrou que o pico na densidade populacional se deu em maio de 2011 (final de outono, Figura 4.2), mês em que não houve chuva e no qual o nível do Rio Miranda, e o número de criadouros formados pela inundação da região, ainda se encontrava bastante alto (Figura 4.5). Em relação aos anos anteriores, o mês de maio de 2011 foi bastante atípico quanto ao volume de chuva e quanto à altura do Rio Miranda que, devido ao nível de água atingido, causou o alagamento de uma vasta área da planície do Pantanal e a formação de um número certamente maior de criadouros. Tanto em setembro de 2010 (final do período seco) como em maio de 2011 (início do período seco), foram registrados volumes de chuva muito baixos. Porém, em maio, o nível do Rio Miranda foi muito mais alto devido às chuvas ocorridas nos meses anteriores e ao represamento natural das águas, aumentando assim o número de criadouros disponíveis e conseqüentemente o número de adultos capturados (Figura 4.5). Estes fatos podem explicar o pico de frequência de *An. darlingi* registrado em maio ($n = 12.843$, Tabela 4.3).

Em um estudo sobre a dinâmica estacional de *An. darlingi* conduzido durante 12 meses no km 137 da rodovia BR-174, que liga Manaus (AM) a Boa Vista (RR), verificou-se que o pico populacional se deu no mês de setembro, final da época seca nessa região (Hayes & Charlwood, 1979). Em nosso trabalho, setembro foi um dos meses de coleta menos produtivos. Uma explicação para esta diferença pode estar na distinta topografia das regiões de Salobra e do km 137 da BR-174. Nessa localidade Amazônica, ocorrem muitos igarapés, que ficam mais estáveis na época seca, enquanto que no período chuvoso o nível dos mesmos pode variar de 2 a 3 metros em poucas horas depois de uma chuva abundante, arrastando as larvas e pupas dos criadouros ou afogando-as (Hayes & Charlwood, 1979). Salobra, como já exposto, é uma área de planície alagável. Em setembro, a precipitação atmosférica é baixa e o nível de água dos rios também é bastante baixo devido à evaporação e ao escoamento, já em seu fim, da água acumulada na planície pantaneira na estação chuvosa e início da estação seca. Dessa forma, em setembro o número de criadouros disponíveis está bastante reduzido, diminuindo assim a quantidade de anofelinos.

Em Aripuanã (MT), onde se estudou a variação sazonal de *An. darlingi* de março a junho de 1979 (Charlwood, 1980), foi observado o mesmo padrão de Salobra, com o auge populacional de *An. darlingi* ocorrendo aproximadamente no período de transição entre a época chuvosa e a época seca, embora em Aripuanã o pico dessa espécie tenha ocorrido no final de março (Charlwood, 1980).

Em Dourados (SP), Forattini (1987) observou uma das maiores densidades de *An. darlingi* em janeiro, mês em que foi assinalado o maior volume de chuva nessa região. Tal resultado contrasta com as observações em Salobra em janeiro de 2011 (início do verão e meados do período de chuvas), mês no qual também se registrou a maior precipitação, mas em que foi coletado o menor número de indivíduos da referida espécie. Nosso resultado se assemelha ao obtido na BR-174, onde não se coletou nenhum *An. darlingi* em abril, mês em que normalmente ocorre o maior volume de chuvas naquela área (Hayes & Charlwood, 1979). Demais trabalhos sobre a sazonalidade de *An. darlingi* focados principalmente na Região Norte e Centro-Oeste do Brasil são resumidos na Tabela 5.1, na qual os estudos destacados em negrito são aqueles que apresentaram resultados que se assemelham aos nossos, isto é, alta densidade no período de transição chuva-seca e baixa densidade no final da estação seca.

Entende-se que um estudo ideal para avaliação da sazonalidade de uma espécie deve compreender um período de tempo e uma frequência maiores. Todavia, nosso trabalho revelou o padrão geral de sazonalidade das espécies de anofelinos de Salobra, o qual se assemelhou àquele observado há 70 anos na mesma região.

Tabela 5.1. Trabalhos que estudaram a sazonalidade de *An. darlingi* nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Os estudos cujos resultados se assemelharam aos nossos estão destacados em negrito.

Estudo/Referência	Coletas	Maior densidade Estação (mês)	Menor densidade Estação (mês)	Local do estudo
Deane <i>et al.</i> , 1948	De 1939 a 1944	Estação chuvosa	Estação seca	Diversas localidades na Amazônia e Nordeste
Hayes & Charlwood, 1979	12 meses, de maio de 1977 a abril de 1978	Final da estação seca (Final de Setembro)	Final da estação chuvosa (Abril)	Rodovia BR-174, que liga Manaus (AM) a Boa Vista (RR)
Charlwood, 1980	4 meses, de março a junho de 1979	Final da estação chuvosa (Final de Março)	Meados da estação chuvosa (Início de Março)	Vila de Aripuanã, Mato Grosso
Tadei <i>et al.</i> , 1988	10 meses, de agosto de 1984 a maio de 1985	Estação seca (Início de Agosto)	Início e meados da estação chuvosa (Dezembro e Janeiro)	Ariquemes, Rondônia
Klein & Lima, 1990	De julho de 1986 a dezembro de 1987	Final da estação chuvosa e transição estação chuvosa-seca (março, abril e maio) e final da estação seca (Julho e Agosto)	Transição estação seca-chuvosa (Novembro a Janeiro)	Costa Marques, Rondônia
Quintero <i>et al.</i> , 1996	Bimestrais, em janeiro, março, maio, junho, outubro e dezembro de 1994	Final da estação seca (Outubro)	Estação chuvosa e maior parte da estação seca	Área de influência da hidrelétrica de Balbina, a 146 km de Manaus

Continua

Tabela 5.1 (Continuação). Trabalhos que estudaram a sazonalidade de *An. darlingi* nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Os estudos cujos resultados se assemelharam aos nossos estão destacados em negrito.

Estudo/Referência	Coletas	Maior densidade Estação (mês)	Menor densidade Estação (mês)	Local do estudo
Tadei et al., 1998	De janeiro de 1993 a agosto de 1996	Transição estação chuvosa-seca	Final da estação seca (setembro e outubro)	Manaus, Amazonas
Tadei & Dutary Thatcher, 2000	De janeiro a dezembro de 1997	Início da estação seca (Junho)	Início da estação chuvosa (Novembro e Dezembro)	Novo Airão, Amazonas
Silva-Vasconcelos et al., 2002	De maio de 1996 a abril de 1998	Estação chuvosa (abril a novembro)	Final da estação seca e transição estação seca-chuvosa (março e abril)	Boa Vista, Roraima
Souza-Santos, 2002	De abril de 1993 a novembro de 1994	Transição estação chuvosa-seca	Estação seca (Julho e Agosto)	Machadinho d'Oeste, Rondônia
Guimarães et al., 2004	Coletas bimestrais, de janeiro de 1997 a dezembro de 1999	Meados da estação chuvosa	Estação seca (julho, setembro e novembro)	Reservatório Serra da Mesa, Goiás
Barros & Honório, 2007	Coletas bimestrais de agosto 2003 a julho 2004	Meados da estação chuvosa (agosto)	Final da estação chuvosa (novembro)	Jardim das Copaíbas, a 5 km de Boa Vista
Gil et al., 2007	De janeiro de 2001 a dezembro de 2004	Final da estação chuvosa e transição estação chuvosa-seca (março, abril e maio)	Estação seca (junho a setembro)	Vila Candelária e Bate Estaca, Rondônia

Continua

Tabela 5.1 (Continuação). Trabalhos que estudaram a sazonalidade de *An. darlingi* nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Os estudos cujos resultados se assemelharam aos nossos estão destacados em negrito.

Estudo/Referência	Coletas	Maior densidade Estação (mês)	Menor densidade Estação (mês)	Local do estudo
Zeilhofer <i>et al.</i> , 2007	De maio de 2000 a setembro de 2002	Estação chuvosa	Estação seca	Hidrelétrica de Manso, Mato Grosso
Galardo <i>et al.</i> , 2009	De abril de 2003 a novembro de 2005	Transição estação chuvosa-seca (junho a agosto)	Estação chuvosa (novembro a abril)	Comunidades de São Raimundo, São João e Santo Antônio, Amapá
Silva <i>et al.</i>, 2010	Coletas bimestrais, de fevereiro de 2004 a abril de 2006	Final da estação chuvosa (abril)	Estação seca (agosto)	Hidrelétrica Peixe Angical, Tocantins
Barros <i>et al.</i> , 2011	Coletas bimestrais, em agosto e novembro de 2003 e janeiro, março, maio e julho de 2004	Final da estação chuvosa e transição chuva-seca (março e maio)	Estação seca e início da chuvosa (julho, agosto e novembro)	Rorainópolis, Roraima
Moutinho <i>et al.</i>, 2011	Maio, julho, setembro e novembro de 2008 e fevereiro de 2009	Estação chuvosa e transição chuva-seca (fevereiro e maio)	Estação seca e início da chuvosa (setembro e novembro)	Ramal do Granada, Acrelândia, Acre

De maneira geral, a população de *An. darlingi* de Salobra apresentou atividade hematofágica horária de padrão trimodal, com um pico ao crepúsculo vespertino, um geralmente bem maior próximo ou ao amanhecer, e um pico no início da madrugada (Figura 4.6). A atividade de hematofagia desta espécie foi contínua durante a noite e mostrou-se especialmente acentuada no crepúsculo matutino e nos momentos pericrepusculares ao amanhecer, nos diferentes meses em que realizamos este tipo de avaliação. A predominância da atividade do *An. darlingi* de Salobra nas primeiras horas da noite e, principalmente, ao amanhecer se assemelha ao padrão observado para essa espécie na Vila de Aripuanã, no Mato Grosso (Charlwood & Hayes, 1978) e em diversas localidades da Região Norte, como Ariquemes (RO), Costa Marques (RO) e Tucuruí (PA) (Tadei *et al.*, 1988; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Klein & Lima, 1990; Tadei *et al.*, 1998). Rosa-Freitas *et al.* (1992) também verificaram esse padrão em populações de *An. darlingi* de Juturnaíba (RJ), região próxima à localidade-tipo* dessa espécie. Em maio, mês de maior frequência desta espécie dentre os amostrados, o ciclo de picadas foi irregular, porém uma alta frequência de mosquitos foi observada em todos os horários e dois picos foram observados: um nas horas altas da noite e outro ao amanhecer, o qual se estendeu às primeiras horas da manhã. A população de *An. darlingi* de Bataguassu, no Mato Grosso do Sul, também apresentou atividade horária bastante irregular em diferentes meses (Gomes *et al.*, 2010b).

A composição etária da população de *An. darlingi* em dois períodos distintos (final do outono e início do inverno) não variou, essencialmente (Figura 4.15). Em maio, a proporção de paridas foi de 38,02% e em julho, ficou em 39,74%. O conhecimento da taxa de fêmeas paridas de uma população é de suma utilidade para a determinação da sobrevivência das mesmas, que, por sua vez, interfere na avaliação da capacidade vetorial de uma espécie, visto que a transmissão de malária depende que parte das fêmeas de uma população sobreviva o tempo equivalente ou mais do ciclo esporogônico dos *Plasmodium*. Em um estudo em Copaíbas e na Estrada 19, ambos em Roraima, Barros *et al.* (2007) verificaram um número significativamente maior de fêmeas paridas do que nulíparas de *An. darlingi*, em ambas as localidades e tanto na estação seca como na chuvosa. Em Rorainópolis (RR), Barros *et al.* (2011) observaram que no período correspondente à transição chuva-seca, a taxa de fêmeas de *An. darlingi* paridas foi de 57%,

* Localidade-tipo: local onde foi coletado o holótipo de uma espécie, sendo este o exemplar utilizado na descrição e nomenclatura da espécie.

maior do a observada em Salobra no mesmo período. Em Salobra, possivelmente, a densidade populacional de *An. darlingi* estava crescendo (seguramente em maio) ou se estabilizando, momentos em que a quantidade de fêmeas emergindo dos criadouros é elevado, diluindo o número de fêmeas mais velhas.

Em Salobra, a maior parte dos indivíduos *An. triannulatus s.l.* foi capturada ao picar o cavalo no extradomicílio (n = 3.442, Figura 4.17); apenas 77 (2,19%) indivíduos foram capturados em atrativo humano protegido ou em repouso no interior do domicílio. Hábitos zoofágicos e exofílicos são descritos para esse complexo de espécies em diferentes localidades. De um total de 15.583 *An. triannulatus s.l.* capturados por Deane *et al.* (1948) em diferentes localidades na Amazônia e Nordeste, apenas 4,6% foram coletados no interior de residências. Lourenço-de-Oliveira *et al.* (1989) também obtiveram resultados semelhantes em Ariquemes (RO), onde capturaram 87,5 *An. triannulatus s.l.* por 10 horas de captura em isca animal e apenas 0,2 e 3,6 por 10 horas de captura em intra e peridomicílio, respectivamente. Quintero *et al.* (1996), ao avaliar o grau de antropofagia e ambiente preferencial para realização da hematofagia na área da Hidrelétrica de Balbina (AM), verificaram que *An. triannulatus s.l.* preferiu picar no peridomicílio, embora poucos indivíduos tenham sido capturados nas iscas humanas posicionadas em quatro locais distintos (intra, peri e extradomicílio (no interior e na margem da mata)).

Em nosso estudo, *An. triannulatus s.l.* foi capturado em maior frequência em março e maio (Figura 4.3). Entretanto, comparando-se com as demais espécies, uma maior proporção de *An. triannulatus s.l.* foi capturada no período em que o nível do Rio Miranda esteve mais baixo (setembro e novembro) (Figura 4.4). Dessa forma, esse complexo parece apresentar maior resistência ao período de estiagem e de menor número de criadouros que outras espécies de anofelinos, por ex. *An. darlingi*. Além disso, é possível que a concentração de sais nos criadouros em evaporação favoreça alguma(s) espécie(s) do Complexo Triannulatus, como veremos à frente. Estudos realizados no Maranhão também registraram pico de atividade hematofágica desse complexo nos meses mais chuvosos, coincidente com período de maior endemicidade da malária naquela região (Rebêlo *et al.*, 1997). Em Ariquemes (RO), observou-se maior abundância de *An. triannulatus s.l.* na estação seca (Tadei *et al.*, 1988), e em Machadinho d'Oeste (RO), a maior abundância dessa espécie foi registrada no período de transição chuva-seca (Souza-Santos, 2002). No Estado de Goiás, Guimarães *et al.* (2004) registraram o pico de *An. triannulatus s.l.*

na estação seca, mas também observaram um pico em março, em um dos três anos de observação da sazonalidade de diferentes anofelinos. Galardo *et al.* (2009) observaram que o Complexo *Triannulatus* apresentou picos de frequência na transição entre a época chuvosa e a seca e também no auge da estação seca (julho a setembro). No Tocantins, Silva *et al.* (2010) verificaram a ocorrência de dois picos sazonais, um próximo do início e outro perto do final da estação seca.

A variação sazonal de cada uma das espécies do Complexo *Triannulatus* foi avaliada apenas na região de Salobra por Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira em 2007. Nesse trabalho, *An. halophylus* teve seu pico sazonal em julho (mês seco), quando os criadouros apresentaram maior estabilidade físico-química e possuíam um grau de salinidade mais elevado. Em contrapartida, essa mesma espécie apresentou menor frequência em janeiro (mês de chuvas). Tais resultados se assemelham, em parte, aos obtidos em 2010-2011 pelo presente estudo: *An. halophylus* apresentou, proporcionalmente, maior densidade em julho, porém a menor frequência foi registrada em março (Figura 4.3). Entretanto, cabe ressaltar que a amostra de indivíduos analisados isoenzimaticamente em nosso trabalho foi menor, principalmente nos meses de setembro, janeiro, março e maio. *An. triannulatus* s.s. apresentou maior densidade em maio, período de transição entre a estação chuvosa e seca, e o número mais baixo de indivíduos em janeiro (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007). Este padrão foi parcialmente observado no atual estudo: o mês de maior frequência foi março e o mês de menor frequência para *An. triannulatus* s.s. foi janeiro, mês de grande volume de chuva e, conseqüentemente, de instabilidade dos criadouros. Em relação ao *An. triannulatus* C, esta espécie foi mais abundante em julho, que, como já dito, é um mês em que os criadouros são mais estáveis na região. *An. triannulatus* C foi menos frequente em janeiro (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007), contrastando com o resultado obtido por nós, no qual o mês de janeiro foi o de maior frequência para essa espécie. No entanto, ressaltamos novamente a baixa amostragem de indivíduos do Complexo *Triannulatus* analisados isoenzimaticamente nesse mês. Todavia, chama atenção a baixa proporção de *An. triannulatus* C, bem como de *An. triannulatus* s.s., entre os indivíduos analisados no mês de julho (n total = 101), considerando que neste mesmo mês em 2006 um número similar de indivíduos das três espécies foi observado (Silva-do-Nascimento & Lourenço-de-Oliveira, 2007).

O ciclo de picadas de *An. triannulatus* s.l. mostrou um pico no horário de 18-19h nos três períodos estudados (Figura 4.8). Em março, os anofelinos dessa

espécie picaram com muita frequência à noite e ao longo da madrugada, tendo sido capturados aproximadamente 50 indivíduos em todos os horários compreendidos entre 23h e 5h. Já nos meses menos quentes (maio e julho), esse complexo apresentou alta frequência de picadas de 6h a 7h e um pico secundário no meio da madrugada (de 00h a 01h em maio; de 2h a 3h em julho). É interessante notar que, nesses dois meses, a atividade desses mosquitos teve uma elevação brusca entre 6h e 7h. Assim, a população de *An. triannulatus s.l.* de Salobra apresenta um ciclo trimodal, ao menos nos meses de temperatura amena. Em Ariquemes (RO), *An. triannulatus s.l.* apresentou atividade nas primeiras horas após o crepúsculo vespertino para então só voltar a picar no alvorecer. Sua atividade ao longo noite e da madrugada nos meses de julho e agosto em Ariquemes foi nula (Tadei *et al.*, 1988). Tadei & Dutary Thatcher (2000) e Barros *et al.* (2010) também observaram, no Pará e em Roraima, respectivamente, uma intensa atividade hematofágica de *An. triannulatus s.l.* entre 18h e 19h. Em diferentes pontos na divisa do Mato Grosso do Sul com São Paulo, *An. triannulatus s.l.* também mostrou, de modo geral, atividade acentuada no crepúsculo vespertino e nas primeiras horas da manhã (Gomes *et al.*, 2010b). A variação horária da atividade de hematofagia de cada membro do Complexo Triannulatus ainda necessita ser investigada em Salobra e em demais localidades de ocorrência dessas espécies.

Embora *An. triannulatus s.l.* já tenha sido encontrado naturalmente infectado com *Plasmodium* e seja um vetor potencial de malária, principalmente quando em altas densidades (Deane *et al.*, 1948; Arruda *et al.*, 1986; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Tadei & Dutary Thatcher, 2000; Póvoa *et al.*, 2001), não existem dados na literatura sobre sua taxa de paridade em nenhum local de ocorrência dessa espécie, ao menos no Brasil. Em Salobra, no mês de julho, foram dissecados 83 indivíduos, sendo 60,24% de paridas, um percentual maior que o de *An. darlingi* no mesmo mês (38,02%) (Figura 4.16).

O comportamento alimentar da população de *An. albitarsis s.l.* de Salobra é predominantemente zoofágico e exofílico, como registrado para populações desse complexo em outras regiões. Em Rondônia, Lourenço-de-Oliveira *et al.* (1989) capturaram o maior número de mosquitos desse complexo em atrativo animal (n = 198 ou 55,93%), mas também capturaram um número grande em atrativo humano no peridomicílio (n = 131 ou 37%), indicando que espécies do Complexo Albitarsis podem apresentar considerável antropofilia. Já a população de *An. deaneorum* de Costa Marques (RO) apresentou grau de antropofilia elevado, tendo sido coletados

quase 500 anofelinos desta espécie no interior de duas casas durante doze meses de captura (Klein & Lima, 1990). No Maranhão, *An. albitarsis s.l.* foi capturado principalmente no peridomicílio (n = 54), com apenas seis indivíduos capturados no interior de uma casa, à semelhança do ocorrido em nosso estudo (Oliveira-Pereira & Rebêlo, 2000).

Dos 73 anofelinos capturados dentro da casa no total dos meses, o maior número pertenceu ao Complexo Albitarsis [n = 26 (35,62%), Figura 4.17]. Este valor foi semelhante ao número de indivíduos *An. triannulatus s.l.* capturados no interior da residência [n = 24 (32,88%)]. Da espécie *An. darlingi*, apenas 12 indivíduos (16,44%) foram capturados dentro de casa. Considerando-se o total de indivíduos coletados no intra e peridomicílio para essas mesmas espécies, verificou-se que as três apresentaram frequências muito similares (Tabela 4.4). Entretanto, do total de indivíduos de cada espécie, aquela que apresentou maior proporção de indivíduos capturados no intra e peridomicílio foi *An. albitarsis s.l.* (10,88%).

A variação sazonal do *An. albitarsis s.l.* em Salobra mostrou que esse complexo apresentou uma maior frequência no período de transição chuva-seca e na estação seca (Figura 4.2). Nas áreas do Nordeste e Amazônia pesquisadas por Deane *et al.* (1948), entretanto, observou-se maior abundância de *An. albitarsis s.l.* na estação chuvosa. Em Costa Marques, Klein & Lima (1990) observaram uma maior abundância de *An. deaneorum* em julho e no período de transição entre a estação chuvosa e a estação seca, similar ao observado em Salobra. Em Manaus, *An. albitarsis s.l.* apresentou maior abundância na estação chuvosa (Tadei *et al.*, 1998). Oliveira-Pereira & Rebêlo (2000), no Maranhão, também observaram maior frequência de *An. albitarsis s.l.* na estação seca. Em Roraima, o pico de *An. albitarsis s.l.* se deu na época chuvosa, que nessa região corresponde aos meses de abril a novembro (Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Barros & Honório, 2007; Barros *et al.*, 2010). De modo geral, a população de *An. albitarsis s.l.* na área de influência do Reservatório Serra da Mesa, em Goiás, apresentou-se mais abundante na estação chuvosa (Guimarães *et al.*, 2004). Na divisa de São Paulo com Minas Gerais e no Estado do Tocantins, observou-se maior frequência do Complexo Albitarsis na transição do período seco para o período de chuvas (Tubaki *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010).

Tal como as espécies já discutidas, a imensa maioria dos indivíduos da espécie *An. oswaldoi s.l.*, incluindo *An. konderi*, foi capturada picando o cavalo (Tabela 4.4). Como relatado na literatura, *An. konderi* é um mosquito essencialmente

zoofágico, que se alimenta no extradomicílio durante as horas crepusculares, embora já tenha sido também capturado picando o ser humano (Deane *et al.*, 1948; Flores-Mendoza *et al.*, 2004). A variação horária desta espécie foi observada apenas na sua localidade-tipo (Coari, Amazonas), onde o pico de atividade foi entre 17h30 e 18h30, embora a atividade de hematofagia tenha continuado até as 21h, e tenha ocorrido também no crepúsculo matutino (Flores-Mendoza *et al.*, 2004). Em Salobra, não foi possível avaliar a variação horária desta espécie devido à pequena amostra obtida. A variação na densidade populacional de *An. oswaldoi* s.l., incluindo *An. konderi*, foi similar às demais espécies com uma alta frequência dessa espécie na época de transição chuva e seca e no período de pouca chuva (julho) (Figura 4.2), mas em que o Pantanal encontra-se grandemente alagado. A variação na densidade populacional em virtude da sazonalidade não é conhecida para *An. konderi* em nenhuma outra região.

Anopheles galvaoi é um mosquito com hábitos predominantemente zoofágicos, porém já foi relatado que esta espécie também possui certo grau de antropofagia (Tadei *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2010a; Gomes *et al.*, 2010b). É principalmente exofágico (Deane *et al.*, 1948), mas também tem sido encontrado picando o ser humano no interior de domicílio (Oliveira-Pereira & Rebêlo, 2000). Em Salobra, 95,54% dos indivíduos *An. galvaoi* foram capturados ao se alimentar no cavalo (Tabela 4.4), e sua abundância foi maior na transição entre a estação chuvosa e a seca e início do período seco (julho) (Figura 4.2), tal como observaram Tadei *et al.* (1998) na Amazônia. No Maranhão, entretanto, maior densidade deste anofelino foi observada na estação chuvosa (Xavier & Rebêlo, 1999; Oliveira-Pereira & Rebêlo, 2000). Os ciclos de picada variam mesmo em localidades próximas e, de modo geral, observaram-se picos de atividade no início da noite, entre 18h e 20h, no Paraná e na divisa de São Paulo com Mato Grosso do Sul (Guimarães *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2010b).

A população de *An. mattogrossensis* de Salobra possui hábito marcadamente zoofágico, como observado por Deane *et al.* (1948) em diferentes localidades da Amazônia e do Nordeste. Como nós, esses autores também capturaram alguns exemplares próximos ou picando o ser humano. Em Salobra, maio e julho foram os meses de maior densidade dessa espécie já que o Pantanal nesse período possui maior disponibilidade de criadouros e apresenta um volume de chuva bastante baixo (Figura 4.2). A dinâmica sazonal bem como o ciclo de picadas do *An. mattogrossensis* não são conhecidos em nenhuma outra localidade.

Em Salobra, *An. rondoni* apresentou comportamento predominantemente zoofágico, com 97,4% dos indivíduos capturados no extradomicílio (Tabela 4.4). Observou-se esse mesmo comportamento nas localidades da Amazônia onde essa espécie foi encontrada, aliás em baixa densidade em relação aos demais anofelinos (Deane *et al.*, 1948). Rocha *et al.* (2008), entretanto, registraram comportamento antropofágico para essa espécie em Marabá (PA). Nessa região, a densidade populacional de *An. rondoni* foi maior em agosto (mês seco), sendo que nesse mês essa espécie predominou sobre todos os demais anofelinos, incluindo *An. darlingi* e *An. albitarsis s.l.* Como já registrado, o pico sazonal dessa espécie em Salobra também se deu no período mais seco em termos pluviométricos (Figura 4.2).

Considerando-se o conjunto de informação sobre a composição da fauna anofélica de Salobra e a biologia e comportamento das espécies mais frequentes, verificamos que a diversidade de espécies é considerável e inclui espécies vetoras primárias de malária, com destaque para *An. albitarsis s.l.*, *An. deaneorum* e *An. darlingi*, sendo esta última a principal vetora no Brasil e na maior parte da América do Sul e coincidentemente o anofelino mais abundante e predominante em Salobra. Foi na transição da estação chuvosa para a seca, durante e no período seguinte àquele em que se registraram os mais elevados níveis do Rio Miranda, e essencialmente nos crepúsculos, com destaque para o amanhecer e os momentos pericrepusculares matutinos que se detectaram as mais elevadas frequências dos anofelinos nesta localidade, inclusive das espécies vetoras. A margem do rio, e não o peridomicílio ou o domicílio, foi o local onde se coletaram mais anofelinos, mesmo quando se leva em conta as espécies tipicamente antropofílicas e vetoras primárias de malária. Cabe ressaltar, porém, que a quantidade de anofelinos, em especial de *An. darlingi*, na margem do rio é muito elevada na localidade. Com efeito, coletaram-se mais de 400 *An. darlingi* a cada hora durante toda a noite e com picos de mais de 700 fêmeas desta espécie/hora nas horas altas da noite e no amanhecer, em maio, por exemplo. Essa densidade populacional muito elevada, mesmo no extradomicílio, obviamente aumenta muito o risco de transmissão de malária, em especial entre pescadores, pecuaristas, ecoturistas, extrativistas e demais pessoas que exercem atividades profissionais ou fora de casa, em particular ao amanhecer. A densidade elevada de anofelinos pode compensar outros aspectos da biologia e/ou do comportamento que aparentemente possam desfavorecer a capacidade vetorial quanto à malária de dada população de mosquito, tal como a tendência à exofilia e exofagia, como já se verificou em outras áreas malarígenas (Lourenço-de-Oliveira,

1989; Lourenço-de-Oliveira, 2006). Assim, no que diz respeito à fauna anofélica, Salobra apresenta-se como bastante receptiva à transmissão da malária.

De 2002 a 2011, foram registrados 413 casos de malária no Estado do Mato Grosso do Sul, sendo 8,96% de casos considerados autóctones e 91,04% de casos de malária importada ou introduzida (Tabela 4.9). Nesse período, dos 78 municípios do Mato Grosso do Sul, 57 (73%) tiveram pelo menos um caso de malária autóctone ou importada, entre os quais destacam-se Campo Grande, Miranda, Dourados, Corumbá e Aquidauana. Os casos de malária importada foram adquiridos principalmente nos estados amazônicos de Rondônia e Pará (Tabela 4.11). Ressalta-se a possibilidade da existência de sub-notificação de casos de malária nos hospitais e secretarias de saúde dos municípios do Mato Grosso do Sul, já que em nosso levantamento, descobrimos ter havido um caso importado no ano de 2004 em Miranda, quando nos foi informado pela secretaria de saúde de tal município que não foram registrados casos de malária nos últimos 10 anos nessa região.

Os casos autóctones notificados entre 2007 e 2011, investigados em maiores detalhes por nós, mostraram que 66,66% eram de indivíduos do sexo masculino e que a idade dos mesmos variou de 18 a 52 anos (exceto por uma criança de dois anos do sexo feminino) (Tabela 4.12). O predomínio de homens com malária está relacionado às atividades profissionais como garimpo, extrativismo vegetal e lavoura, ocupações em que predominam pessoas do sexo masculino e que ampliam o contato hospedeiro-vetor, em especial no peri e extradomicílio (Alves *et al.*, 2000). De fato, dos nove casos de malária autóctone entre 2007 e 2011, pelo menos dois relacionam-se a essas profissões. O predomínio de homens entre os casos autóctones averiguados por nós se assemelha às investigações epidemiológicas feitas em grandes amostras de casos na Região Extra-Amazônica, em que aproximadamente 70% dos indivíduos que tiveram malária são do gênero masculino (Cerutti *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2010; Miguel, 2011). Verificamos também que, nas notificações dos casos autóctones de 2007 a 2011, houve uma predominância de infecções por *P. vivax*, tal como ocorre em áreas de malária residual nos estados do sudeste: Rio de Janeiro (Miguel, 2011), São Paulo (Marques *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2010) e Espírito Santo (Cerutti, 2007).

As atividades profissionais exercidas por três dos nove casos autóctones sugere que a transmissão pode ter sido peri ou extradomiciliar. O início dos sintomas em todos os casos se deu entre dezembro e abril, período em geral de maior volume de chuva. Entre os casos com parasitemia média (99 parasitos por mm³ de sangue),

houve um grande atraso entre a data dos primeiros sintomas e o diagnóstico de malária, cujo tempo variou de 10 meses a 2 anos e 8 meses. Ressaltamos, assim, que tais indivíduos podem atuar como possíveis fontes de infecção para os anofelinos por um período prolongado. Em contrapartida, os indivíduos com parasitemia mais alta (> 2.500 parasitos por mm^3 de sangue) ou com infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum* procuraram muito mais rapidamente atendimento médico especializado, cujo tempo variou de 0 a 1 mês a partir da data dos primeiros sintomas (Tabela 4.12). Contudo, a taxa de infecção de anofelinos nem sempre está linearmente relacionada com a parasitemia dos indivíduos.

Além dos casos diagnosticados tardiamente, que permitem que os indivíduos atuem como fonte de infecção para o mosquito por um tempo relativamente longo, alertamos para o fato de que algumas atividades profissionais exercidas pela maioria dos indivíduos diagnosticados exigem deslocamentos constantes e mesmo realização de acampamentos provisórios, o que aumenta bastante o risco de disseminação da malária em locais receptivos, como em Salobra (Klein *et al.*, 1991a).

A alta e constante circulação de indivíduos dentro e fora do Mato Grosso do Sul, ocasionada principalmente pelas atividades turísticas em municípios da porção oeste do Estado, aumenta as chances de entrada de indivíduos infectados advindos de regiões endêmicas como a Bolívia e os Estados da Região Norte, o que torna o Mato Grosso do Sul e, em especial, os municípios inseridos no Complexo do Pantanal, como Miranda, vulneráveis à transmissão de malária. Com efeito, apenas em 2010, mais de 68 mil turistas estrangeiros, a grande maioria de países sul-americanos, chegaram ao Brasil tendo como “porta de entrada” o Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDTUR/MS, 2011). Além do turismo ecológico, o agronegócio também tem proporcionado uma grande circulação de pessoas entre os municípios do Mato Grosso do Sul e também entre outros estados e países vizinhos, aumentando ainda mais a possibilidade de contato de indivíduos infectados com mosquitos nas áreas rurais e periurbanas do Mato Grosso do Sul. Nos últimos anos, cerca de um milhão de indivíduos circularam anualmente nas rodovias do MS (Tabela 3.1), dentre as quais se destacam as que atravessam o Pantanal do Miranda e que dão escoamento à produção agropecuária do Estado.

Segundo o Ministério da Saúde, há retardo no diagnóstico e elevada letalidade por malária na Região Extra-Amazônica (cerca de cem vezes maior do que na Região Amazônica (SVS/MS, 2009)), pois há grande desinformação por

parte da população geral e, surpreendentemente, por parte dos profissionais de saúde, que, por estarem em área não endêmica, não suspeitam dessa doença e assim não fazem o diagnóstico diferencial. O diagnóstico tardio de malária em áreas com grande vulnerabilidade, quando consideradas as condições climático-ambientais e os componentes entomológicos, como Salobra, eleva sobremaneira o risco de transmissão.

Cerutti *et al.* (2007) investigaram casos esporádicos de malária e demais indivíduos sem a doença residentes em área de Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo, há décadas considerado um Estado não endêmico, porém com algumas áreas de malária residual. Nesse estudo, os autores verificaram a ocorrência de infecções assintomáticas em alguns indivíduos, a maioria dos quais sem histórico de viagem para área endêmica de malária. Embora nenhum estudo sobre a prevalência de infecções assintomáticas tenha sido realizado no Mato Grosso do Sul, não se pode descartar a possibilidade da existência de indivíduos assintomáticos nesse Estado, os quais podem atuar como fontes de infecção para anofelinos vetores.

No Pantanal de Miranda, especificamente na localidade de Salobra, foram registrados 49 casos de malária autóctone em julho de 1939 em uma população de 50 habitantes, e quatro casos importados em setembro de 1940, pelas excursões científicas lideradas por Lauro Travassos (Travassos, 1941b; Travassos & Teixeira de Freitas, 1941). Infelizmente, não se conseguiram os registros de prevalência de malária dessa época. Mais recentemente, não se têm registrado casos de malária nessa área. Contudo, constatamos, atualmente, em Salobra uma alta frequência de anofelinos, vetores primários, principalmente *An. darlingi*, que representou 63,12% do total de mosquitos coletados e que, apesar de possuir hábitos mais exofágicos nessa localidade, também foi encontrado picando o ser humano no peridomicílio e repousando nas paredes internas da casa. Essa espécie foi especialmente abundante na transição da época chuvosa para a seca, período em que deve, portanto, haver maior risco de transmissão caso um hospedeiro infectado esteja presente na região. Foi observada ainda uma frequência relativamente alta, em Salobra, de outros anofelinos considerados vetores, como *An. triannulatus s.l.* e *An. deaneorum*, os quais, na ausência do vetor principal, podem manter a transmissão de malária em uma região, especialmente quando em altas densidades. Desse modo, pode-se afirmar que a região de Salobra e o Pantanal de Miranda como um todo apresenta receptividade considerável para a malária, seja quanto aos componentes entomológicos seja ambientais e climáticos, assim como alta

vulnerabilidade em virtude da grande circulação de indivíduos advindos de muitas áreas malarígenas do Brasil e de países vizinhos. Portanto, a região de Salobra bem como o Pantanal de Miranda, ao qual pertence, é uma área que apresenta um potencial malarígeno que não deve ser negligenciado.

6. CONCLUSÕES

Em Salobra, Pantanal de Miranda, Mato Grosso do Sul, foram registradas 13 espécies de anofelinos: *An. albitarsis s.l.*, *An. arthuri*, *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. halophylus*, *An. konderi*, *An. mattogrossensis*, *An. rondoni*, *An. oryzalimnetes*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus C* e *An. triannulatus s.s.*

Fazemos o primeiro registro da ocorrência das espécies *An. arthuri*, *An. deaneorum*, *An. galvaoi*, *An. konderi* e *An. oryzalimnetes* em Salobra.

Registramos pela primeira vez a ocorrência das espécies *An. arthuri*, *An. konderi* e *An. oryzalimnetes* no Mato Grosso do Sul.

Todas as espécies apresentaram maior frequência de picada no período de transição entre a estação chuvosa e a estação seca, e demonstraram comportamento predominantemente exofágico, preferindo se alimentar próximo ao rio, principalmente nos crepúsculos matutino e vespertino.

Anopheles darlingi e *An. albitarsis s.l.*, embora tenham apresentado comportamento zoofágico, foram também capturadas com frequência picando o ser humano no peridomicílio, sendo as duas espécies mais antropofílicas em Salobra.

Anopheles darlingi e *An. triannulatus s.l.* apresentaram um número razoável de fêmeas que já haviam parido ao menos uma vez.

O Estado do Mato Grosso do Sul vem apresentando, nos últimos anos, registros de casos de malária autóctones e importados, com predomínio para estes últimos. Os casos autóctones predominaram entre indivíduos do sexo masculino cujas atividades profissionais favorecem o contato homem-vetor.

A composição da fauna anofélica, a frequência de anofelinos vetores durante todo o ano, o elevado número de anofelinos na transição entre o período chuvoso e seco, a detecção constante de casos de malária no Estado, a proximidade com áreas malarígenas e a circulação constante de pessoas advindas dessas áreas, proporcionada principalmente por atividades turísticas e profissionais, indicam que Salobra e o Pantanal de Miranda são consideravelmente receptivos e vulneráveis à transmissão de malária.

Em vista do comportamento da população local de *An. darlingi*, sugerimos que há o maior risco de transmissão de malária nessa região durante a transição entre o período chuvoso e o seco, em especial no extradomicílio, como nos locais próximos aos cursos d'água, nos crepúsculos, especialmente no matutino. Portanto, a vigilância epidemiológica deve ser intensificada nesta área, de modo a se evitar a ocorrência de surtos e o restabelecimento da endemidade da malária.

7. PERSPECTIVAS

- Investigação mais detalhada das espécies que apresentaram variações morfológicas não contempladas na literatura, principalmente aquelas muito semelhantes a *An. galvaoi*, mas cujas características da fêmea não corresponderam integralmente à descrição dessa espécie, como por exemplo as manchas claras apicais ausentes nos tarsômeros médios I e II de alguns indivíduos.
- Descrição de uma nova espécie com características do adulto fêmea semelhantes à espécie *An. konderi*, mas cuja genitália masculina apresentou morfologia diferente de *An. konderi*.
- Mapeamento de criadouros e estudos de ecologia da paisagem no Pantanal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Da Silva LHP. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 2005 Sep;42(5):777–9.
- Alves MJ, Rangel O, de Souza SS. Malária na região de Campinas, São Paulo, Brasil, 1980 a 1994. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000 Feb;33(1):53–60.
- Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 1995 Feb;20(2):475.
- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986 Sep;35(5):873–81.
- Artoli AP, Resende EK. Ocupação das matas ciliares pelos empreendimentos do turismo de pesca no Rio Miranda, Pantanal, Brasil. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2005.
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991 Jul;45(1):65–76.
- Barata LC, Andriqueti MT, Cortás MC, Meneguetti C. Nota sobre surto de malária em usuários de drogas injetáveis. *Rev Saude Publica.* 1990 Aug;24(4):321–2.
- Barata RC. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cad Saude Publica.* 1995 Mar;11(1):128–36.
- Barros FSM, Arruda ME, Vasconcelos SD, Luitgards-Moura JF, Confalonieri U, Rosa-Freitas MG, et al. Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitalis* Lynch-Arribáizaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. *J. Vector Ecol.* 2007 Jun;32(1):54–68.
- Barros FSM, Honório NA. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):299–302.
- Barros FSM, Honório NA, Arruda ME. Mosquito anthropophily: implications on malaria transmission in the Northern Brazilian Amazon. *Neotrop. Entomol.* 2010 Dec;39(6):1039–43.
- Barros FSM, Honório NA, Arruda ME. Survivorship of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in relation with malaria incidence in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE.*

- 2011;6(8):e22388.
- Barros-Barreto J. Malária: doutrina e prática. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora A noite; 1940.
- Bergo ES, Souto RNP, Galardo AKR, Nagaki SS, Calado DC, Sallum MAM. Systematic notes on *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae) species in the state of Amapá, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(3):373–6.
- Berti J, Zimmerman R, Amarista J. Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1993 Sep;88(3):353–62.
- Branquinho MS, Araújo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, et al. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1996 Jun;90(3):233.
- Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, et al. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1993 Aug;87(4):391–4.
- Brochero HL, Rey G, Buitrago LS, Olano VA. Biting activity and breeding sites of *Anopheles* species in the municipality Villavicencio, Meta, Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2005 Jun;21(2):182–6.
- Bustamante FM. Efeito das aplicações intra-domiciliares de DDT sobre a densidade do *Anopheles darlingi* em várias regiões do Brasil. Revista Brasileira de Malariologia. 1951 Oct;3:571–90.
- Bustamante FM, Pinto O da S, De Freitas JR. Observações sobre o comportamento do *Anopheles darlingi* em casas experimentais tratadas com DDT e BHC na área de Engenheiro Dolabela, estado de Minas Gerais. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1952 Oct;4(4):347–59.
- Carvalho DF. Trabalho e conflito na Noroeste do Brasil, a greve dos ferroviários de 1914 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006 Feb 14;103(7):2452–7.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP. Studies on Brazilian Anophelines from the northeast and Amazon regions. II. An illustrated key by male genitalic characteristics for the identification of thirty-four species of Anophelini, with a note on dissection technique. The American Journal of Hygiene Monographic Series 1946 Feb;18:21–31.

- Cerqueira NL. Distribuição geográfica dos mosquitos da Amazônia. Rev. Bras. Entomol. 1961;10:111–168.
- Cerutti CJ. Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
- Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab M do CLD, Falqueto A, Rezende HR, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malar. J. 2007;6:33.
- Charlwood J, Hayes J. Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. Acta Amaz. 1978;8(4):601–3.
- Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996 Aug;91(4):391–8.
- Charlwood JD. Observations on the bionomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil. Bulletin of Entomological Research. 1980;70:685–92.
- Charlwood JD, Alecrim WA. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. Annals of tropical medicine and parasitology. 1989;83(6):569–76.
- Conn J, Puertas YR, Seawright JA. A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1993 Sep;9(3):294–301.
- Conn JE, Wilkerson RC, Segura MNO, de Souza RTL, Schlichting CD, Wirtz RA, et al. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002 Jan;66(1):18–22.
- Consoli RAG, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
- Consolim J, Fagundes MS. Sobre os anofelíneos do rio Paraná. IV – Infecção experimental de 4 espécies de *Plasmodium vivax*. Arq. Biol. Tec. 1981;24:417–423.
- Couto RD, Latorre M do RD de O, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010 Feb;43(1):52–8.
- Cunha RV da, Atanaka-Santos M. Research priorities in epidemiology in the Brazilian Pantanal. Cad Saude Publica. 2011 Jun;27(6):1051.
- Deane MP, Causey OR, Deane LM. Studies on Brazilian Anophelines from the northeast and Amazon regions. III. An illustrated key by larval characteristics for the identification of thirty-two species of Anophelini, with descriptions of two

- larvae. The American Journal of Hygiene Monographic Series 1946 Feb;18:35–48.
- Deane L. Os grandes marcos na história do controle da malária. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical. 1992;25(supl II):12–22.
- Deane L, Causey O, Deane M. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1948;1:827–965.
- Deane LM. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1989;84(supl 4):149–56.
- Deane LM. Malaria vectors in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1986;81(Supl. II):5–14.
- Deane LM, Vernin CS, Damasceno RC. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, por meio de provas de precipitina. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1949;2:793–808.
- Detinova TS. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monogr Ser World Health OrgAn. 1962;47:13–191.
- Elliott R. Studies on man vector contact in some malarious areas in Colombia. Bull World Health OrgAn. 1968;38(2):239–53.
- Faran ME. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIV. A revision of the albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contributions of the American Entomological Institute. 1980;15(7).
- Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 1981;13(1):1–81.
- Flores-Mendoza C, Peyton E, Wilkerson RC, Oliveira RLD. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *konderi* Galvão and Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). Proc. Entomol. Soc. Wash. 2004;106(1):118–132.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1994 Oct;3(5):294–9.
- Forattini OP. Culicidologia médica. 1ª ed. São Paulo: Edusp; 2002.
- Forattini OP. Entomologia Médica. 1ª ed. São Paulo: Edusp; 1962.
- Forattini OP. Exophilic behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of

- Brazil. Rev Saude Publica. 1987 Aug;21(4):291–304.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 2. Immature stages research at a rice irrigation system location in south-eastern Brazil. Rev Saude Publica. 1993 Aug;27(4):227–36.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera:Culicidae) and anthropic environment. 12-host-seeking behaviour of *Anopheles albitarsis* s.l. in south-eastern Brazil. Rev Saude Publica. 1996 Aug;30(4):299–303.
- Fragoso AT. A Guerra entre a Tríplice Aliança e o Paraguai. 2ª ed. Rio de Janeiro; 1956.
- Freitas-Sibajev MG, Conn J, Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA, Momen H. Mitochondrial DNA and morfological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). Mosq. Syst. 1995;27:79–99.
- Fritz GN, Conn J, Cockburn A, Seawright J. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mol. Biol. Evol. 1994 May;11(3):406–16.
- FUNDTUR – Fundação de Turismo de Mato Grosso do Sul. Indicadores turísticos 2011 – Ano base 2010. Campo Grande: Fundação de Turismo de Mato Grosso do Sul, 2011.
- FUNDTUR – Fundação de Turismo de Mato Grosso do Sul [Internet]. Campo Grande: [acesso em 2 de maio de 2012]. Disponível em: <http://www.turismo.ms.gov.br/>
- Galardo AKR, Zimmerman RH, Lounibos LP, Young LJ, Galardo CD, Arruda M, *et al.* Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapí River, Amapá, [corrected] Brazil. Med. Vet. Entomol. 2009 Dec;23(4):335–49.
- Galdino S, Silva J. Análise da inundação de agosto de 1998 à jusante da cidade de Miranda, MS, no Pantanal. 1º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal, Campo Grande, Brasil. 2006 Nov 11-15; EMBRAPA Informática Agropecuária/INPE, Campo Grande, MS. Campo Grande; 2006.
- Galvão A, Damasceno R, Marques A. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belém, Pará. Arq Hig Saúde Pública. 1942;12:51–111.

- Galvão A, Damasceno R. Observações sobre anofelinos do complexo albitarsis (Díptera: Culicidae). *Annais da Faculdade de Medicina*. 1944;20:73–87.
- Galvão ALA. Contribuição ao conhecimento das espécies de *Myzorrhynchela* (Diptera: Culicidae). *Arq. Zool S. Paulo*. 1941;2:505–576.
- Galvão ALA, Lane J, Correa R. Notas sobre os *Nyssorhynchus* de S. Paulo. V. Sobre os *Nyssorhynchus* de Novo Oriente. *Revista de Biologia e Hygiene*. 1937;8:37 – 45.
- Garrett-Jones C. Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. *Nature*. 1964 Dec 19;204:1173–5.
- Giglioli G. Malaria in British Guiana; part III. Breeding habits of *An. darlingi* natural factors which limit the distribution of this species and of malaria. *Agr J British Guiana*. 1938;9:197–206.
- Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, da Silva LHP. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):271–6.
- Gillies M. Anopheline mosquitos: vector behaviour and bionomics. In: Wernsdorfer WH, McGregor I. editores. *Malaria: principles and practice of malariology*. Edinburgo: Churchill Livingstone; 1988. 453–85.
- Gomes A de C, Natal D, de Paula MB, Urbinatti PR, Mucci LF, Bitencourt MD. Riqueza e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2007 Aug;41(4):661–4.
- Gomes A de C, Paula MB de, Natal D, Gottlieb SLD. Ecologia de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root em área de implantação de empreendimento hidrelétrico, na divisa dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2010a Jun;43(3):272–6.
- Gomes A de C, Paula MB de, Natal D, Gottlieb SLD, Mucci LF. Effects of flooding of the River Paraná on the temporal activity of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae), at the border state of Mato Grosso do Sul and São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2010b Oct;43(5):516–22.
- Guimarães AE, de Mello RP, Lopes CM, Alencar J, Gentile C. Prevalência de anofelinos (Diptera: Culicidae) no crepúsculo vespertino em áreas da Usina Hidrelétrica de Itaipu, no município de Guaíra, estado do Paraná, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1997 Dec;92(6):745–54.

- Guimarães AE, Gentile C, Alencar J, Lopes CM, de Mello RP. Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil. 1--Frequency and climatic factors. *Cad Saude Publica*. 2004 Feb;20(1):291–302.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* N° 41. 1999. p. 95–8.
- Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 2004 Dec;94(6):537–53.
- Hayes J, Charlwood JD. Dinâmica estacional de uma população de *Anopheles darlingi*, numa área endêmica de malária no Amazonas. *Acta Amazonica*. 1979;9(1):79–86.
- Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors*. 2011;4:177.
- Hudson J. *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Suriname rain forest. *Bulletin of entomological research*. 1984;74(01):129–42.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. [acesso em 4 de maio de 2012]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>
- Kakitani I, Forattini OP. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* *l.s.* em área de agroecossistema irrigado. *Rev Saude Publica*. 2000 Feb;34(1):33–8.
- Klein TA, Lima JB. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1990 Dec;6(4):700–7.
- Klein TA, Lima JB, Tada MS, Miller R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991a Oct;45(4):463–70.
- Klein TA, Lima JB, Tang AT. Biting behavior of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991b Mar;24(1):13–20.
- Kumm HW. Observation on two malaria vectors and distribution records of other *Anopheles* in the states of Bahia and Sergipe, Brazil. *Ann. Trop. Med. & Parasit.* 1932; 26(1):1–6.

- Ladislau JL, Leal MC, Tauil, PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2006;15(2):9–20.
- Lane J. Neotropical Culicidae. Vol 1. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo; 1953.
- Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic Species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA COI Gene Sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2005 Nov;98(6):908–17.
- León W, Valle J, Naupay R, others. Comportamiento estacional del *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root 1926 en localidades de Loreto y Madre de Díos, Perú 1999-2000. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 2003;20(1):22–7.
- Limongi JE, Chaves KM, Paula MBC de, Costa FC da, Silva A de AE, Lopes I de S, *et al.* Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008 Jun;41(3):232–7.
- Linthicum KJ. A revision of the Argyritarsis Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). DTIC Document; 1988.
- Loiola CCP, da Silva CJM, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev. Panam. Salud Publica*. 2002 Apr;11(4):235–44.
- Lopes J, Lozovei AL. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná, Brasil. I – Coletas ao longo do leito do ribeirão. *Rev Saude Publica*. 1995 Jun;29(3):183–91.
- Lourenço-de-Oliveira R. Some observations on the mosquitoes of Indian settlements in Xingu National Park, Mato Grosso State, Brazil, with emphasis on malaria vectors. *Rev Bras Biol*. 1989 May;49(2):393–7.
- Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2006.
- Lourenço-de-Oliveira R, Guimarães AE, Arlé M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, *et al.* Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondônia State, Amazon region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1989 Dec;84(4):501–14.
- MacDonald G. *The epidemiology and control of malaria*. Londres: Oxford University

- Press; 1957.
- Machado RLD, D' Almeida Couto AAR, Cavasini CE, Calvosa VSP. Malária em região extra-Amazônica: situação no Estado de Santa Catarina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003 Oct;36(5):581–6.
- Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Rejmankova E, Hakre S. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. J. Med. Entomol. 1996 Mar;33(2):205–11.
- Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999 Mar;60(3):364–76.
- Marques A, Pinheiro E, Motta E. Fatores que dificultam o controle da malária na região amazônica. XIX Congresso Brasileiro de Higiene, Rio de Janeiro. 1977.
- Marques AC, Cárdenas GH. Combate à malária no Brasil situação atual e perspectivas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1994;27:91–108.
- Marques AC, Pinheiro E. Migrações internas e as grandes endemias. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1979;31:137–58.
- Marques AC, Pinheiro EA, de Souza AG. Um estudo sobre a dispersão de casos de malária no Brasil. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1986;38:51–75.
- Marques GRAM, Condino MLF, Serpa LLN, Cursino TVM. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985-2006. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008 Aug;41(4):386–9.
- Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 1999 Nov;36(6):679–84.
- Matsumoto WK, Vicente MG, Silva MA, de Castro LL. Comportamento epidemiológico da malária nos municípios que compõem a Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso do Sul, no período de 1990 a 1996. Cad Saude Publica. 1998 Dec;14(4):797–802.
- McDermott JM, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL. The effect of placental malaria infection on perinatal mortality in rural Malawi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996;55(1 Suppl):61–5.

- McGinnis MH, Miller LH. Malaria, erythrocyte receptor and the Duffy blood group system. *Cellular Antigens and Disease*. Washington: American Association of Blood Banks; 1977. p. 67–77.
- Mendes CAB, Dias FA, Lange MBR, Pereira MCB, Becker M, Barreto SR, Grehs SA. Bacia hidrográfica do Rio Miranda estado da arte. Campo Grande: UCDB; 2004.
- Miguel RB. Estudo da infecção por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro; 2011.
- Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinnis MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*. 1975 Aug 15;189(4202):561–3.
- Ministério da Saúde (Brasil). Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- Ministério do Interior (Brasil). Estudos hidrológicos da Bacia do Alto Paraguai – Relatório Técnico. Rio de Janeiro, 1974.
- Mochileiro descobrindo o Brasil [Internet]. [atualizada em 27 de janeiro de 2011; acesso em 29 de abril de 2012]. Disponível em: <http://www.mochileiro.tur.br/tres-lagoas.htm>
- Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez E, Sánchez V. Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med. Vet. Entomol*. 2007 Dec;21(4):339–49.
- Moreno M, Marinotti O, Krzywinski J, Tadei WP, James AA, Achee NL, *et al*. Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. *Malar. J*. 2010;9:127.
- Moss G, Moss M. Relatório Projeto Brasil das Águas Sete Rios – Miranda. Brasília: Petrobras; 2007.
- Motoki MT, Linton YM, Ruiz F, Flores-Mendoza C, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922) (Diptera: Culicidae), with formal lectotype designation. *Zootaxa*. 2007;(1588):31–51.
- Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect. Genet. Evol*. 2012 Aug;12(6):1246–52.
- Motoki MT, Wilkerson RC, Sallum MAM. The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem*.

- Inst. Oswaldo Cruz. 2009 Sep;104(6):823–50.
- Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar. J.* 2011;10:174.
- Nagaki SS, Motta M de A, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the Myzorhynchella Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010 May;105(3):278–85.
- Narang SK, Klein TA, Perera OP, Lima JB, Tang AT. Genetic evidence for the existence of cryptic species in the *Anopheles albitarsis* complex in Brazil: allozymes and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. *Biochem. Genet.* 1993 Feb;31(1-2):97–112.
- Natal D, Barata JM, Lagos CB, Rocha RM. Nota sobre culicídeos (Diptera: Culicidae) da bacia do rio Purus, Acre, Amazônia (Brasil). *Rev Saude Publica.* 1992 Apr;26(2):129–31.
- Neiva A, Pinto C. Contribuição para o conhecimento das anophelinas do estado de Mato Grosso com a descrição de uma nova espécie. *Rev. Brazil Med.* 1922;36:321–322.
- Neves A. Estudos moleculares de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) capturados em criadouro na planície de inundação do Mato Grosso do Sul, Brasil [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- Oliveira SJ. Sobre os mosquitos do estado de Mato Grosso, Brasil, com a descrição do macho de “*Taeniorhynchus (Rhynchoaenia) shannoni*” (Lane & Antunes, 1937) (Diptera: Culicidae). *Rev. Brasil. Biol.* 1942 Jun;2(2):209–212.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 2010;9:115.
- Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990 Jul;43(1):6–10.
- Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JM. Espécies de *Anopheles* no município de Pinheiro (Maranhão), área endêmica de malária. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000 Oct;33(5):443–50.
- Pajot FX, Le Pont F, Molez JF, Degallier N. Agressivité d’*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) en Guyane Française.

- Cah ORSTOM Ser Entomol Med et Parasitol. 1977;15:15–22.
- Parmakelis A, Russello MA, Caccone A, Marcondes CB, Costa J, Forattini OP, *et al.* Historical analysis of a near disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008 Jan;78(1):176–8.
- Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Alencar J, Silva J dos S, Murta M, Serra-Freire NM, *et al.* Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2010 Feb;52(1):17–24.
- Peyton EL, Wilkerson RC, Harbach RE. Comparative analysis of the subgenera *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 1992 Mar;24(1):51–69.
- Pinto de Moura A. O Corpo de Saúde do Exército na Tríplice Aliança. I Seminário da História da Guerra da Tríplice Aliança; 2011 Oct 19; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: CEPHiMEx; 2011.
- Póvoa M, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, Warhurst D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001 Feb;96(2):179–84.
- Póvoa MM, de Souza RTL, Lacerda RN da L, Rosa ES, Galiza D, de Souza JR, *et al.* The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2006 Mar;101(2):163–8.
- Póvoa MM, Machado RL, Segura MN, Vianna GM, Vasconcelos AS, Conn JE. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2000 Feb;94(1):106–7.
- Quintero LO, Dutary Thatcher B, Tadei WP. Biologia de anofelinos amazônicos. XXI. Ocorrência de espécies de *Anopheles* e outros culicídeos na área de influência da hidrelétrica de Balbina - cinco anos após o enchimento do reservatório. Acta Amazonica. 1996;26(4):281–96.
- Rachou RG. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1958;10:145–81.
- Rebêlo JM, da Silva AR, Ferreira LA, Vieira JA. *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu-Santa Luzia, pré-Amazônia maranhense. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1997 Apr;30(2):107–11.
- Rezende HR, Soares RM, Cerutti C Jr, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, *et al.* Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of

- the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 2009 Apr;38(2):272–80.
- Ribeiro ALM. Aspectos ecológicos de criadouros de anofelinos em áreas de garimpos abandonados nos municípios de Matupá e Peixoto Azevedo/MT [dissertação]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso; 2000.
- Roberts DR, Manguin S, Rejmankova E, Andre R, Harbach RE, Vanzie E, *et al.* Spatial distribution of adult *Anopheles darlingi* and *Anopheles albimanus* in relation to riparian habitats in Belize, Central America. *J. Vector Ecol.* 2002 Jun;27(1):21–30.
- Rocha JAM, de Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008 Jun;78(6):872–7.
- Rosa-Freitas MG. *Anopheles deaneorum* a new species in the Albitarsis complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1989 Oct;84(4):535–543.
- Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momen H, Molyneux DH. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1992 Dec;8(4):357–66.
- Rosa-Freitas MG, Conn J, Mitchell S, Cockburn AF, Seawright, JA, Momen H. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil. *Mosquito Systematics.* 1995;27:79–85.
- Rosa-Freitas MG, Deane LM. The neotype of *Anopheles albitarsis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1989;84(3):289–302.
- Rosa-Freitas MG, Deane LM, Momen H. A morphological, isoenzymatic and behavioural study of ten populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality-Baradero, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1990;85(3):275–89.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1998 Oct;93(5):651–5.
- Rubio-Palis Y, Curtis CF. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. *Med. Vet. Entomol.* 1992 Oct;6(4):325–34.
- Ruiz F, Quiñones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton Y-M. Molecular

- differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2005 Apr;100(2):155–60.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, *et al.* DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. Parasit Vectors. 2012;5:44.
- Saez-Alquézar A, Ramos AM, Di Santi SM, Branquinho MS, Kirchgatter K, Cordeiro IA, *et al.* Controle da malária transfusional em região endêmica e não endêmica do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998 Feb;31(1):27–34.
- Sallum MAM, Bergo ES, Flores DC, Forattini OP. Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus *Nyssorhynchus* Blanchard (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002 Dec;97(8):1177–89.
- Sallum MA, Wilkerson RC. Description of the immature stages of *Anopheles (Nyssorhynchus) rondoni* (Neiva & Pinto) (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1997 Jun;92(3):365–72.
- Sallum MAM, Foster PG, Dos Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, and characterization of a distinct morphological form from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2010 Jul;47(4):504–26.
- Scarpassa VM. Isozyme similarity in *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Amazon region, Brazil. J. Med. Entomol. 2005 May;42(3):319–26.
- Scarpassa VM, Conn JE. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the *COI* gene from mitochondrial DNA. Genet. Mol. Res. 2006;5(3):493–502.
- SEMACE – Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia. Caderno Geoambiental das Regiões de Planejamento do MS. Campo Grande: Governo de Mato Grosso do Sul, 2011.
- Schiavi A. Nota sobre mosquitos vetores em Iguape. Arq Hig Saude Publica. 1945;10: 69–75.
- Shannon RC. O aparecimento de uma espécie africana de *Anopheles* no Brasil. Brasil-Medico. 1930;19:515–518.
- Shannon RC. *Anopheles gambiae* in Brazil. Amer.Journ. Hyg.1932;15(3):633–663.

- Shannon RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. *Amer J Trop Med Hyg.* 1939;19:131–148.
- Shin Shiang LO, Andrade JCR, Condino MLF, Alves MJCP, Semeghini MG, Galvão EC. Malária em usuários de drogas de administração endovenosa associada à soropositividade para HIV. *Revista de Saúde Pública.* 1991;25(1):17–22.
- Sierra DM, Velez ID, Linton Y-M. Malaria vector *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* comprises one genetic species in Colombia based on homogeneity of nuclear *ITS2* rDNA. *J. Med. Entomol.* 2004 May;41(3):302–7.
- Silva JDS, Pacheco JB, Alencar J, Guimarães AE. Biodiversity and influence of climatic factors on mosquitoes (Diptera: Culicidae) around the Peixe Angical hydroelectric scheme in the state of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010 Mar;105(2):155–62.
- Silva do Nascimento T. Estudo taxonômico e notas sobre a biologia de *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) de oito localidades [dissertação]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1995.
- Silva do Nascimento TF, Lourenco-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002 Sep;97(6):801–11.
- Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the Triannulatus Complex (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007 Dec;102(8):975–82.
- Silva-Do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Lourenço-De-oliveira R, Monteiro FA. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in central Brazil. *J. Med. Entomol.* 2006 May;43(3):455–9.
- Silva-Vasconcelos A, Kató MYN, Mourão EN, de Souza RTL, Lacerda RN da L, Sibajev A, *et al.* Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002 Mar;97(2):151–61.
- SINAN Web/SVS/MS [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde [acesso em 17 de agosto de 2011]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>
- Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, *et al.* The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors.* 2010;3:72.

- Soper FL, Wilson DB. *Anopheles gambiae* in Brazil 1930–1940. New York: Rockefeller Foundation; 1943.
- Souza-Santos R. Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2002 Dec;18(6):1813–8.
- Suárez-Mutis MC, Coura JR. Mudanças no padrão epidemiológico da malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. *Cad Saude Publica*. 2007 Apr;23(4):795–804.
- Suárez-Mutis MC, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque EC, Coura JR. Malária. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2006.
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. *Malária no Brasil [apresentação]*. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. *Situação epidemiológica da malária na Amazônia [apresentação]*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Systematic Catalog of Culicidae [Internet]. [acesso em 23 de março de 2012]. Disponível em: http://www.mosquitocatalog.org/taxon_descr.aspx?ID=17530
- Tadei WP, dos Santos JM, Costa WL, Scarpassa VM. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1988 Jun;30(3):221–51.
- Tadei WP, Dutary Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2000 Apr;42(2):87–94.
- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1998 Aug;59(2):325–35.
- Tauil P. *Estudo de Alguns Aspectos da Epidemia de Malária em Porto Nacional (GO) Brasil*. Goiânia: UFGO; 1981.
- Tauil P. *Malária: Situação Atual no Brasil: Problemas e Perspectivas do Programa de Erradicação*. XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Ribeirão Preto. 1982.
- Tauil P, Daniel-Ribeiro C. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. *Res Rev Parasitol*. 1998;58:163–7.
- Travassos L. *Relatório da excursão científica do Instituto Oswaldo Cruz realizada na*

- Zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em outubro de 1938. Boletim Biológico. 1939 May;IV(2):208–79.
- Travassos L. Relatório da terceira excursão a zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil realizada em Fevereiro e Março de 1940. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1941a Apr;35(3):607–96.
- Travassos L. Relatório da quarta excursão do Instituto Oswaldo Cruz a zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, realizada em Agosto e Setembro de 1940. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1941b Apr;35(3):697–722.
- Travassos L. Relatório da quinta excursão do Instituto Oswaldo Cruz, realizada à zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em Janeiro de 1941. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1941c Nov;36(3):263–71.
- Travassos L, Teixeira de Freitas JF. Relatório da excursão científica realizada na zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil em Julho de 1939. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1941 Apr;35(3):525–56.
- Travassos L, Teixeira de Freitas JF. Relatório da sétima excursão científica do Instituto Oswaldo Cruz, realizada à zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em maio de 1942. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1943 Jun;38(3):385–412.
- Travassos L, Teixeira de Freitas JF. Relatório da sexta excursão do Instituto Oswaldo Cruz à zona da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em novembro de 1941. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1942 Sep;37(3):259–86.
- Tubaki RM, Menezes RMT de, Cardoso RP Jr, Bergo ES. Studies on entomological monitoring: mosquito species frequency in riverine habitats of the Igarapava Dam, Southern Region, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2004 Aug;46(4):223–9.
- Ulloa A, Rodríguez MH, Rodríguez AD, Roberts DR. A comparison of two collection methods for estimating abundance and parity of *Anopheles albimanus* in breeding sites and villages of southern Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1997 Sep;13(3):238–44.
- UNDP/World Bank/WHO Tropical disease research: progress 1991-92: eleventh programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: World Health Organization; 1993.
- Vital AV. Medicina tropical, tratamento e profilaxia contra a malária: controvérsias científicas no início do século XX. Revista Eletrônica Cadernos de História. 2010;X(2).

- Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, *et al.* Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009 Jul;81(1):5–12.
- Voorham J. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. *Rev Saude Publica.* 2002 Feb;36(1):75–80.
- Wellcome Trust. Malaria [CD-ROM]. Londres: Wellcome Trust; 2007.
- Wikipédia [Internet]. [acesso em 24 de março de 2012]. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Mapa-Novoeste.jpg>
- Wilkerson RC, Gaffigan TV, Bento Lima J. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1995a Dec;90(6):721–32.
- Wilkerson RC, Hribar LJ, Milstrey EG, Calderon Falero G. The identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) rondoni* (Diptera: Culicidae) in Mato Grosso, Brazil: an analysis of key character variability. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1995b;90(5):575–82.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J. Med. Entomol.* 1995c Sep;32(5):697–704.
- WHO - World Health Organization. Report on the malaria conference in Equatorial Africa, Kampala, Uganda, 27 November - 9 December 1950. *Tech Rep Ser.* 1951 Apr;38:1–72.
- WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2011.
- WHO - World Health Organization. Classificação dos casos de malária. Genebra, 1961.
- Xavier MM, Rebêlo JM. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária, Maranhão, Brasil. *Rev Saude Publica.* 1999 Dec;33(6):535–41.
- Xavier SH, Mattos, SS. Distribuição Geográfica Dos Culicíneos No Brasil (Diptera,Culicidae) II. Estado de Mato Grosso. *Separata da Rev. Brasil. de Malar. e Doencas Trop.* 1970;22(2-4):441–460.

- Zeilhofer P, dos Santos ES, Ribeiro ALM, Miyazaki RD, dos Santos MA. Habitat suitability mapping of *Anopheles darlingi* in the surroundings of the Manso hydropower plant reservoir, Mato Grosso, Central Brazil. *Int J Health Geogr.* 2007;6:7.
- Zimmerman RH, Galardo AKR, Lounibos LP, Arruda M, Wirtz R. Bloodmeal hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 2006 Sep;43(5):947–56.

9. APÊNDICE



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28036-2	Data da Emissão: 06/05/2011 10:52
Dados do titular	
Nome: Mariana Marinho e Silva	CPF: 108.330.757-64
Título do Projeto: Levantamento faunístico de mosquitos anofelinos (Diptera: Culicidae: Anophelinae) e estudo dos aspectos ecológicos e comportamentais das espécies mais frequentes em Salobra, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de mosquitos anofelinos	03/2011	08/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MIRANDA	MS	Povoado Salobra	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culicidae (*Qtde: 200)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta (Armadilha Shannon), Captura manual
---	---	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
---	--------------------	--------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64458983



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28036-2		Data da Emissão: 06/05/2011 10:52	
Dados do titular			
Nome: Mariana Marinho e Silva		CPF: 108.330.757-64	
Título do Projeto: Levantamento faunístico de mosquitos anofelinos (Diptera: Culicidae: Anophelinae) e estudo dos aspectos ecológicos e comportamentais das espécies mais frequentes em Salobra, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil			
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ			CNPJ: 33.781.055/0001-35
1	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64458983



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28036-2		Data da Emissão: 06/05/2011 10:52	
Dados do titular			
Nome: Mariana Marinho e Silva		CPF: 108.330.757-64	
Título do Projeto: Levantamento faunístico de mosquitos anofelinos (Diptera: Culicidae: Anophelinae) e estudo dos aspectos ecológicos e comportamentais das espécies mais frequentes em Salobra, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil			
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35	

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64458983



Página 3/3

Projeto Coordenadas
Número Data Altitude
Localização
Início da Coleta Término da coleta
Tipo de Captura Capturador

CONDIÇÕES AMBIENTAIS DURANTE A COLETA

HORÁRIO	TEMPERATURA	UMIDADE	VENTOS	CHUVAS	OUTROS

CONDIÇÕES DURANTE AS 24 HORAS - PERÍODO:

Temperatura Máxima Umidade Máxima Ventos
Temperatura Mínima Umidade Mínima Chuvas
Outros