

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

DERCILIANO LOPES DA CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DE ANOFELINOS EM DUAS REGIÕES DE TRANSMISSÃO
DE MALÁRIA (BRASIL E CABO VERDE): IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES,
INFEÇÃO VETORIAL, DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E
ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

RECIFE
2022

DERCILIANO LOPES DA CRUZ

Caracterização de anofelinos em duas regiões de transmissão de malária (Brasil e Cabo Verde): identificação de espécies, infecção vetorial, detecção de genes de resistência a inseticidas e análise da variabilidade genética

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular Básica e Aplicada/Biologia celular e molecular de patógenos, vetores e hospedeiros

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientador: Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

Coorientadora: Dra. Elaine Christine de Souza Gomes

RECIFE

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

C957c Cruz, Derciliano Lopes da.
Caracterização de anofelinos em duas regiões de transmissão de malária (Brasil e Cabo Verde): identificação de espécies, infecção vetorial, detecção de genes de resistência a inseticidas e análise da variabilidade genética / Derciliano Lopes da Cruz. — Recife: [s.n.], 2022.
193 p. : il., tab., mapas ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres; coorientadores: Marcelo Henrique Santos Paiva, Elaine Christine de Souza Gomes.

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

1. Anopheles - genética. 2. Genes de insetos - genética. 3. Anopheles - parasitologia. 4. Plasmodium. 5. Resistência a inseticidas - genética. 6. Variação genética. 7. Brasil. 8. Cabo Verde. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Paiva, Marcelo Henrique Santos. III. Gomes, Elaine Christine de Souza. IV. Título.

DERCILIANO LOPES DA CRUZ

Caracterização de anofelinos em duas regiões de transmissão de malária (Brasil e Cabo

Verde): identificação de espécies, infecção vetorial, detecção de genes de resistência a inseticidas e análise da variabilidade genética

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular Básica e Aplicada/Biologia celular e molecular de patógenos, vetores e hospedeiros

Aprovado em: 30/03/22

BANCA EXAMINADORA

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (examinadora interna)
Instituto Aggeu Magalhães

Dra. Cláudia Maria Fontes Oliveira (examinadora interna)
Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior (examinador externo)
Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Gonçalo Filipe Rocha Seixas (examinador externo)
Instituto de Higiene e Medicina Tropical/ Universidade Nova de Lisboa

*Aos meus pais Maria da Glória Lopes e Manuel António da Graça;
aos meus irmãos Romilton da Graça e Hélia da Graça!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre segurar minha mão e nunca me desamparar nos momentos mais difíceis;

À minha orientadora, Dra. Constância Ayres, pela paciência, apoio e por me conceder a oportunidade de trabalhar com Entomologia médica e molecular;

Aos meus coorientadores, Dr. Marcelo Paiva e Dra. Elaine Gomes, pela disponibilidade, compromisso e atenção constante com este projeto de pesquisa;

A minha mais profunda gratidão aos meus pais, Manuel António da Graça e Maria da Glória Lopes, por serem meus portos seguros e meus principais incentivadores;

Aos meus queridos irmãos, Romilton da Graça e Hélia da Graça, por todo o incentivo e apoio emocional;

À Daniele Mendes Felix, pelo companheirismo, escuta, incentivo e amparo, minha profunda gratidão;

Ao Departamento de Entomologia, pelo acolhimento e conhecimento partilhado;

Ao GIDTPiaget e à Secretaria de Saúde do Município do Conde-PB pela parceria e ajuda nas coletas de amostras em Campo;

Ao NPT/FIOCRUZ-PE pelo sequenciamento das amostras de DNA;

Ao IAM, pela infraestrutura e por me proporcionar um ensino de qualidade;

À CAPES, pelo apoio financeiro, permitindo a conclusão deste projeto;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

DA CRUZ, Derciliano Lopes. Caracterização de anofelinos em duas regiões de transmissão de malária (Brasil e Cabo Verde): identificação de espécies, infecção vetorial, detecção de genes de resistência a inseticidas e análise da variabilidade genética. 2022. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Mosquitos do gênero *Anopheles* são considerados os únicos vetores responsáveis pela transmissão do *Plasmodium* spp., agente etiológico da malária, a nível global. Na África, a malária é distribuída por quase todas as regiões, incluindo Cabo Verde - país situado na África ocidental. Nas Américas, o Brasil é o segundo país que mais reporta casos da doença, com dois cenários epidemiológicos distintos: alta endemicidade (região Amazônica) e sem endemicidade (na região extra-amazônica). Em ambos os continentes, uma das principais estratégias de combate à doença é o controle de vetores através do uso de inseticidas químicos. No entanto, o uso indiscriminado dos inseticidas tem ocasionado a seleção de genes que conferem resistência em mosquitos, o que dificulta o controle dessas populações. Sendo assim, o conhecimento da estrutura genética de anofelinos vetores e a detecção de alelos de resistência são essenciais para fundamentar a tomada de decisões em programas de controle vetorial. Este estudo teve como objetivo avaliar a circulação de vetores da malária, identificar a infecção natural por *Plasmodium* spp., diagnosticar a ocorrência de alelos que conferem resistência a inseticidas químicos e estimar a variabilidade genética em anofelinos de duas regiões: cidade da Praia, Cabo Verde (região endêmica) e município do Conde-PB, Brasil (sem endemicidade). A identificação de anofelinos usando IGS (espaçadores intergênicos) revelou um total de 235 espécimes de *Anopheles arabiensis* coletadas em Cabo Verde. No Conde, 323 espécimes de *Anopheles* foram identificadas molecularmente, usando DNA *barcoding*: *An. aquasalis* (135), *An. minor* (62), *An. triannulatus* (32), *An. albitarsis* s.l (30), *An. argyritarsis* (18), *An. peryassui* (15), *An. oswaldoi* (5), *An. braziliensis* (3), *An. sawyeri* (3) e *Anopheles* spp. (20). A investigação molecular da infecção por *Plasmodium* spp. foi realizada em 312 mosquitos fêmeas de *Anopheles* coletados no Conde-PB, resultando em nenhuma amostra positiva para *Plasmodium*. A genotipagem dos genes de resistência (*Na_v*, *GSTE2* e *ace-1*) e a variabilidade genética (*COI*, *ND5*) foram realizadas para as espécies *An. arabiensis* coletadas em Cabo Verde e para três potenciais vetores (*An. albitarsis* s.l, *An. aquasalis* e *An. argyritarsis*) coletados no município do Conde. Não foram encontradas SNPs nos genes de resistência, com exceção do gene *Na_v*, que revelou a presença dos alelos L1014S/F na população de *An. arabiensis* coletada em Cabo Verde, com frequências de 0,15 e 0,17 em duas localidades analisadas. De forma geral, o estudo da diversidade genética local dos anofelinos coletados nas duas regiões, revelou baixa diversidade genética, com alto *N_m* e baixos valores de *F_{st}*. Uma análise global, comparando populações de Cabo Verde com as disponíveis em banco de dados para países africanos, revelou altos valores de *F_{st}* e baixos *N_m*, resultando em alta diferenciação genética e baixo fluxo gênico. Os dados apresentados neste estudo apontam para a necessidade de uma contínua vigilância entomológica e molecular dos *Anopheles* vetores presente nas duas regiões de estudo, afim de orientar as estratégias a serem empregadas nos programas de controle locais.

Palavras-chave: *Anopheles* spp.; *Plasmodium* spp.; resistência a inseticidas; variação genética.

ABSTRACT

DA CRUZ, Derciliano Lopes. Anophelines characterization in two regions of malaria transmission (Brazil and Cabo Verde): species identification, vectorial infection, detection of insecticide resistance genes and analysis of genetic variability. 2022. Tesis (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Anopheles mosquitoes are considered the only vectors responsible for *Plasmodium* spp. transmission, the etiological agent of malaria, globally. In Africa, malaria is distributed in almost all regions, including Cabo Verde, a country located in West Africa. In the Americas, Brazil, is the second country that most reports cases of the disease, with two distinct epidemiological scenarios: high endemicity (Amazon region) and no endemicity (extra-Amazon region). In both continents, one of the main strategies to combat the disease is vector control through the use of chemical insecticides. However, the indiscriminate use of insecticides has led to the selection of genes that confer resistance in mosquitoes, which makes it difficult to control these populations. Thus, knowledge of the genetic structure of anopheline vectors and detection of resistance alleles can support decision-making in vector control programs. This study aimed to evaluate the circulation of malaria vectors, natural infection by *Plasmodium* spp., the occurrence of alleles that confer resistance to chemical insecticides and genetic variability in anophelines from two regions: Praia, Cabo Verde (endemic region) and municipality of Conde-PB, Brazil (without endemicity). Anopheline identification using IGS revealed a total of 235 specimens of *Anopheles arabiensis* collected in Cabo Verde. In Conde, 323 specimens of *Anopheles* were molecularly identified using DNA barcoding: *An. aquasalis* (135), *An. minor* (62), *An. triannulatus* (32), *An. albitarsis* s.l (30), *An. argyritarsis* (18), *An. peryassui* (15), *An. oswaldoi* (5), *An. braziliensis* (3), *An. sawyeri* (3) and *Anopheles* spp. (20). Molecular investigation of *Plasmodium* spp. was performed on 312 female *Anopheles* mosquitoes collected in Conde-PB, resulting in no positive sample for *Plasmodium*. Genotyping of resistance genes (*Nav*, *GSTE2* and *ace-1*) and genetic variability (*COI*, *ND5*) were performed for the species *An. arabiensis* collected in Cabo Verde and for three potential vectors (*An. albitarsis* s.l, *An. aquasalis* and *An. argyritarsis*) collected in the municipality of Conde. No SNPs were found in the resistance genes, with the exception of the *Nav* gene, which revealed the presence of L1014S/F alleles in the *An. arabiensis* population collected in Cabo Verde, with frequencies of 0.15 and 0.17, in two analyzed localities. In general, the study of the local genetic diversity of anophelines collected in both regions revealed low genetic diversity, with high *Nm* and low *Fst* values. A global analysis, comparing Cabo Verde populations with those available in databases for African countries, revealed high *Fst* values and low *Nm*, resulting in high genetic differentiation and low gene flow. The data presented in this study point to the need for continuous entomological and molecular surveillance of *Anopheles* vectors present in the two study regions, in order to guide the strategies to be used in local control programs.

Keywords: *Anopheles* spp.; *Plasmodium* spp.; insecticide resistance; genetic variation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Número de casos de malária em Cabo Verde registrado por município em 2017.	39
Quadro 2 -	<i>Primers</i> usados na amplificação da região IGS em espécies do complexo <i>Anopheles gambiae</i> .	73
Quadro 3 -	<i>Primers</i> usados na amplificação da subunidade 18s do RNA ribossomal (18s-rRNA) de <i>Plasmodium spp.</i>	76
Figura 1 -	Mapa global de espécies de <i>Anopheles</i> vetores dominantes.	29
Figura 2 -	Ciclo de vida dos anofelinos.	31
Figura 3 -	Distribuição de espécies de mosquitos em Cabo Verde	33
Figura 4 -	Mapa global da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país em 2018.	35
Figura 5 -	Número total de casos de malária registrados no ano de 2018 no mundo.	37
Figura 6 -	Porcentagem de espécies de <i>Plasmodium</i> responsáveis por casos autóctones nas Américas em 2010 e 2018.	40
Figura 7 -	Proporção de casos estimados de malária nas Américas em 2018.	41
Figura 8 -	Localização dos casos da malária no município do Conde-PB, durante o surto detectado em 2019.	42
Figura 9 -	Esquema representando o sítio de ação das quatro classes de inseticidas químicos.	46

Figura 10 - Estrutura molecular do Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).	47
Figura 11 - Estrutura molecular do Temephos.	48
Figura 12 - Estrutura molecular do Propoxur.	48
Figura 13 - Estrutura molecular da deltametrina (A) e cipermetrina (B).	49
Figura 14 - Distribuição global do fenótipo de resistência aos inseticidas químicos em populações de <i>Anopheles</i> no período de 2005 a 2020.	54
Figura 15 - Estrutura cristalográfica de <i>ace-1</i> de <i>An. gambiae</i> .	55
Figura 16 - Representação esquemática do canal de sódio.	56
Figura 17 - Representação esquemática das fases de metabolização dos xenobióticos.	58
Figura 18 - Estrutura cristalográfica da enzima <i>GSTE2</i> de <i>Anopheles gambiae</i>	60
Figura 19 - Estrutura do genoma mitocondrial de <i>Anopheles sinensis</i> .	61
Figura 20 - Localização geográfica do arquipélago de Cabo Verde e da cidade da Praia.	67
Figura 21 - Localização geográfica do Brasil e do município do Conde, no Estado da Paraíba.	68
Figura 22 - Concha adaptada para coleta de formas jovens.	70
Figura 23 - Instrumentos utilizados na coleta de mosquitos adultos.	71
Figura 24 - Representação dos fragmentos de DNA da região IGS de espécies do complexo <i>Anopheles gambiae</i> amplificados por PCR.	72

Figura 25 -	Representação esquemática dos produtos de PCR obtidos da região 18s-rRNA a partir de quatro espécies de <i>Plasmodium</i> spp.	76
Figura 26 -	Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados a partir da PCR da região IGS utilizado para taxonomia molecular de mosquitos do complexo <i>Anopheles gambiae</i> .	88
Figura 27 -	Pontos de coleta de mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.	90
Figura 28 -	Árvore filogenética do fragmento do gene <i>COI</i> de anofelinos coletados no município do Conde, de julho a novembro de 2019.	93
Figura 29 -	Densidade de anofelinos por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro 2019.	94
Figura 30 -	Diversidade de espécies de <i>Anopheles</i> por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.	95
Figura 31 -	Mapa de estimativa de densidade do kernel (KDE) mostrando as áreas de risco para a ocorrência de malária e de três potenciais da malária, no estado da Paraíba.	97
Figura 32 -	Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados a partir da Nested-PCR da região 18S-RNAr de <i>Plasmodium</i> spp.	98
Figura 33 -	Distribuição da frequência alélica de L1014S e L1014F, do gene <i>Na_v</i> , em mosquitos <i>Anopheles</i> coletados na cidade da Praia, Cabo Verde.	102
Figura 34 -	Rede de haplótipos do gene <i>COI</i> (672 pb) das populações de <i>Anopheles arabiensis</i> coletados em duas localidades da cidade da Praia, Cabo Verde, no ano de 2017.	105

- Figura 35** - Rede de haplótipos de 77 sequências do gene *COI* (441pb) de 107 populações de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.
- Figura 36** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* das 107 populações de *Anopheles arabiensis*, de diferentes países usados na análise.
- Figura 37** - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* de diferentes 109 populações de *Anopheles arabiensis*.
- Figura 38** - Rede de haplótipos de 95 sequências do gene *ND5* (665 pb) de 113 populações de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.
- Figura 39** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* 114 das populações de *Anopheles arabiensis*, de diferentes países usados na análise.
- Figura 40** - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *ND5* de diferentes 116 populações de *Anopheles arabiensis*.
- Figura 41** - Rede de haplótipos do gene *COI* (642 pb) da população de 119 *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.
- Figura 42** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da 119 população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.
- Figura 43** - Filograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de 120 *Anopheles argyritarsis* coletada no município do Conde-PB.
- Figura 44** - Rede de haplótipos do gene *ND5* (407 pb) da população de 122 *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.

- Figura 45** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 122
- Figura 46** - Rede de haplótipos do gene *COI* (636 pb) da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 124
- Figura 47** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 125
- Figura 48** - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles aquasalis* coletada no município do Conde-PB. 126
- Figura 49** - Rede de haplótipos do gene *ND5* (409pb) da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 128
- Figura 50** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 128
- Figura 51** - Rede de haplótipos do gene *COI* (668 pb) da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 130
- Figura 52** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 131
- Figura 53** - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada no município do Conde-PB. 132

- Figura 54** - Rede de haplótipos do gene *ND5* (415 pb) da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 134
- Figura 55** - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019. 134
- Figura 56** - Filograma baseado nos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada no município do Conde-PB. 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR para amplificação da região IGS de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	73
Tabela 2 -	Reagentes e concentrações específicas para amplificação por PCR do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles spp.</i> coletados no município do Conde-PB.	74
Tabela 3 -	Reagentes e concentrações específicas utilizadas na reação de PCR Nested-1.	77
Tabela 4 -	Reagentes e concentrações específicas utilizadas na reação de PCR Nested-2.	77
Tabela 5 -	Reagentes e concentrações específicas para a detecção das mutações L1014S/1014F no gene <i>Na_v</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> .	79
Tabela 6 -	Reagentes e concentrações específicas para a detecção das mutações L1014S/1014F no gene <i>Na_v</i> das diferentes espécies de <i>Anopheles</i> coletados no município do Conde.	79
Tabela 7 -	Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação G119S no gene <i>ace-1</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> .	80
Tabela 8 -	Composição do mix de reação da digestão enzimática para a detecção da mutação G119S no gene <i>ace-1</i> .	81
Tabela 9 -	Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação G119S no gene <i>ace-1</i> de espécies de <i>Anopheles</i> coletados no município do Conde.	81

Tabela 10 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação L119F no gene <i>GSTE2</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> .	82
Tabela 11 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação L119F no gene <i>GSTE2</i> de espécies de <i>Anopheles</i> coletados no município do Conde.	83
Tabela 12 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles spp.</i> coletados na ilha de Santiago e no município do Conde-PB.	85
Tabela 13 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação do gene <i>ND5</i> de <i>Anopheles spp.</i> coletados na ilha de Santiago.	85
Tabela 14 - Reagentes e concentrações específicas utilizadas para amplificação do gene <i>ND5</i> de <i>Anopheles spp.</i> coletados no município do Conde-PB.	86
Tabela 15 - Número de espécies de <i>Anopheles</i> coletadas através de diferentes instrumentos no município do Conde de julho a novembro de 2019.	91
Tabela 16 - Número de espécies de <i>Anopheles</i> coletadas no município do Conde por ambiente de coleta no período de julho a novembro de 2019.	92
Tabela 17 - Densidade de espécies de <i>Anopheles</i> coletadas por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.	96
Tabela 18 - Genótipo do <i>locus ace-1</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> nas diferentes localidades de coleta da cidade da Praia, Ilha de Santiago.	99
Tabela 19 - Genótipos do <i>locus ace-1</i> de três espécies de <i>Anopheles</i> (<i>An.</i>	99

	<i>albitarsis s.l.</i> , <i>An. aquasalis</i> e <i>An. argyritarsis</i>) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.	
Tabela 20	- Genótipo do <i>locus GSTE2</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> nas diferentes localidades de coleta da cidade da Praia, Ilha de Santiago.	100
Tabela 21	- Genótipos do <i>locus GSTE2</i> de três espécies de <i>Anopheles</i> (<i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. aquasalis</i> e <i>An. argyritarsis</i>) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.	101
Tabela 22	- Genótipo e frequência dos alelos L1014S e L1014F, do gene <i>Nav</i> , da população de <i>Anopheles arabiensis</i> coletada em diferentes localidades da cidade da Praia, Cabo Verde.	102
Tabela 23	- Genótipos do <i>locus Nav</i> de três espécies de <i>Anopheles</i> (<i>An. albitarsis s.l.</i> , <i>An. aquasalis</i> e <i>An. argyritarsis</i>) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.	103
Tabela 24	- Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>COI</i> de 46 indivíduos de <i>Anopheles arabiensis</i> coletados em duas localidades da cidade da Praia no ano de 2017.	104
Tabela 25	- Distribuição dos haplótipos do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles arabiensis</i> coletados nas duas localidades da cidade da Praia, Cabo Verde, no ano de 2017.	105
Tabela 26	- Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>COI</i> de 77 indivíduos de <i>Anopheles arabiensis</i> usados na análise global.	106
Tabela 27	- Frequência haplotípica do gene <i>COI</i> por populações de <i>Anopheles arabiensis</i> analisadas.	108
Tabela 28	- Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal) entre as populações de <i>Anopheles</i>	111

arabiensis baseado no gene *COI*.

Tabela 29 -	Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>ND5</i> de 95 indivíduos de <i>Anopheles arabiensis</i> usados na análise global.	113
Tabela 30 -	Frequência haplotípica do gene <i>ND5</i> por populações de <i>Anopheles arabiensis</i> analisadas.	115
Tabela 31 -	Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal) entre as populações de <i>Anopheles arabiensis</i> baseado no gene <i>ND5</i> .	117
Tabela 32 -	Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles argyritarsis</i> coletados no município do Conde-PB.	118
Tabela 33 -	Frequência haplotípica do gene <i>COI</i> da população <i>Anopheles argyritarsis</i> coletada no município do Conde-PB.	120
Tabela 34 -	Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal), do gene <i>COI</i> , entre <i>Anopheles argyritarsis</i> coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.	121
Tabela 35 -	Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>ND5</i> de <i>Anopheles argyritarsis</i> coletadas no município do Conde-PB.	121
Tabela 36 -	Frequência haplotípica do gene <i>ND5</i> da população de <i>Anopheles argyritarsis</i> coletada no município do Conde-PB.	123
Tabela 37 -	Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal), do gene <i>ND5</i> , entre <i>Anopheles arabiensis</i> coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.	123

Tabela 38 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles aquasalis</i> coletadas no município do Conde-PB.	124
Tabela 39 - Frequência haplotípica do gene <i>COI</i> da população de <i>Anopheles aquasalis</i> coletada no município do Conde-PB.	125
Tabela 40 - Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal), do gene <i>COI</i> , entre <i>Anopheles aquasalis</i> coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.	127
Tabela 41 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>ND5</i> de <i>Anopheles aquasalis</i> coletadas no município do Conde-PB.	127
Tabela 42 - Frequência haplotípica do gene <i>ND5</i> da população de <i>Anopheles aquasalis</i> coletada no município do Conde-PB.	129
Tabela 43 - Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal), do gene <i>ND5</i> , entre <i>Anopheles aquasalis</i> coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.	129
Tabela 44 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>COI</i> de <i>Anopheles albitarsis s.l</i> coletados no município do Conde-PB.	130
Tabela 45 - Frequência haplotípica do gene <i>COI</i> da população de <i>Anopheles albitarsis s.l</i> coletada no município do Conde-PB.	131
Tabela 46 - Diferenciação genética (<i>Fst</i> , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (<i>Nm</i> acima da diagonal), do gene <i>COI</i> , entre <i>Anopheles albitarsis s.l</i> coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.	133
Tabela 47 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>ND5</i> de <i>Anopheles albitarsis s.l</i> coletadas no município do Conde-PB.	133

- Tabela 48** - Frequência haplotípica do gene *ND5* da população de *Anopheles albitarsis* s.l coletada no município do Conde-PB. 135
- Tabela 49** - Diferenciação genética (*Fst*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal), do gene *ND5*, entre *Anopheles albitarsis* s.l coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB. 135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ace-1* - Gene acetilcolinesterase
- AChE - Enzima acetilcolinesterase
- AGT - Achada Grande Tras
- An. gambiae s.l* - *Anopheles gambiae sensu lato*
- An. gambiae s.s* - *Anopheles gambiae sensu stricto*
- AluI - Enzima de restrição *Arthobacter luteus* 1
- CMs - Carbamatos
- DDT - Diclorodifeniltricloroetano
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DVS – dominant vector species (Espécies vetoras dominantes)
- ESTs – Esterases
- F_{st} – índice de fixação de Wright
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- GSTs - Glutathione S – transferases
- GSH - Glutathione reduzida
- IGS - Intergenic Spacers (espaçadores intergênicos)
- IRS - Indoor residual spraying (pulverização residual intradomiciliar)
- ITNs – Insecticide-treated bed nets (redes mosquiteiras tratadas com inseticida)
- Kdr** - *Knockdown Resistance* (resistência do tipo nocaute)
- LLINs - Long-lasting insecticidal nets (redes impregnadas com inseticidas de longa duração)
- Na_v - Canal de sódio dependente de voltagem
- NaCl - Cloreto de sódio
- Nm – número de migrantes por gerações
- OCs - Organoclorados
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- OPs – Organofosforados
- PIACM - Plano de Intensificação do Controle da Malária na Amazônia Legal
- PCR - Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
- PNCM - Plano Nacional de Controle da Malária
- PYRs - Piretróides
- P450s - monooxigenases dependentes de citocromo P450

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição)

SVIRE - Serviço de vigilância integrada e resposta a epidemias

SDS - Sodium Dodecil Sulfate (dodecilsulfato de sódio)

SNP - polimorfismos de nucleotídeo único

TE - TRIS-EDTA (Tris - ácido etilenodiamino tetra-acético)

UV- Ultravioleta

VGSC - Voltage-gated sodium channel (canal neuronal de sódio dependente de voltagem)

WHOPES - Who Pesticide Evaluation Scheme (Esquema de Avaliação de Pesticidas da OMS)

r^2 – Coeficiente de determinação (%)

r – Coeficiente de Correlação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REFERENCIAL TEÓRICO	29
2.1 Vetores da malária	29
<i>2.1.1 Ciclo de vida dos anofelinos</i>	30
<i>2.1.2 Vetores da malária na África</i>	31
<i>2.1.3 Vetores da malária nas Américas</i>	33
2.2 Epidemiologia da malária no mundo	35
<i>2.2.1 Epidemiologia da malária no continente africano</i>	36
<i>2.2.2 Epidemiologia da malária em Cabo Verde</i>	38
<i>2.2.3 Epidemiologia da malária nas Américas</i>	39
<i>2.2.4 Epidemiologia da malária no Brasil</i>	40
2.3 Controle da malária	43
<i>2.3.1 Controle químico</i>	44
2.3.1.1 Organoclorados	46
2.3.1.2 Organofosforados	47
2.3.1.3 Carbamatos	48
2.3.1.4 Piretróides	49
2.4 Situação do controle da malária em Cabo Verde	49
2.5 Situação do controle da malária no Brasil	51
2.6 Resistência aos inseticidas	53
<i>2.6.1 Mecanismos de insensibilidade do sítio-alvo</i>	55
<i>2.6.2 Mecanismos de resistência metabólica</i>	57
2.6.2.1 Glutathione S-transferases (GSTs)	58
2.7 Marcadores genéticos utilizados em estudos da variabilidade genética	60
3 JUSTIFICATIVA	63
4 PERGUNTAS CONDUTORAS	64
5 OBJETIVOS	65
5.1 Objetivo geral	65
5.2 Objetivos específicos	65

6 MATERIAL E MÉTODOS	66
6.1 Áreas de estudo	66
<i>6.1.1 Ilha de Santiago, Cabo Verde</i>	66
<i>6.1.2 Município do Conde - Paraíba, Brasil</i>	67
6.2 Identificação de mosquitos adultos do gênero <i>Anopheles</i>	69
<i>6.2.1 Amostragem e identificação morfológica de mosquitos adultos</i>	69
<i>6.2.2 Extração de DNA e identificação molecular de espécies de <i>Anopheles</i></i>	71
6.3 Determinação de infecção natural por <i>Plasmodium spp.</i>	75
6.4 Detecção de mutações associados a resistência em populações de <i>Anopheles</i>	78
<i>6.4.4 Sequenciamento de DNA, análise e detecção de mutações</i>	83
6.5 Estudo da diversidade genética de populações de <i>Anopheles</i>	83
<i>6.5.1 Análise estatística das informações genéticas</i>	86
7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	87
8 RESULTADOS	88
8.1 Identificação morfológica e molecular de anofelinos coletados nas duas regiões de estudo	88
<i>8.1.2 Ilha de Santiago</i>	88
<i>8.1.3 Município do Conde – PB</i>	89
8.2 Determinação de infecção natural por <i>Plasmodium spp.</i> em anofelinos coletados no município do Conde, estado da Paraíba	97
8.3 Detecção de mutações associados à resistência aos inseticidas químicos	98
<i>8.3.1 Detecção da mutação G119S no gene <i>ace-1</i></i>	98
<i>8.3.2 Detecção da mutação L119F no gene <i>GSTE2</i></i>	100
<i>8.3.3 Detecção de mutações do tipo <i>Kdr</i> no gene <i>Na_v</i></i>	101
8.4 Estudo da diversidade genética de populações de <i>Anopheles</i>	103
<i>8.4.1 Caracterização genética da população de <i>Anopheles arabiensis</i> coletada em Cabo Verde</i>	103
<i>8.4.2 Caracterização genética da população de <i>Anopheles</i> coletados no município do Conde-PB</i>	118
9 DISCUSSÃO	136

10 CONCLUSÕES	145
11 RECOMENDAÇÕES	146
REFERÊNCIAS	147
APÊNDICE A - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS AMPLIFICADA DO GENE <i>NA_V</i> DE <i>Anopheles arabiensis</i> (GENBANK: KR867649.1)	175
APÊNDICE B - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DO GENE <i>ACE-1</i> DE <i>Anopheles arabiensis</i> E A RESPECTIVA PROTEÍNA RESULTANTE (VECTOR BASE: AGAP001356)	176
APÊNDICE C - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DO GENE <i>GSTE2</i> DE <i>Anopheles arabiensis</i> AMPLIFICADO E A PROTEÍNA RESULTANTE (VECTOR BASE: AARA008732)	179
APÊNDICE D - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS AMPLIFICADA DO GENE <i>GSTE2</i> DE <i>Anopheles darlingi</i> (VECTOR BASE: ADAC008205)	180
APÊNDICE E - CÓDIGO DE ACESSO DAS 31 SEQUÊNCIAS DO GENE <i>COI</i> DE <i>An. arabiensis</i> OBTIDAS NO GENBANK	181
APÊNDICE F - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>COI</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS.	182
APÊNDICE G - CÓDIGO DE ACESSO DAS 49 SEQUÊNCIAS DO GENE <i>ND5</i> DE <i>An. arabiensis</i> OBTIDAS NO GENBANK	183
APÊNDICE H - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>ND5</i> DE <i>Anopheles arabiensis</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS	185
APÊNDICE I - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>COI</i> DE <i>Anopheles argyristarsis</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS	187
APÊNDICE J - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>COI</i> DE <i>Anopheles aquasalis</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS	188
APÊNDICE K - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>COI</i> DE <i>Anopheles albitarsis s.l</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS	189
APÊNDICE L - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>ND5</i> DE <i>Anopheles albitarsis s.l</i> E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS	190
APÊNDICE M – ARTIGOS, LIGADOS AO PROJETO, PUBLICADOS	191
ANEXO – PARECER ÉTICO	193

1 INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* está associada à transmissão do *Plasmodium*, agente etiológico da malária. Dentre estes, os mosquitos do complexo *Anopheles gambiae* são considerados os principais vetores responsáveis pela transmissão deste patógeno causador da doença (LUC et al., 2016; MILLAR; COX-SINGH, 2015; WIEBE et al., 2017). A malária é uma doença infecciosa considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (REID; MCKENZIE, 2016). Devido aos esforços empregados no controle da doença, várias regiões registraram a redução do número de casos de malária no mundo (DADZIE et al., 2016). No entanto, essa não é a realidade de todas as regiões, visto que no continente africano ainda há regiões que registram números alarmantes de casos da doença (cerca de 90%) (KAWADA et al., 2011).

Em Cabo Verde (CV), arquipélago situado na África Ocidental, a malária é considerada endêmica, mas, desde 1990, o nível de transmissão tinha permanecido muito baixo, com ocorrência de casos predominantemente nas ilhas de Santiago e Boa Vista (ALVES et al., 2006). Mosquitos da espécie *Anopheles arabiensis* Paton, 1905, membro do complexo *An. gambiae*, é considerado o único vetor implicado na transmissão da doença em Cabo Verde. Esta espécie participa do ciclo de transmissão de *Plasmodium falciparum*, a única espécie do parasita descrita como responsável por causar a malária no país (CABO VERDE, 2015; CAMBOURNAC; PETRARCA; COLUZZI, 1982). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), desde 2000, o número de casos de malária registrados em Cabo Verde tem demonstrado variações ao longo dos anos. Mais recentemente, segundo o boletim do Serviço de Vigilância Integrada e Resposta a Epidemias (SVIRE) daquele país, foram registrados, de janeiro a novembro de 2017, mais de 430 casos de malária, 412 dos quais foram de transmissão autóctone e 18 considerados como casos importados. A cidade da Praia, na ilha de Santiago, apresentou o maior número de registros, com 421 casos (412 locais). O restante dos casos foi importado de países vizinhos como, Nigéria, Angola, Senegal, Guiné-Bissau, Guiné Conacri e Costa do Marfim (BOLETIM INFORMATIVO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE DE CABO VERDE, 2017). Nos últimos três anos não houve transmissão local em Cabo Verde, o que confere ao arquipélago a elegibilidade para se candidatar à certificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de eliminação da malária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

Nas Américas, depois da Venezuela, o Brasil é o país que mais registra casos de malária (cerca de 23% das ocorrências) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a), com dois cenários epidemiológicos distintos: alta endemicidade, observada na região Amazônica (responsável por aproximadamente 99% dos casos ocorridos no Brasil), e hipoendemicidade, na região extra-amazônica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). O estado do Amazonas apresenta o maior número de casos da doença (BRASIL, 2019a). O município do Conde, no estado da Paraíba (PB), situado na região extra-amazônica apresenta áreas de manguezais que constituem um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho. Espécies de *Anopheles* que se reproduzem nestes ambientes exibem um padrão diversificado de comportamento, alimentando-se em áreas peridomiciliares e repousando em áreas extradomiciliares (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Apesar de ser considerada uma área não endêmica, o município registrou 21 casos da doença em 2019, todos associados à infecção por *Plasmodium vivax* (PARAÍBA, 2019).

Devido à falta de vacinas para prevenir a malária, a principal forma de prevenção da doença é o controle do próprio vetor (REID; MCKENZIE, 2016). O controle de anofelinos é feito principalmente pelo uso de inseticidas químicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012a). No entanto, o uso intensivo e indiscriminado destes compostos tem levado ao surgimento de resistência em populações de *Anopheles* spp., principalmente para populações africanas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). A resistência aos inseticidas está associada à presença de alelos nas populações naturais que conferem vantagem adaptativa. Estes alelos associados à resistência podem ser selecionados como consequência do uso intensivo de inseticidas, o que provoca uma pressão de seleção.

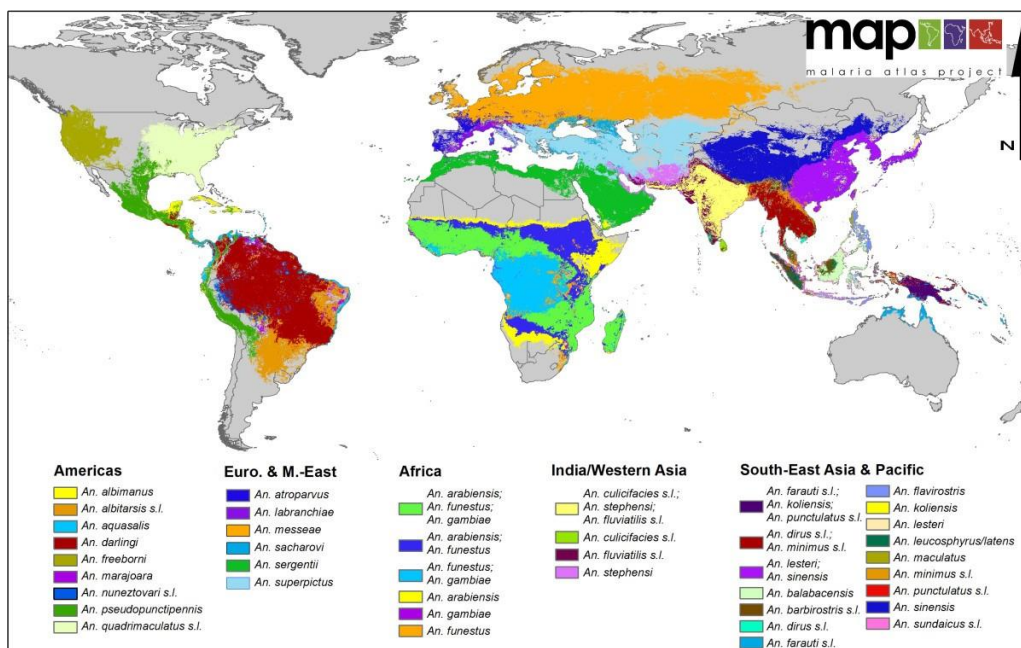
Dada a ocorrência recente de casos de malária e o uso de inseticidas no controle dos vetores da doença na ilha de Santiago - Cabo Verde e no município do Conde - PB, a vigilância entomológica e molecular dos vetores incriminados são essenciais para auxiliar na tomada de decisão nos programas de controle locais. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar anofelinos coletados na ilha de Santiago e no município do Conde - PB quanto à presença de vetores da malária, infecção natural por *Plasmodium* spp, ocorrência de alelos que conferem resistência a inseticidas químicos e variabilidade genética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vetores da malária

A família Culicidae consiste em duas subfamílias reconhecidas como Culicinae e Anophelinae. A classificação tradicional da subfamília Anophelinae, contém aproximadamente 480 espécies reconhecidas e é composta por três gêneros: *Anopheles* Meigen, que é cosmopolita, *Bironella* Theobald, encontrada na região australiana e *Chagasia* Cruz (Neotropical) (HARBACH, 2004). A maioria dos anofelinos pertence ao gênero *Anopheles*, este que é subdividido em 7 subgêneros: *Anopheles s.s.* (cosmopolita), *Baimaia* (Oriental), *Cellia* (velho mundo), *Kerteszia* (Neotropical), *Lophopodomys* (Neotropical), *Nyssorhynchus* (Neotropical) e *Stethomyia* (Neotropical) (HARBACH, 2007). Os mosquitos do gênero *Anopheles* constituem os insetos de maior importância médica e econômica (LOAIZA et al., 2012) e são os únicos vetores da malária humana e zoonótica (MANIN; DRAKELEY; CHUA, 2018; WANG et al., 2016). Aproximadamente 70 espécies de *Anopheles* demonstram competência vetorial para a transmissão de patógenos do gênero *Plasmodium* causadores da malária humana e 41 delas são consideradas espécies vetoras dominantes (DVS – dominant vector species) (Figura 1) (HAY et al., 2010; SINKA et al., 2010a, 2012).

Figura 1 – Mapa global de espécies de *Anopheles* vetores dominantes.



Fonte: Sinka et al. (2012).

2.1.1 Ciclo de vida dos anofelinos

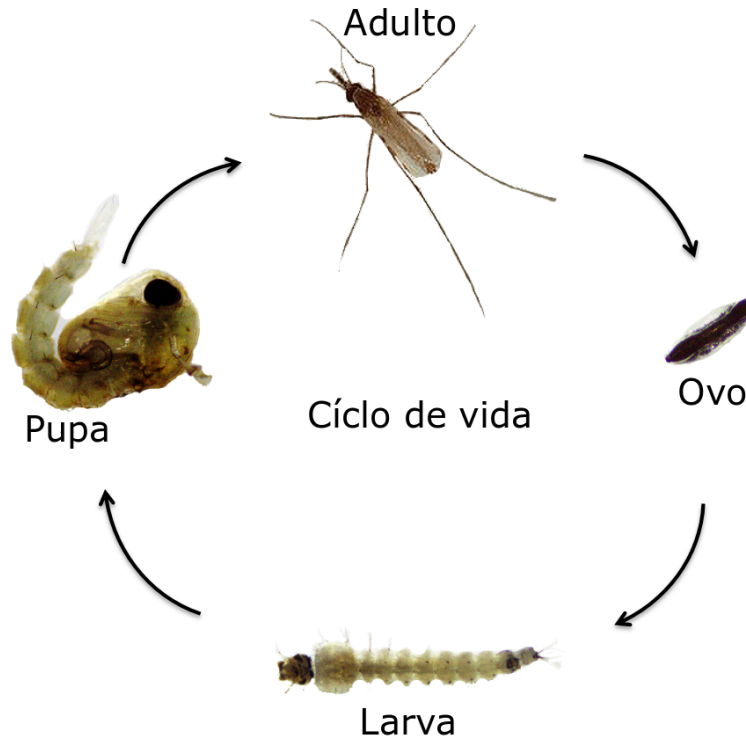
Como todos os culicídeos, os anofelinos passam por quatro fases em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 2). As três primeiras fases, consideradas fases jovens, são aquáticas e a fase adulta desenvolve-se no meio terrestre. Após a eclosão da larva, esta passa por quatro estádios larvais, e depois, um estágio de pupa. A partir da pupa ocorre a emergência do mosquito adulto. A maioria das espécies é não-autógena: após a cópula, as fêmeas precisam de um repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento de seus ovos (BECKER et al., 2010).

Após repasto sanguíneo, as fêmeas grávidas de mosquitos depositam seus ovos (entre 50 - 500 ovos por cada oviposição) em meio aquático (ex: poças, charcos, ribeiras, lagos, etc). No momento da postura, os ovos são brancos, acabando por tornarem-se escuros dentro de 1-2 h, por causa da desoxigenação (KOUTSOS et al., 2007). Os anofelinos ovipositam na superfície da água de forma isolada enquanto estão na superfície ou pairando acima dela. Seus ovos possuem um formato de canoa com flutuadores laterais, adaptados para manterem-se na superfície da água. Em condições extremas, como a seca, podem ser facilmente danificados por dissecação, pelo fato de não serem resistentes à seca. Dependendo do clima e espécie de *Anopheles* em questão, a eclosão das larvas ocorre dentro de 2 a 3 dias (BECKER et al., 2010).

Morfologicamente, as larvas são divididas em três segmentos típicos: cabeça, tórax e um abdômen segmentado (8 segmentos). Em contraste com outros mosquitos, as larvas dos anofelinos não têm sifão respiratório e, por isso, posicionam-se paralelamente à superfície da água para respirar através de espiráculos localizados no oitavo segmento abdominal (MULLEN; DURDEN, 2019). O seu ciclo de desenvolvimento compreende quatro estádios larvais (L₁, L₂, L₃ e L₄). No final de cada estádio, as larvas fazem a muda (se libertam do seu exoesqueleto) para permitir o crescimento adicional. Se alimentam através de filtração de partículas em suspensão na água (bactérias, protozoários, matéria orgânica, algas e outros microrganismos) (GARROS et al., 2008). No geral, o período larvar tem a duração de 5 a 7 dias (podendo variar de acordo com a temperatura e espécie) e o último estágio (L₄) se diferencia, resultando na emergência da pupa (OTERO; SCHWEIGMANN; SOLARI, 2008). Estas não se alimentam, utilizando a energia armazenada na fase larvária. Além disso, sofrem as últimas transformações para dar origem ao mosquito adulto 2-3 dias depois (BRASIL, 2015). O estágio final da metamorfose é completado quando ocorre a emergência do mosquito

adulto. Após a emergência, os adultos estão prontos para começar seu ciclo de vida novamente de acasalamento, alimentação e oviposição (Figura 2) (BECKER et al., 2010).

Figura 2 – Ciclo de vida dos anofelinos.



Fonte: adaptado de http://vectorinfo.icmr.org.in/Mosquito/An_lcycle.aspx

2.1.2 Vetores da malária na África

Globalmente, a África contém áreas que apresentam as maiores taxas entomológica de inoculação e níveis de prevalência de vetores, e, portanto, há maior morbimortalidade por malária (SINKA et al., 2010a). As espécies vetoras consideradas dominantes são espécies crípticas do complexo *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* do subgrupo Funestus (RIVERON et al., 2014; SINKA et al., 2012). Entre esses, os membros do complexo *An. gambiae* (ou simplesmente *An. gambiae* sensu lato), pertencentes ao subgênero *Cellia*, são considerados os principais vetores da malária na África (WHITE, 1974). Atualmente, o complexo consiste em pelo menos oito espécies crípticas: *Anopheles melas* Theobald, 1903, *Anopheles merus* Donitz, 1902, *Anopheles bwambae* White, 1985, *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911, *Anopheles quadriannulatus* espécie B Hunt, 1998, *Anopheles gambiae* sensu stricto Giles, 1902, *Anopheles arabiensis* Patton, 1905, *Anopheles amharicus* Coetzee, Hunt

& Wilkerson e *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson (forma molecular M) (COETZEE et al., 2013; FANELLO; SANTOLAMAZZA; DELA TORRE, 2002; HARBACH, 2004; HUNT; COETZEE; FETTENE, 1998).

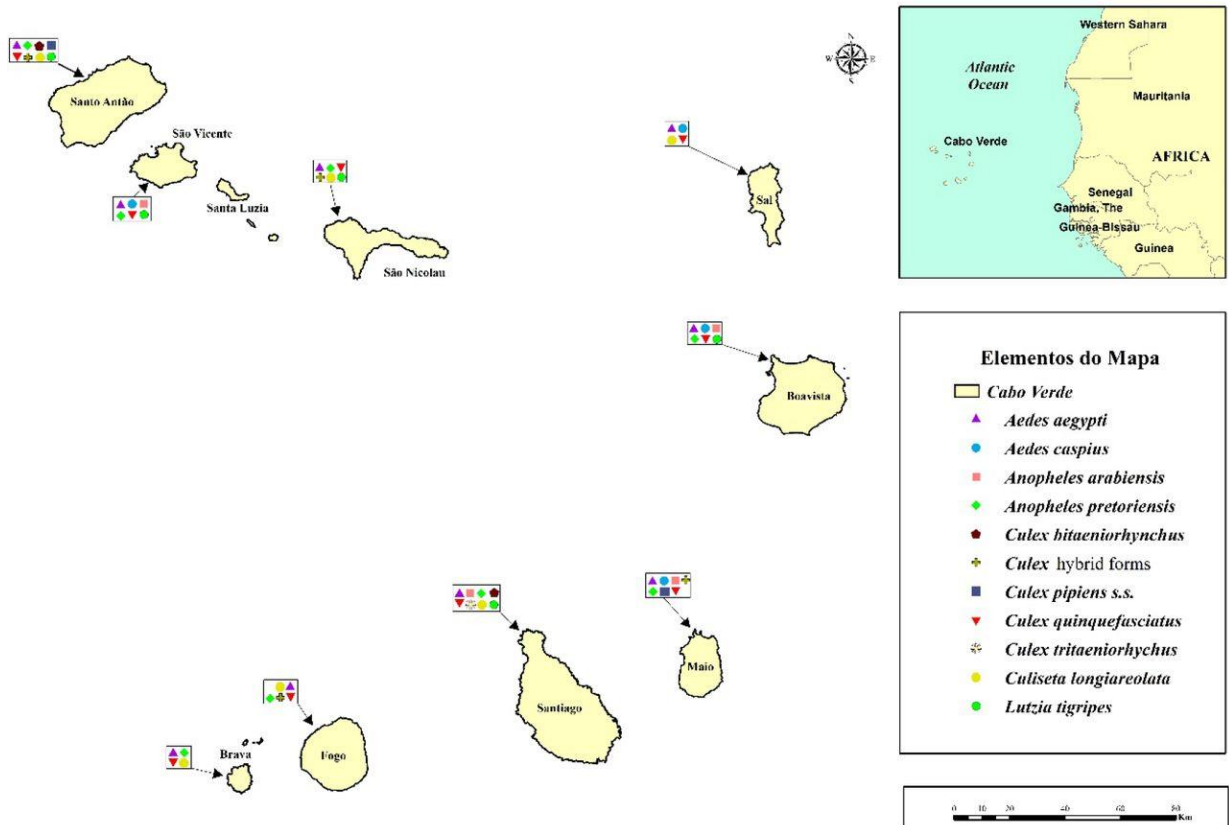
Dentre esses membros, *An. gambiae* s.s (ou simplesmente *Anopheles gambiae*) é a espécie mais eficiente como vetor, seguido do *Anopheles arabiensis* (COETZEE, 2004; KISZEWSKI et al., 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003). As espécies *An. melas* e *An. merus*, também são consideradas espécies vetoras dominantes, por serem frequentemente encontradas em altas densidades. Apesar disso, são menos eficientes na transmissão da malária do que *An. gambiae* ou *An. arabiensis* (BRYAN, 1983; CUAMBA; MENDIS, 2009; HARBACH, 2004). Apenas *An. quadriannulatus* Theobald, 1911, uma espécie com comportamento zoofílico, não está envolvida no ciclo de transmissão da malária (COLUZZI, 1984; WHITE, 1974).

Apesar de apresentarem morfologia idêntica, todas as espécies do complexo apresentam diferenças bio-ecológicas e comportamentais que influenciam na dinâmica da transmissão da malária (COLUZZI et al., 1979; DELLA TORRE et al., 2002). Por exemplo, *An. gambiae* s.s, principal vetor da malária na África, apresenta um comportamento ecológico extremamente diversificado. É uma espécie preferencialmente antropofílica, podendo se alimentar tanto no interior como no exterior das habitações (COLUZZI et al., 2002). Além disso é encontrado repousando em ambientes fechados ou abertos, apresentando marcada exofilia e endofilia. Suas larvas são encontradas em ampla variedade de habitats, incluindo criadouros permanentes e temporários, com pouca ou nenhuma matéria orgânica, e até em águas salinas. Essa espécie predomina nas regiões de floresta, mais úmidas, podendo ser encontradas também em ambientes áridos (COETZEE et al., 2013; MUTURI et al., 2010). Em comparação com *An. gambiae*, *An. arabiensis* é encontrado frequentemente em regiões mais áridas e com ampla distribuição geográfica (RIBEIRO et al., 1980). É uma espécie oportunista ou eclética, alimentando-se tanto de humanos como também de animais. Além disso, são consideradas endo-exofílicas e endofágicas, com atividade de picada essencialmente noturna (COETZEE et al., 2013; COLUZZI et al., 2002; TIRADOS et al., 2006).

Os membros do complexo *An. gambiae* são amplamente distribuídos no continente africano. Em Cabo Verde (África ocidental), *An. arabiensis* é o único membro do complexo *An. gambiae* registrado, e por vários anos tem sido considerado o único vetor da malária no país, desde sua descoberta na ilha de Santiago em 1909. Estudos anteriores apontaram a presença desta espécie em todas as ilhas de Cabo Verde, exceto nas ilhas do Sal e Brava (CAMBOURNAC; PETRARCA; COLUZZI, 1982; RIBEIRO et al., 1980). No entanto, em

estudos mais recentes sobre a fauna de mosquitos em Cabo Verde, *An. arabiensis* foi encontrada apenas na ilha de Santiago (ALVES et al., 2010) e posteriormente nas ilhas de Santiago, Maio, Boa Vista e São Vicente (LEAL et al., 2021) (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição de espécies de mosquitos em Cabo Verde.



Fonte: Leal et al. (2021).

2.1.3 Vetores da malária nas Américas

Nas Américas, diferentes vetores estão associados à transmissão da malária. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) é um dos subgêneros mais estudados devido à importância de seus membros como vetores da malária, principalmente na América do Sul e Central (SILVA-DO-NASCIMENTO et al., 2006). Este subgênero inclui seis principais vetores, alguns dos quais são um complexo de espécies: *An. albimanus* Wiedmann, 1820, complexo *An. albitarsis* Lynch-Arribálzaga, 1878, *An. aquasalis* Curry, 1932, *An. darlingi* Root, 1926, *An. braziliensis* Chagas, 1907 e *An. nuneztovari* s.l Gabaldón (LOUNIBOS; CONN, 2000; SINKA et al., 2010b). Os outros dois subgêneros, *Kerteszia* e *Anopheles*, contêm vetores de malária de importância local nas Américas, mas seu impacto geral é pequeno em relação às

espécies de *Nyssorhynchus*: *An. (Kerteszia) neivai*, *An. (Anopheles) pseudopunctipennis* e *An. (Anopheles) punctimacula* (LOUNIBOS; CONN, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Entre os mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, a espécie *An. darlingi* é considerada um dos vetores mais importantes da malária nas Américas. Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1926 por Root (HIWAT; BRETAS, 2011). Apresenta ampla distribuição geográfica, na América do Sul e Central, que se estende do sul do México ao norte da Argentina e do Leste dos Andes até a costa do Oceano Atlântico (FORATTINI, 1987; HIWAT; BRETAS, 2011; MORONI et al., 2010). *An. darlingi* é descrita como uma espécie silvestre, embora também tenha sido observada em ambientes antropogênicos, com acentuada endofilia. Se encontra principalmente em regiões a menos de 500 metros acima do nível do mar em áreas com alta umidade relativa, precipitação de mais de 1.000 mm e temperaturas variando entre 21 e 28 °C (MONTROYA-LERMA et al., 2011; VITTOR et al., 2006).

No Brasil, *An. darlingi* também é o principal vetor da malária humana (MORONI et al., 2010), principalmente na região amazônica (LOUNIBOS; CONN, 2000). Além de *An. darlingi*, outras espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* também envolvidas no sistema de transmissão da malária na Amazônia são *An. braziliensis*, *An. nuneztovari* s.l., *An. oswaldoi* s.l., *An. triannulatus* s.l. e *An. albitarsis* s.l. (CARLOS et al., 2019). Na região Extra-amazônica, *An. aquasalis* e *An. albitarsis* (considerado um complexo de espécies crípticas) apresentam maior relevância epidemiológica para a malária.

O *An. aquasalis* é um vetor que se reproduz preferencialmente em coleções de água parada e salobra, transitórias ou semipermanentes, ensolaradas ou parcialmente sombreadas, que ocorrem nas áreas baixas litorâneas, principalmente no nordeste do país (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; MACÁRIO REBÊLO et al., 2007). Esta espécie apresenta comportamento zoofílico e exofílico, com hábito essencialmente crepuscular mas, na ausência dos animais, em alta densidade, se alimenta em humanos. Por causa disso, a espécie também apresenta marcada antropofilia (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FIGUEIREDO et al., 2017). Segundo Consoli & Oliveira (1994), *An. aquasalis* é capaz de transmitir a malária somente em locais e ocasiões em que está em elevada densidade, quando tem oportunidade de atacar o homem em maior número. Essa peculiaridade tem sido constatada em outros anofelinos que também exibem pico máximo da atividade hematofágica, em humanos, no início da noite, como por exemplo, mosquitos do complexo *An. albitarsis*.

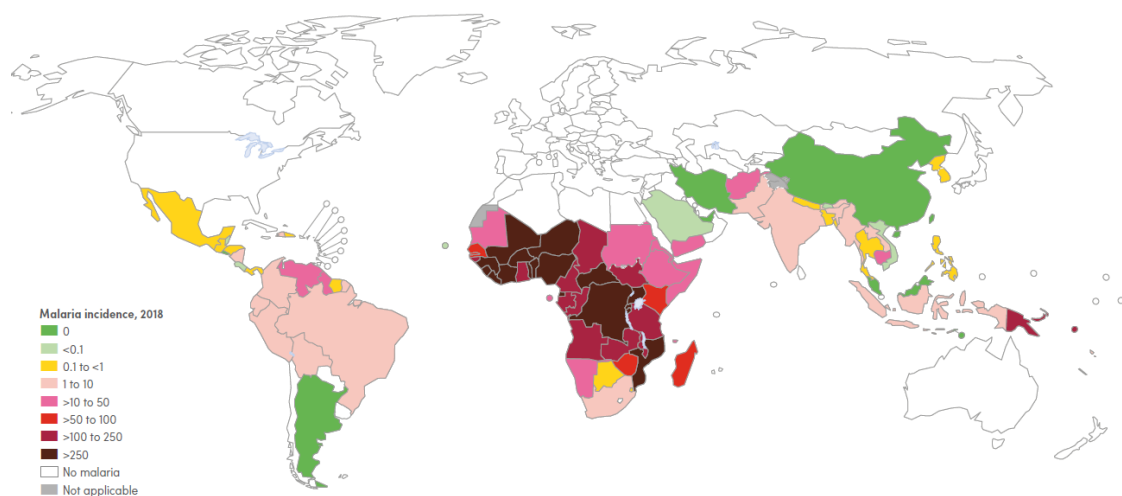
O complexo *An. albitarsis* consiste em cinco espécies, *An. albitarsis* s.s., *An. deaneorum*, *An. janconnae*, *An. marajoara* e *An. albitarsis* B (PÓVOA et al., 2006). Os

membros deste complexo são amplamente distribuídos no Brasil. É mais comum nas áreas de planície e baixada, sendo também abundante nos planaltos, mas torna-se raro à medida que se avança para terrenos com forte declive ou para dentro das florestas. Apresentam comportamentos zoofílico e exofílico (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.2 Epidemiologia da malária no mundo

A malária é uma doença infecciosa, transmitida ao homem por meio de fêmeas de *Anopheles spp.* infectadas com o parasita do gênero *Plasmodium spp.* A doença é considerada um dos grandes problemas de saúde pública em escala global, com ocorrência nos trópicos e subtropicais (Figura 4) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Figura 4 – Mapa global da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país em 2018.



Fonte: adaptado de OMS, (2019a).

Os agentes causadores da malária humana incluem: o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Recentemente, uma quinta espécie, *Plasmodium knowlesi*, também foi implicada como causadora da malária humana (MIGUEL-OTEO et al., 2017; MILLAR; COX-SINGH, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Globalmente, a malária ocorre em 92 países e 3,4 bilhões de pessoas correm o risco de serem infectadas e desenvolverem a doença, e 1,1 bilhão estão em alto risco (> 1 em 1000 chances de contrair malária em um ano) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018a). De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS),

estima-se que 228 milhões de casos de malária ocorreram em todo o mundo em 2018 (variação: 206 – 258 milhões) em comparação com 251 milhões de casos em 2010 (variação: 231 – 278 milhões) e 231 milhões de casos em 2017 (variação: 211 – 259 milhões) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a). Dentre os fatores prováveis que têm contribuído para esse cenário, destacam-se: a mudança ambiental ou fatores ecológicos, situação socioeconômica, mobilidade humana, o desenvolvimento de resistência a inseticidas em mosquitos vetores, ausência de uma vacina antimalárica eficaz e a distribuição de *Plasmodium* resistente a medicamentos (MUKHTAR; MUNYAKAZI; OUIFKI, 2020; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; TADEI et al., 1998).

A OMS divide o mundo em seis regiões, para fins administrativos, de análises e de relatórios anuais: região africana, região das Américas, região do Sudeste Asiático, Região Europeia, Região do Mediterrâneo Ocidental e Região do Pacífico Ocidental (OMS, 2014). A transmissão da malária ocorre em todas essas seis regiões. A Região Africana é a que mais registra casos da doença, com 213 milhões de casos (93%) em 2018, seguida pela Região do Sudeste Asiático da OMS (3,4%) e pela Região do Mediterrâneo Oriental da OMS (2,1%). Apesar das recentes conquistas na luta contra a malária, que resultaram em reduções significativas nas taxas de incidência da doença nos últimos anos, a malária ainda é considerada como uma das doenças mais mortais do mundo, causando aproximadamente 405.000 mortes a cada ano, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade (67% dos casos de morte) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019b). Além disso, a malária tornou-se uma ameaça para o desenvolvimento social e econômico nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente devido à diminuição da capacidade de trabalho das vítimas afetadas (SILVA; SANTOS; MARTINS, 2014).

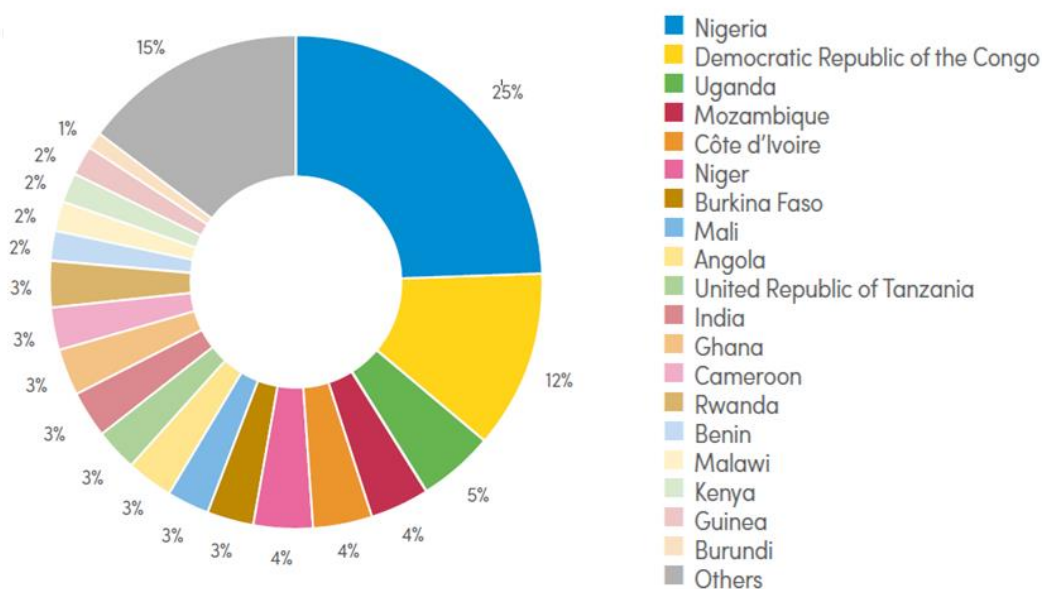
2.2.1 Epidemiologia da malária no continente africano

Num contexto mundial, a África é o continente mais afetado pela malária, devido a uma combinação de fatores: presença de vetores eficientes, alta prevalência das espécies mais mortais do parasita, condições climáticas locais geralmente permitem que a transmissão ocorra durante todo o ano, recursos escassos e instabilidade socioeconômica dificultaram atividades eficientes de controle da malária (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Os principais vetores da doença, são espécies do complexo *An.*

gambiae Giles s.l. (*sensu lato*) e a maioria dos casos são causados pelo protozoário *P. falciparum* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Aproximadamente 85% dos casos de malária em todo o mundo ocorrem em apenas 19 países: Índia (localizada no sudeste asiático) e 18 países africanos (Figura 5). A maioria dos casos foram registrados pela Nigéria (25%), seguida pela República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%) e Costa do Marfim (4%), Moçambique (4%) e Níger (4%). Dentre os países africanos, a Uganda foi o que registrou as maiores reduções absolutas de casos, com 1,5 milhões de casos a menos em 2018 do que em 2017, seguida por Zimbábue (0,6 milhão de casos) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018a, 2019a). Aumentos consideráveis foram observados em Gana com 0,5 milhões de casos a mais (aumento de 8%) e Nigéria (aumento de 6%, 3,2 milhões a mais de casos). As mudanças nos 14 países restantes foram geralmente pequenas, sugerindo uma carga semelhante de casos em 2017 e 2018 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a). De acordo com o relatório da OMS, aproximadamente 90% de todas as mortes por malária ocorrem na região africana da OMS (principalmente na África subsaariana), e 78% das mortes ocorrem em crianças menores de 5 anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014).

Figura 5 - Número total de casos de malária registrados no ano de 2018 no mundo.



Fonte: Adaptado de OMS (2019a).

2.2.2 Epidemiologia da malária em Cabo Verde

O arquipélago de Cabo Verde registra casos de malária há mais de cinco séculos, levantando a hipótese de que a doença foi introduzida no país ainda no século XV, com o povoamento das ilhas em 1462 (CABO VERDE, 2009). Imigrantes provenientes do continente africano e de países europeus tais como Espanha, Itália e Portugal estariam na origem do surgimento dos casos da doença, uma vez que Cabo Verde serviu como rota de escravos e rotas comerciais (CABO VERDE, 2009; CAMBOURNAC; PETRARCA; COLUZZI, 1982). *An. arabiensis* é descrito como o vetor responsável pela transmissão da malária, acreditando-se que essa espécie seja o único membro do complexo *gambiae* registrado no arquipélago desde 1982 (AREZ et al., 1999; CAMBOURNAC; PETRARCA; COLUZZI, 1982; PINTO et al., 1999). Esse achado foi reforçado por da Cruz et al. (2019) e Leal et al. (2021) que também identificaram apenas *An. arabiensis* em populações de *Anopheles* coletadas na ilha de Santiago. Até meados do século XIX, os casos de malária registrados em Cabo Verde eram causados por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, e desde 1994, apenas *P. falciparum* tem sido descrito no país (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012b, 2015).

No passado, a malária constituiu um importante problema de saúde pública. Antes da década de 1950, a transmissão da malária em Cabo Verde era considerada mesoendêmica, com taxas de incidência anual em torno de 100 por 1000 habitantes (RODRIGUEZ et al., 2012). Após essa data, duas epidemias importantes aconteceram ao longo dos anos, uma em 1978 (com 844 casos registrados e 13 mortes) e outra em 1988 (800 casos registrados e 12 mortes). Durante esse período, a transmissão da malária no arquipélago foi interrompida duas vezes, confirmando que a eliminação da doença é tecnicamente viável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012b; RODRIGUEZ et al., 2012).

Atualmente, o padrão de ocorrência da malária em Cabo Verde é considerado irregular, com transmissão sazonal e esporádica, de baixa endemicidade, sendo bastante variável de ano para ano, com registro de menos de 100 casos por ano (CABO VERDE, 2009). Como trata-se de uma área de transmissão baixa e instável, a infecção por malária é encontrada em todas as faixas etárias (ALVES et al., 2006). Em 2013 e 2014, o país registrou, por ano, 46 casos (em 2013, 22 autóctones e 24 importados; em 2014, 26 autóctones e 20 importados), com maior incidência nos adultos (CABO VERDE, 2015). Apesar dos casos anuais permanecerem abaixo de 100, em 2017 mais de 430 casos de malária foram registrados (423 casos com transmissão autóctone - todos na ilha de Santiago e 13 casos importados), todos causados por

P. falciparum (DEPINA et al., 2019), constituindo assim, um alerta para as autoridades de saúde, visto que, os casos ultrapassaram a média de casos que vinha sendo registrada nos últimos anos (Quadro 1). Por outro lado, nos anos seguintes (2018 e 2019), não foram registrados quaisquer casos autóctones da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020). Além da ilha de Santiago, a ilha da Boa Vista também apresenta baixa incidência para casos da malária, no entanto, os casos são na sua grande maioria importados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Quadro 1 – Número de casos número de casos de malária em Cabo Verde registrado por município em 2017.

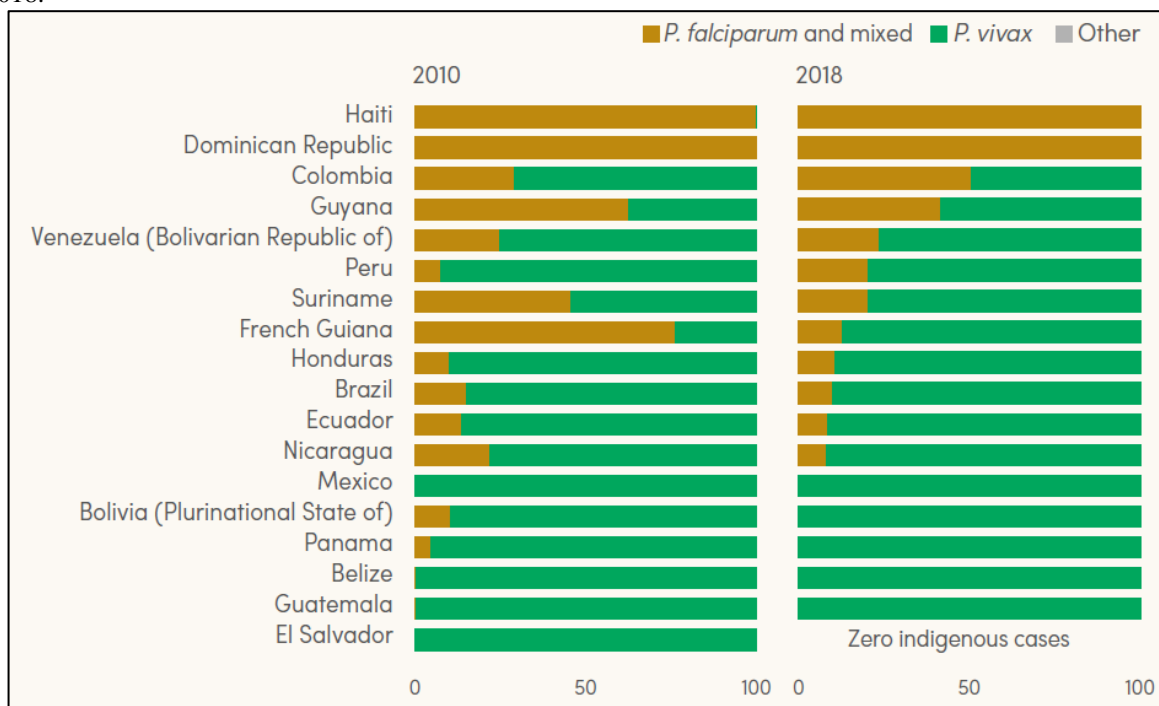
Municípios	Autóctones (n)	Importados (n)	Percentagem (%)
Praia	423	13	97,8
São Vicente	0	7	2,6
Santa Catarina	0	1	0,2
Porto Novo	0	1	0,2
Sal	0	1	0,2
Total	423	23	100

Fonte: adaptado de DePina et al. (2019).

2.2.3 Epidemiologia da malária nas Américas

Na Região das Américas, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países e áreas estão em risco de contraírem a malária, dos quais quase 80% são causados por *P. vivax*, seguido por *P. falciparum* e co-infecção (20%) (Figura 6) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a). Em 2018, aproximadamente 1 milhão de casos de malária e cerca de 600 mortes foram estimados, demonstrando um aumento de 14% e 26%, respectivamente, em comparação com 2010 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a). Dentre os países considerados endêmicos para a malária nas Américas, três deles, Brasil, Colômbia e Venezuela, são protagonistas, sendo responsáveis pela maioria dos casos estimados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Oito dos 19 países endêmicos para a malária nas Américas tinham como objetivo alcançar uma redução de mais de 40% na incidência de casos até 2020. Embora se tenha observado avanços na tentativa de redução da doença, nove países (Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, México, Nicarágua, Panamá e Venezuela) apresentaram aumentos significativos na incidência em 2018 em comparação com 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a, 2017, 2019a).

Figura 6 - Porcentagem de espécies de *Plasmodium* responsáveis por casos autóctones nas Américas em 2010 e 2018.



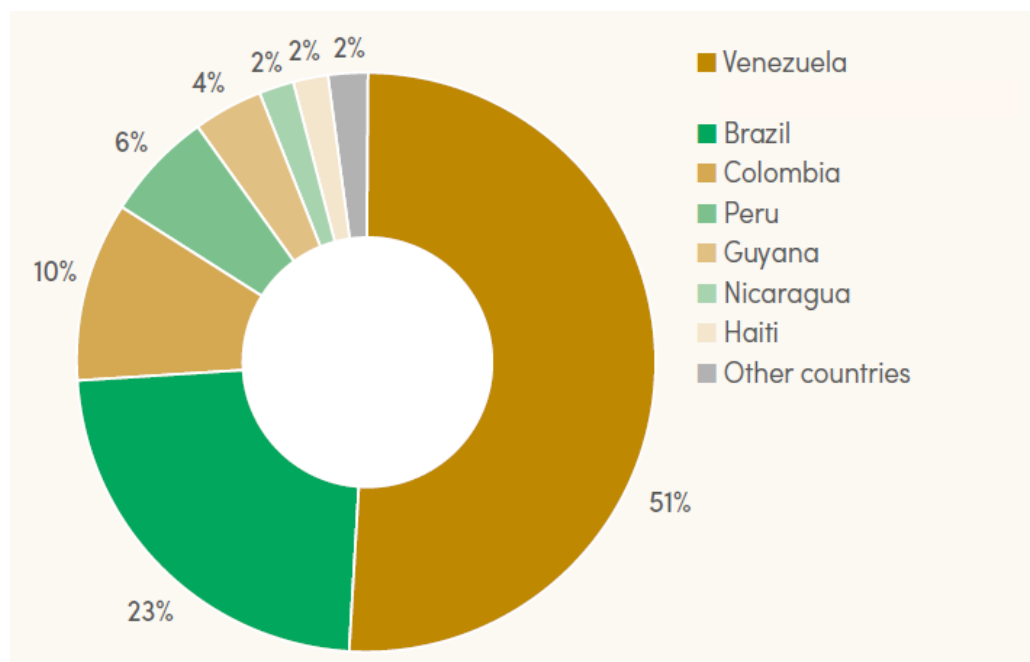
Fonte: Adaptado de OMS (2019a).

2.2.4 Epidemiologia da malária no Brasil

Apesar de não haver registros detalhados, sabe-se que a malária constitui um problema nacional desde o começo do século XIX provocando, aproximadamente, 10.000 mortes entre os anos 1907 e 1912 (CARLOS et al., 2019). Com a introdução do mosquito africano *An. arabiensis* no país em 1930, cerca de 15.000 casos da malária foram registrados e os casos de morte aumentaram consideravelmente, chegando a 14.000 mortes em 1938. Dois anos mais tarde, em 1940, após a campanha que resultou na eliminação de *An. arabiensis*, mais de seis milhões de casos da doença foram registrados (FERREIRA; CASTRO, 2016). Embora, com reduções significativas ao longo dos anos, após esforços dos programas de controle da malária, nos últimos 30 anos, houve flutuações no número de casos da malária, com picos de cerca de 600.000 casos em 1998–2000 e 2004–2006 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; SILVA; OLIVEIRA, 2002). Entre 2007 e 2016, os casos de malária no Brasil também apresentaram redução, mas, após quase 10 anos, a malária apresentou expressivo acréscimo de casos em 2017 (53% em relação a 2016). Em 2018, o país registrou 194.513 casos notificados de malária, uma redução de 1% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2019b).

Nas Américas, atualmente o Brasil é o segundo país que apresenta o maior número de casos de malária (23%), com predominância de infecção por *Plasmodium vivax* (Figura 7) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019a).

Figura 7 – Proporção de casos estimados de malária nas Américas em 2018.

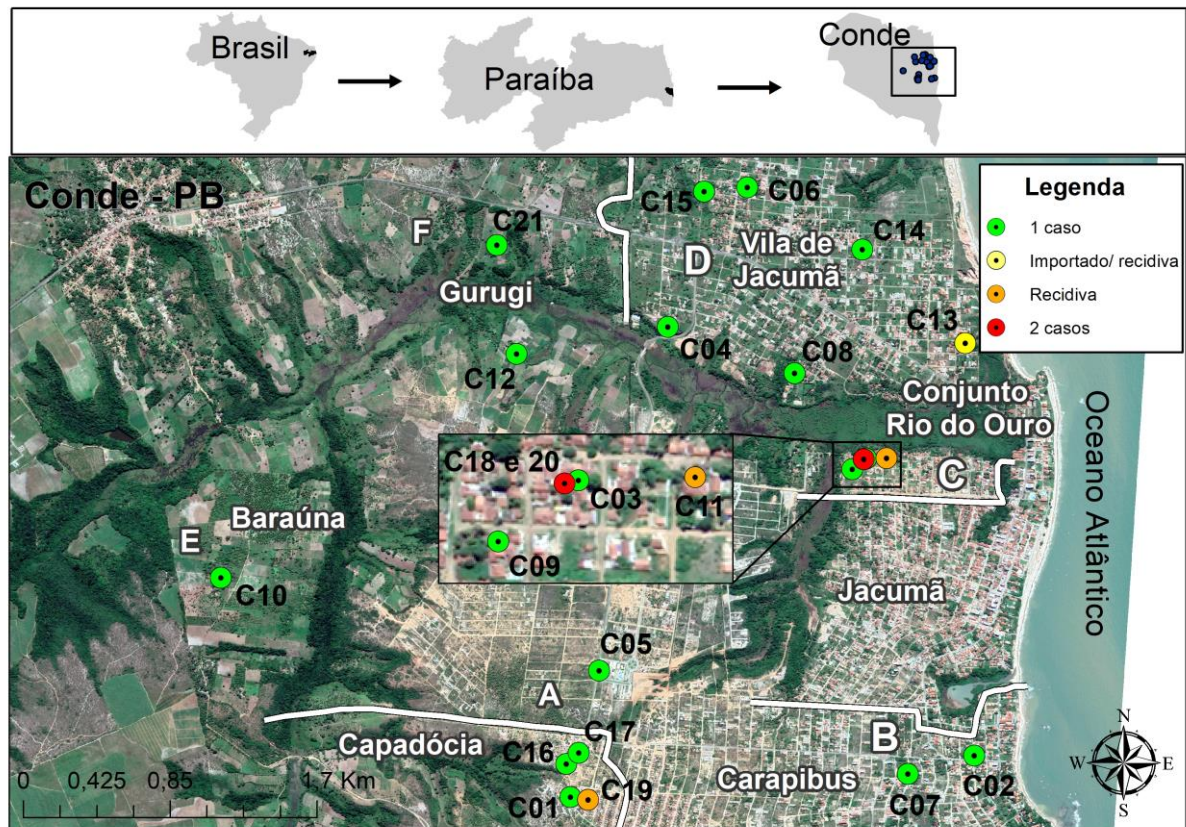


Fonte: adaptado de OMS (2019a).

O país apresenta dois cenários epidemiológicos distintos e é dividido em duas regiões de acordo com sua endemicidade: Região com alta endemicidade, observada na Região Amazônica legal (constituída pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), e a Região Não-Endêmica com hipoendemicidade ou sem endemicidade, na região Extra-amazônica (constituída pelos demais estados do país) (BRASIL, 2019a). A Região Endêmica é responsável pela maioria dos casos da malária ocorridos no Brasil, cerca de 99%, e, atualmente, o Amazonas é o estado que apresenta maior número de casos da doença. Por outro lado, o estado do Maranhão registrou o menor número de casos notificados (BRASIL, 2010). A Região Extra-amazônica, composta pelos outros 17 estados e Distrito Federal, é responsável por apenas 1% do total de casos notificados no Brasil, que ocorrem geralmente em áreas de Mata Atlântica (BRASIL, 2019a). Os estados da região extra-amazônica que mais registram casos autóctones de malária são: Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Paraná. A maioria dos casos notificados nessa região são casos importados de outros estados endêmicos ou outros países, tanto das Américas quanto da África e Ásia (BRASIL, 2020).

Apesar de ser considerada área não endêmica para a doença, o estado da Paraíba notificou, de 1994 a 2018, 175 casos de malária, todos classificados como casos importados. Nenhum óbito por malária foi registrado, nesse período. Em 2019, a Secretaria de Saúde do município do Conde-PB notificou 21 casos autóctones e um caso importado da malária, todos associados à infecção por *P. vivax* (GOMES et al., 2020). O primeiro caso foi notificado em 3 de março de 2019 e o último, notificado em 22 de outubro de 2019. Entre esses 21 casos, foram notificados três como recidivas, incluindo o caso importado. Além disso, dois dos casos foram registrados na mesma residência (Figura 8). A distribuição dos casos por gênero foi praticamente a mesma, com 11 casos em homens e 10 casos em mulheres. A idade dos pacientes variou de 14 a 64 anos, com média de 43,2 anos (GOMES et al., 2020).

Figura 8 - Localização dos casos da malária no município do Conde-PB, durante o surto detectado em 2019.



Fonte: adaptado de Gomes et al. (2020).

Legenda: O mapa destaca os pontos em diferentes bairros do município do Conde onde ocorreram os casos da malária: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Gurugi. Os círculos coloridos referem-se a distribuição dos casos de malária por geolocalização: círculo verde - indica a ocorrência de um caso por residência; círculo amarelo - ocorrência de um caso importado da Venezuela, com recidiva após o tratamento; círculos laranja - três casos que apresentaram recidiva após o tratamento; círculos vermelhos - indica a ocorrência de dois casos por residência.

De acordo com inquéritos entomológicos, que geraram a carta anofélica do estado, 11 espécies de mosquitos *Anopheles* estão em circulação: *An. braziliensis*, *An. noroestensis*, *An. triannulatus* s.l, *An. kompi*, *An. intermedius*, *An. minor*, *An. peryassui*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. bellator* e *An. argyritarsis* (CARLOS et al., 2019). Essas últimas quatro espécies são consideradas vetores em alguns municípios do estado, no entanto não se sabe qual vetor é responsável pelos casos atuais da malária na região.

2.3 Controle da malária

O sucesso dos programas de controle da malária depende da análise de vários fatores. Um dos pré-requisitos críticos no desenvolvimento de estratégias de controle é a caracterização detalhada da epidemiologia da malária em todos os países com transmissão contínua da doença. Além disso, se faz necessário o desenvolvimento de vacinas, como abordagem para prevenir e combater a malária. Apesar de já haver vacinas em fase de testes, atualmente, nenhuma vacina tem demonstrado eficácia suficiente para ser usada nos programas de controle da doença (GRAVES; GELBAND, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008; VAN DEN BERG et al., 2019). Sendo assim, o controle vetorial continua sendo a medida mais eficaz para impedir a transmissão do parasita da malária. O conhecimento sobre a distribuição do vetor, as características genéticas de suas populações bem como o conhecimento básico da biologia e ecologia são essenciais para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de Manejo Integrado de Vetores¹ (MIV) (MAKHAWI et al., 2013; NDO et al., 2010).

Antes da década de 1940, o controle vetorial nos países endêmicos era direcionado unicamente para formas jovens (larvas) dos anofelinos. Com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT (diclorodifeniltricloroetano), o método primário de controle de vetores tornou-se a pulverização de inseticida residual interna (IRS), direcionada a mosquitos adultos (WALKER; LYNCH, 2007). Segundo Raghavendra et al. (2011), o controle de mosquitos adultos é a faceta mais importante do controle vetorial. É frequentemente realizado por aplicação de inseticidas químicos contra a fase adulta dos mosquitos. Outros métodos

¹ O manejo integrado de vetores (MIV) é um processo racional de tomada de decisão para otimizar o uso de recursos para controle de vetores. O objetivo é contribuir para o alcance das metas globais estabelecidas para o controle de doenças transmitidas por vetores, tornando o controle mais eficiente, econômico, ecologicamente correto e sustentável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012d).

disponíveis de controle vetorial incluem o controle biológico, gestão ambiental, controle mecânico e genético (GARI; LINDTJØRN, 2018; WERMELINGER; FERREIRA, 2013). Além dessas, novas abordagens também têm sido testadas com o surgimento de novas tecnologias (CARRASCO-ESCOBAR et al., 2019; HARDY et al., 2017). Com todos esses métodos disponíveis, o MIV, que utiliza de forma racional, integrada e sinérgica os diferentes métodos de controle, apresenta-se como a melhor estratégia de controle de vetores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012d). No entanto, o controle químico, através do uso de LLINs e IRS ainda é o principal método de controle adotado nas regiões endêmicas.

2.3.1 Controle químico

O uso de produtos químicos para controlar insetos, principalmente compostos inorgânicos como mercúrio e arsênico, remonta ao período clássico na Grécia e Roma. Do século XVIII ao século XIX, o extrato vegetal *pyrethrum* e outros compostos foram descobertos como agentes inseticidas (RAGHAVENDRA et al., 2011). O primeiro registro de uso de um inseticida orgânico sintético (o dinitro-*o*-cresol) ocorreu em 1892 e a partir do início do século XX (1920), o controle químico à base de inseticidas (larvicidas e adulticidas) tem sido a principal ferramenta de controle utilizada na maioria dos programas de controle de vetores em todo o mundo (BECKER et al., 2010). Dos inseticidas orgânicos sintéticos, o DDT (1950) foi o primeiro usado com sucesso em programas de controle de vetores (RAGHAVENDRA et al., 2011).

Atualmente, a implementação de redes mosquiteiras tratadas com inseticida (ITNs²), principalmente redes tratadas com inseticidas de longa duração (LLINs³), e pulverização residual interna (IRS⁴) são duas intervenções essenciais contra uma ampla gama de mosquitos vetores, e são consideradas os pilares atuais nos programas de controle do vetor da malária, devido a sua alta efetividade, baixa toxicidade em mamíferos e custo relativamente baixo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019b; RANSON et al., 2011). Segundo a

² Um ITNs é uma rede, tratada com inseticida residual seguro, projetada para bloquear os mosquitos fisicamente, com o objetivo de matar e repelir os mosquitos transmissores da malária (NG' ANG'A; ADUOGO; MUTERO, 2021).

³ Um LLINs é um ITN projetado para permanecer eficaz por vários anos sem reposição de inseticidas (NG' ANG'A; ADUOGO; MUTERO, 2021).

⁴ O IRS é o processo de pulverização do interior das habitações com inseticidas, matando os mosquitos transmissores do patógeno causador da malária. Uma solução diluída de inseticida é pulverizada nas paredes internas de moradias com paredes feitas de materiais porosos, como barro ou madeira para ter efeito residual prolongado (NG' ANG'A; ADUOGO; MUTERO, 2021).

OMS, (2018b), reduções significativas na morbimortalidade da malária desde 2000 se devem principalmente à ampla implementação dessas intervenções.

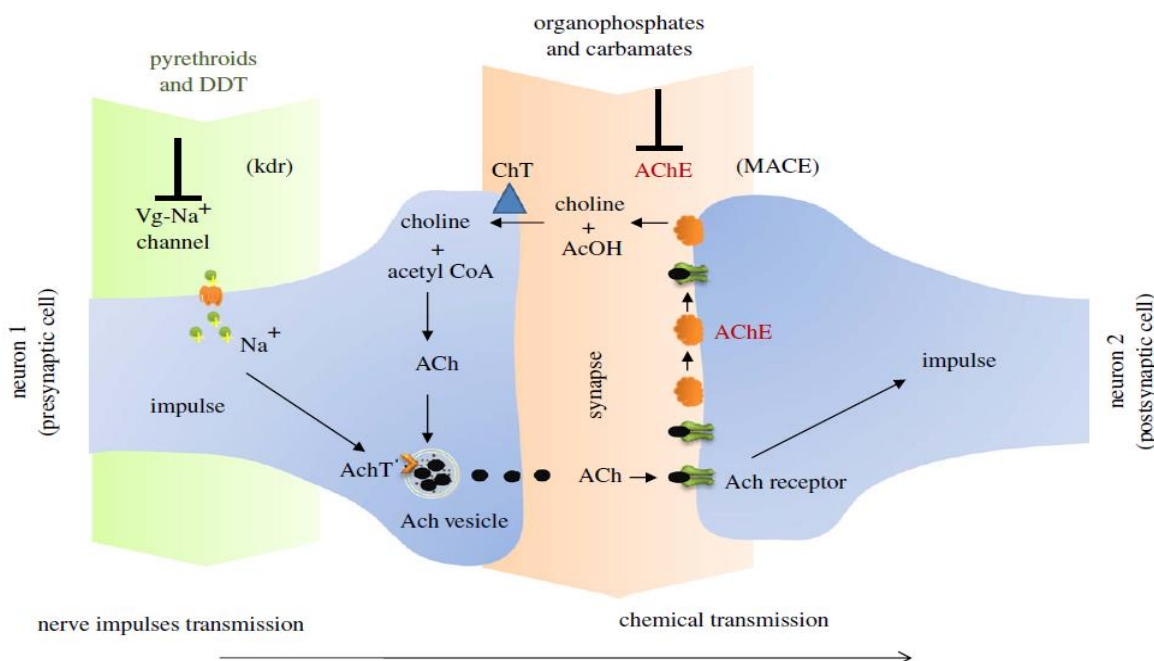
Atualmente, quatro classes de inseticidas sintéticos têm sido recomendadas pela OMS para uso em programas de controle de mosquitos vetores, em LLINs e IRS. Esses inseticidas são classificados de acordo com a sua natureza química e modo de ação: Os organofosforados (OPs), carbamatos (CMs), organoclorados (OCs) e os piretróides (PYRs) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b). Entre estes, os PYRs estão entre os inseticidas mais utilizados, e representam mais de um terço dos inseticidas atualmente comercializados no mundo. Além disso, atualmente são os únicos inseticidas disponíveis para uso em mosquiteiros e as outras classes de inseticidas são aplicadas para IRS (AÏZOUN et al., 2013; MARTIN-REINA et al., 2017). De uma forma geral, os inseticidas químicos das quatro classes citadas acima são neurotóxicos e agem em moléculas do sistema nervoso central do organismo alvo (Figura 9) (MARTIN-REINA et al., 2017). Os OC e os CMs funcionam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela catálise do neurotransmissor acetilcolina em colina. Diz-se que a enzima é carbamilada (ação dos carbamatos) ou fosforilada (ação dos organofosforados), quando ela se liga de forma reversível⁵ ou irreversivelmente à fração fosforosa do inseticida. Essa inibição da acetilcolinesterase resulta no acúmulo de acetilcolina (ACh) nas junções nervosas causando estímulos exacerbados nos músculos voluntários e, finalmente, paralisia seguido de morte (DAS, 2013). Os organoclorados, com exceção dos ciclodienos⁶, e os piretróides atuam no sistema nervoso, ligando-se à proteína do canal de sódio da membrana nervosa. Eles impedem que os canais de sódio se fechem, provocando um fluxo anormal de íons Na^{++} na membrana do neurônio, resultando em transmissão contínua de impulsos nervosos e, eventualmente, paralisia e morte do vetor (BROWN, 2006; MARTIN-REINA et al., 2017).

Segundo a OMS (2012c), todas as quatro classes podem ser usadas para o IRS, mas atualmente apenas piretróides são recomendados para serem usados em LLINs. Com as formulações e preços disponíveis, os piretróides têm melhor desempenho do que outras classes de inseticidas em termos de segurança, durabilidade, eficácia e custo.

⁵ Inibição da AChE pelos carbamatos é reversível (BRAGA; VALLE, 2007).

⁶ Os inseticidas organoclorados do tipo ciclodieno mantêm aberto o canal de sódio inibindo o receptor ácido gama-aminobutírico (GABA) (BROWN, 2006).

Figura 9 - Esquema representando o sítio de ação das quatro classes de inseticidas químicos.



Fonte: David et al. (2013).

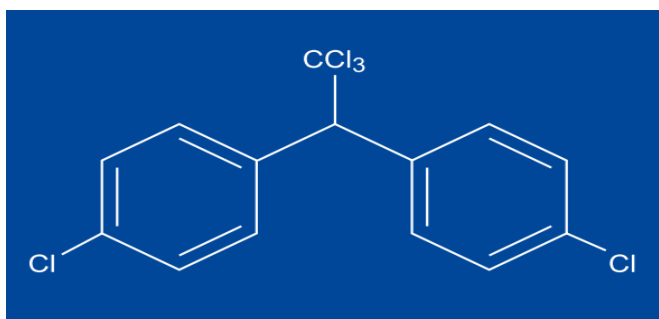
Legenda: Sítios bioquímicos alvo de inseticidas sintéticos. Piretróides e DDT exercem seu efeito tóxico bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem, o que geralmente produz um rápido efeito *knock-down* (kdr). Os inseticidas organofosforados e carbamatos inibem a acetilcolinesterase (AChE), que desempenha um papel importante na terminação dos impulsos nervosos. Sensibilidade reduzida da AChE como resultado de uma mutação genética (MACE) causa resistência a inseticidas das classes de organofosforados e carbamatos. Ach, acetilcolina; AchT, transportador de Ach; ChT, transportador de colina; AcOH, ácido acético; MACE, acetilcolinesterase modificada; Kdr, knock-down resistance; Canal Vg-Na+, canal de sódio dependente de voltagem.

2.3.1.1 Organoclorados

Os OCs são uma classe estruturalmente heterogênea de compostos orgânicos compostos principalmente de carbono, hidrogênio e vários átomos de cloro por molécula (Figura 10) (MREMA et al., 2013). O DDT, um dos principais inseticidas pertencentes a essa classe, foi o mais comumente utilizado, a partir de 1950, por várias décadas na agricultura e na saúde pública, mas desde 1970 seu uso vem sendo banido da maioria dos países. Apesar disso, ainda são usados em alguns países tropicais para controlar vetores da malária por meio de pulverização residual interna (BOUWMAN; VAN DEN BERG; KYLIN, 2011). Os organoclorados são considerados poluentes orgânicos persistentes. Uma vez liberados no ambiente, decompõem-se muito lentamente no ar, na água, no solo e nos organismos vivos, constituindo uma séria ameaça para a saúde pública e ao meio ambiente (MREMA et al., 2013). Por esse motivo, inseticidas como organofosforados, piretróides e carbamatos

tornaram-se alternativas aos OCs porque não apresentam uma persistência exacerbada no ambiente e nas cadeias alimentares (MARTIN-REINA et al., 2017).

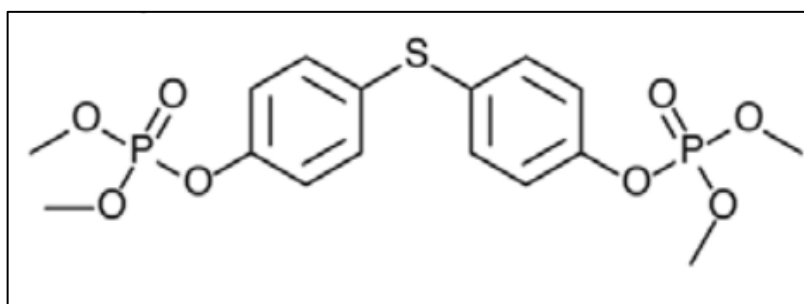
Figura 10 – Estrutura molecular do Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).



Fonte: Adaptado de Walter & Crinnion (2000).

2.3.1.2 Organofosforados

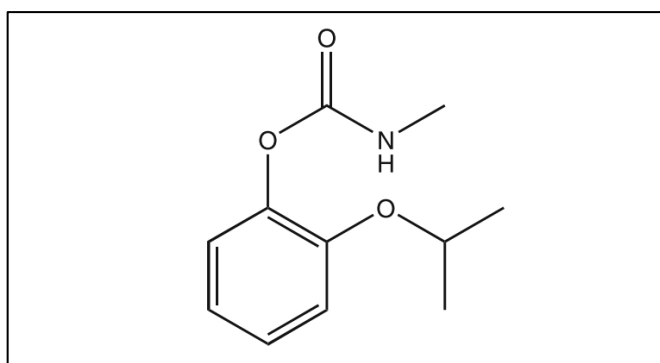
Os OPs são uma grande classe de produtos químicos sintéticos que incluem na sua constituição, essencialmente, ácido fosfórico com combinações variadas de oxigênio, carbono, enxofre ou nitrogênio (Figura 11). Depois dos PYR, os OPs são os inseticidas mais usados no mundo, devido a sua estrutura química, que proporciona rápida hidrólise, pouca acumulação a longo prazo no ambiente e nos tecidos, comparados aos Ocs e CMs (BALALI-MOOD; ABDOLLAHI, 2014). Dado a sua instabilidade química, é obrigatório a renovação periódica da aplicação dos OPs. Além disso, são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas (BRAGA; VALLE, 2007). Estes compostos são classificados com base em cadeias laterais e outros elementos ligados ao átomo de fósforo (GUPTA, 2006). Entre os vários inseticidas pertencentes a essa classe, o temephos é o único composto larvicida recomendado pela OMS para uso em água potável (BRAGA; VALLE, 2007).

Figura 11 – Estrutura molecular do Temephos.

Fonte: adaptado de Montella et al. (2012)

2.3.1.3 Carbamatos

Os CMs são compostos químicos formados a partir de ácido carbônico e amida, amplamente utilizados como inseticidas (LACARIN; REED, 1999). Entre os mais utilizados desta classe, está o propoxur (nome comercial - Baygon) (Figura 12) (BECKER et al., 2010; BRAGA; VALLE, 2007). Assim como os organofosforados, os carbamatos têm ação letal rápida sobre os insetos, apesar de um curto poder residual (dois a três meses de duração). São mais tóxicos para mamíferos em comparação com os organofosforados e apresentam um custo relativamente alto. Geralmente são usados em compostos adulticidas (LACARIN; REED, 1999). Atualmente, embora tenham sido realizadas pesquisas com redes tratadas com carbamato, o WHOPES (*Who Pesticide Evaluation Sheme*) aprovou apenas o uso de dois inseticidas da classe dos carbamatos para redes tratadas com inseticida no controle da malária, o bendiocarb e propoxur. Os carbamatos utilizados em redes tratadas com inseticida, geralmente combinados com piretróides, protegem efetivamente a população suscetível, demonstrando ser importantes no controle dos vetores da malária (SWALE et al., 2013).

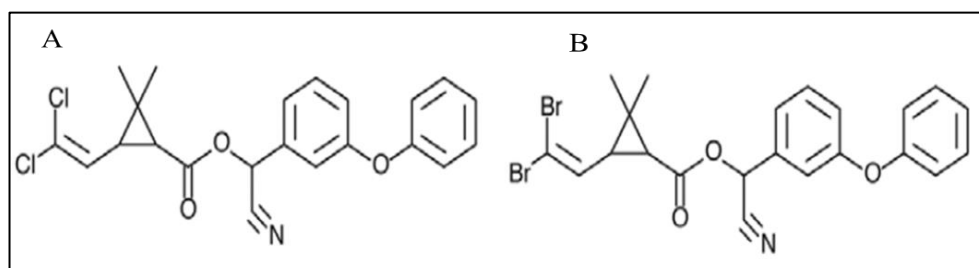
Figura 12 – Estrutura molecular do Propoxur

Fonte: adaptado de Becker et al. (2010).

2.3.1.4 Piretróides

Os piretróides são análogos sintéticos dos ésteres naturais do ácido crisantêmico (piretrinas I) e do ácido pirétrico (piretrinas II), originalmente encontrados nas flores de *Chrysanthemum cinerifolius* (DAVIES et al., 2007). Uma ampla gama de piretróides sintéticos é comumente utilizada no controle de insetos de importância médica e agrícola (DAVIES et al., 2007). Dentre os piretróides usados para controle de vetores a nível global, a permetrina é o composto mais utilizado, seguido de alfa-cipermetrina, cipermetrina, deltametrina e lambda-cialotrina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). A deltametrina e a cipermetrina (Figura 13) são frequentemente usadas nos programas de controle de vetores da malária (BECKER et al., 2010; KAWADA et al., 2011a). Estes compostos apresentam uma relativa baixa toxicidade em mamíferos e possuem alta atividade contra insetos. Além disso, apresentam efeito residual curto (LACARIN; REED, 1999). Atualmente, os piretróides são os inseticidas predominantes no controle de vetores e são utilizados frequentemente em LLINs, para a prevenção prolongada de picadas de mosquito em áreas endêmicas da malária, IRS para controle de mosquitos adultos e sprays de ultra-baixo volume (ULV - Ultra Low Volume) para controle de emergência de vetores da dengue (KAWADA et al., 2011a).

Figura 13 – Estrutura molecular da deltametrina (A) e cipermetrina (B).



Fonte: adaptado de Montella et al. (2012).

2.4 Situação do controle da malária em Cabo Verde

Na região africana, Cabo Verde estava entre os países que tinham como objetivo eliminar a malária até o final de 2020. O país entrou na fase de pré-eliminação desde 2010 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012a), e desde 2014 se encontrava na fase de consolidação da pré-eliminação da malária. Esta situação foi resultado de um forte compromisso político e de um grande esforço de vários profissionais de saúde e parceiros

nacionais e internacionais. Os casos diminuíram progressivamente nas últimas três décadas e, nos últimos três anos (2018-2020), Cabo Verde registrou zero casos autóctones tornando-se elegível para se candidatar à certificação da OMS⁷ para eliminação da malária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

O país vem desenvolvendo esforços com vista a atingir a meta de eliminação estabelecida, nomeadamente através da elaboração e implementação de Planos Estratégicos Nacionais quinquenais, tendo obtido, em 2011, um financiamento junto ao Fundo Global para acelerar a luta contra a malária (CABO VERDE, 2015). As abordagens que vêm sendo usadas para eliminar a doença no país, principalmente na ilha de Santiago, onde historicamente a maioria dos casos da doença é registrado, incluem a detecção ativa de casos, o tratamento com antimaláricos e o controle do mosquito vetor, *An. arabiensis* (SNOW et al., 2012). Todos os casos suspeitos de malária são confirmados por Testes de Diagnóstico Rápido (TDR) (realizado a partir de 2008) e/ou microscopia. Os testes rápidos permitem um diagnóstico imediato e, caso o resultado seja positivo, o exame da lâmina é feito para confirmação. Desde 2013, para todos os casos de malária diagnosticados (simples e graves), os pacientes são sistematicamente hospitalizados para o tratamento completo (CABO VERDE, 2015). Por várias décadas, a cloroquina foi a principal droga usada no tratamento da malária por *P. falciparum* (ALVES et al., 2006). Em 2008, o país adotou o uso dos antimaláricos artemeter-lumefantrina para tratamento e mefloquina como profilaxia para viajantes (SNOW et al., 2012). Posteriormente em 2017, houve a introdução de primaquina injetável (DEPINA et al., 2018a).

O controle do vetor tem sido feito através do uso do larvicida temephos e de IRS (com deltametrina – inseticida da classe dos piretróides) para controle dos mosquitos adultos (SNOW et al., 2012). Para além destes, o gasóleo adulterado e peixes *Gambusia affinis* são também usados no controle vetorial, em criadouros de larvas (CABO VERDE, 2012). O IRS é considerado uma das principais ferramentas de controle da malária a nível global. Em Cabo Verde, o uso de IRS à base de piretróides foi adotado a partir de 1998 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012a). Mais recentemente, após o último surto que ocorreu em 2017, o Ministério da Saúde de Cabo Verde também adotou o uso de LLINs para conter a malária no país (DA CRUZ et al., 2019).

⁷ A certificação de eliminação da malária é o reconhecimento oficial pela OMS do *status* de um país livre da malária.

2.5 Situação do controle da malária no Brasil

A luta contra a malária no Brasil tem perdurado por mais de um século, passando por diferentes planos de ações e estratégias de combate (BRASIL, 2006). A primeira campanha contra a malária no país, aconteceu em 1905, durante a construção do porto de Santos, em São Paulo, resultando na diminuição drástica da doença após a intervenção. As estratégias adotadas nessa campanha foram direcionadas tanto para as formas jovens (eliminação de criadouros de larvas) como também para a forma adulta do mosquito vetor (através da borrifação interna das casas com piretróides). Evidências apontam que *Anopheles cruzi* era o transmissor naquela ocasião (BENCHIMOL; DA SILVA, 2008; GRIFFING et al., 2015).

Em 1930, *An. arabiensis* (na época denominada de *An. gambiae*), proveniente do continente africano através de embarcações, se difundiu pelo Nordeste e provocou uma grave epidemia de malária em 1938. Um ano mais tarde, o Departamento Nacional de Saúde (DNS) e a Fundação Rockefeller desenvolveram um programa de controle que eliminou o *Anopheles gambiae* do território brasileiro em menos de dois anos (BRASIL, 2006; MONTADA DORTA; VASUKI; RAJAVEL, 1993). Este episódio é considerado uma das mais importantes e bem-sucedidas campanhas de controle de vetores no Brasil (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A partir da década de 40, o Ministério da Saúde adotou novas estratégias nos programas de erradicação, seguindo as diretrizes preconizadas pela OMS. O uso de inseticidas químicos de síntese, passou a ser a principal arma nos programas de controle quando se começou a usar o DDT para a pulverização interna das casas (aplicado principalmente na região do Nordeste). Além disso, passou-se a utilizar o antimalárico cloroquina (“sal cloroquinado”) para o tratamento dos casos humanos na região amazônica (TAUIL et al., 1985). Embora a campanha de erradicação tenha conseguido eliminar a malária de extensas áreas do território brasileiro (regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul) nos finais de 1960/início de 1970, ela foi incapaz de conter a rápida disseminação da doença na Região Amazônica. Importante ressaltar que, além da presença do *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, havia em todas as regiões citadas, uma predominância muito maior de outras espécies transmissoras de malária, tais como *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis*, *Anopheles* (*Kertessia*) *cruzi* e *Anopheles* (*Kertessia*) *bellator* (LOIOLA; MANGABEIRA DA SILVA; TAUIL, 2002).

Em 1999, após a suspensão do programa de erradicação da malária (e conseqüente proibição da pulverização interna com DDT, por causa de seus riscos ecotoxicológicos), as

ações para reduzir a malária no Brasil foram conduzidas através do Plano de Intensificação do Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) (BAIA-DA-SILVA et al., 2019). No entanto, apesar dos avanços, vários problemas permaneceram sem resolução e a incidência de malária permaneceu alta. Por causa disso, em 2003, o PIACM também foi substituído pelo Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM) (BRASIL, 2009). Este visava reduzir a morbimortalidade e gravidade da malária, além de interromper a transmissão sempre que possível (BAIA-DA-SILVA et al., 2019).

Atualmente, as ações de controle da malária no Brasil, de forma geral, consistem na adoção do diagnóstico precoce, através de testes de diagnóstico de rotina: microscopia⁸ e TDR (KUDYBA et al., 2019) e no tratamento imediato dos casos da doença, como prática geral do controle. Também tem sido baseado na escolha seletiva de estratégias e métodos específicos de controle vetorial, ajustados às características particulares de transmissão existentes em cada localidade do território nacional (BRASIL, 2006). As medidas de controle vetorial envolvem tanto o controle larvar como o controle de adultos, e várias são as estratégias empregadas: uso de IRS (atualmente várias classes de inseticidas têm sido utilizadas, com ênfase especial em piretróides, etofenprox e lambda-cyhalotrina) e LLINs para controle de adultos, e manejo da fonte larvar (BAIA-DA-SILVA et al., 2019).

Devido ao surto recente da malária no município do Conde – PB, região extra - amazônica, a Secretaria Municipal da Saúde local adotou uma estratégia de controle emergencial na tentativa de conter os casos da doença. As medidas de controle se basearam no diagnóstico imediato e tratamento oportuno dos casos (com uma combinação de cloroquina e primaquina, por 3 e 7 dias, respectivamente), aplicação de medidas anti-vetoriais seletivas, pronta detecção de epidemias para contê-las e reavaliação periódica da situação epidemiológica da malária (PARAÍBA, 2020). Além disso, o controle dos mosquitos adultos, tem sido feito através da aplicação intradomiciliar, por toda a região, do inseticida etofenprox (P.M⁹. a 20%) e pulverização espacial com o inseticida Malathion (C.E¹⁰. a 44%). O uso de inseticidas químicos é realizado de forma emergencial e irregular, apenas em situações de surtos de doenças vetoriais que ocorrem na região (PARAÍBA, 2020).

⁸ Atualmente, o método primário utilizado para o diagnóstico da malária é a microscopia do esfregaço sanguíneo.

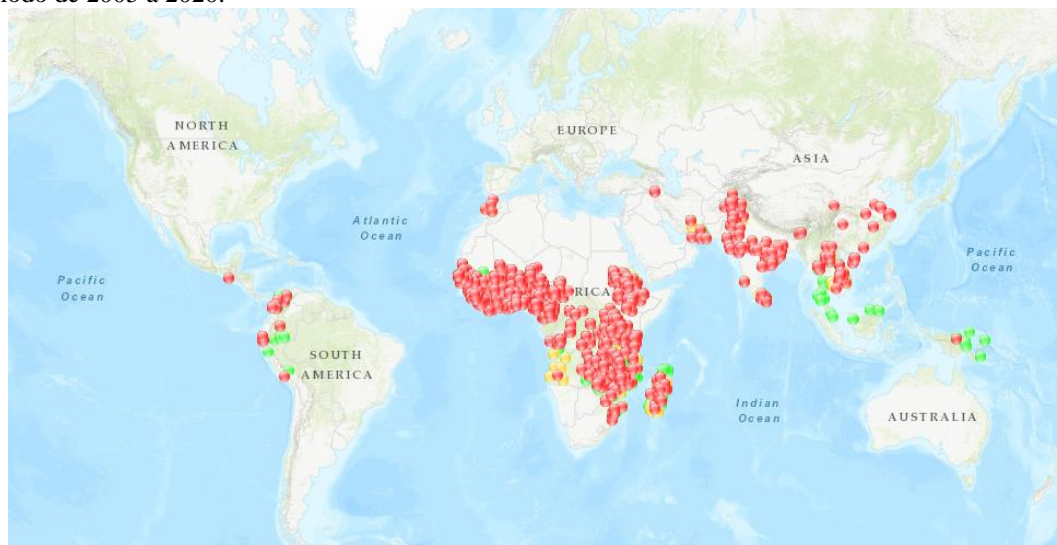
⁹ Pó Molhável

¹⁰ Concentrado Emulsionável

2.6 Resistência aos inseticidas

Atualmente, várias ferramentas têm sido implementadas nos programas de controle da malária. Entre elas, como referido anteriormente, a pulverização residual interna de inseticidas (IRS) e o uso de redes impregnadas com inseticidas de longa duração (LLINs) são as principais utilizadas nos programas de controle. No entanto, o principal problema com essas ferramentas é o desenvolvimento de resistência aos inseticidas, resultante do uso desses compostos, em várias populações de *Anopheles*, principalmente mosquitos do complexo *An. gambiae* (AÏKPON et al., 2014). Segundo o relatório global da OMS sobre resistência a inseticidas em vetores de malária entre 2010 e 2016, a resistência às quatro classes de inseticidas comumente usadas (piretróides, organoclorados, carbamatos e organofosfatos) é amplamente difundida em todos os principais vetores de malária nas regiões da OMS da África, Américas, Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018b). A distribuição e a intensidade desta resistência têm aumentado dramaticamente nos últimos anos (RANSON; LISSENDEN, 2016), e tem sido mais frequentemente registrada no continente africano, ameaçando assim a sustentabilidade de uso de LLINs (Figura 14) (RIVERON et al., 2018). Desde 2010, um total de 68 países relatou resistência a pelo menos uma classe de inseticida, com 57 desses países registrando resistência a duas ou mais classes. Apesar disso, muitos países não realizam monitoramento de rotina adequado para resistência aos inseticidas em vetores locais e os dados de monitoramento geralmente não são relatados em tempo hábil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018b).

Figura 14 – Distribuição global do fenótipo de resistência aos inseticidas químicos em populações de *Anopheles* no período de 2005 a 2020.



Fonte: <http://anopheles.irmapper.com/>. Acessado em 06/02/2020.

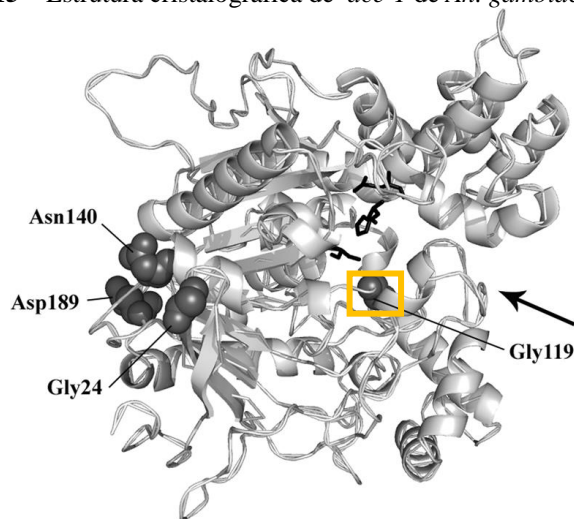
Legenda: bolas vermelhas – resistência aos inseticidas confirmada; bolas amarelas - possível; bolas verdes - população suscetível aos inseticidas.

De acordo com a OMS, o termo resistência se refere à capacidade de sobrevivência dos insetos expostos à uma dose padrão de um determinado inseticida, anteriormente não tolerada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b). Os insetos sobrevivem a essa exposição através de mecanismos que reduzem a suscetibilidade do inseto aos efeitos letais de compostos químicos. Diferentes mecanismos de resistência foram caracterizados até o momento e podem ser agrupados em quatro categorias: a resistência metabólica, a insensibilidade do sítio-alvo, a penetração reduzida e resistência comportamental (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012c). A insensibilidade do sítio-alvo, causada pela alteração do alvo molecular do inseticida, e a resistência metabólica, na qual os mosquitos detoxificam ou eliminam mais rapidamente os inseticidas, são os mecanismos mais amplamente estudados, e são as principais causas de resistência em populações de *Anopheles* (HEMINGWAY; RANSON, 2000; REID; MCKENZIE, 2016). A insensibilidade do sítio-alvo pode ser facilmente monitorada por PCR quando se trata de mutações conhecidas, enquanto a resistência metabólica não é facilmente rastreada devido à sua base molecular complexa, apesar de seu maior impacto operacional no controle da malária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012c).

2.6.1 Mecanismos de insensibilidade do sítio-alvo

A insensibilidade do sítio-alvo é caracterizada por alterações genéticas (mutações pontuais) em moléculas-alvo, tais como a acetilcolinesterase (*ace-1*), alvo molecular dos organofosforados e carbamatos, e o gene que codifica o receptor do canal de sódio dependente de voltagem (VGSC - voltage gate sodium channel ou Na_v), alvo dos piretróides e organoclorados (ex: DDT) (IBRAHIM et al., 2014). A mutação pontual *ace-1* G119S (*ace-1R*) é caracterizada por uma substituição do aminoácido glicina (GGC) por serina (AGC) na posição 119 do exon 3 da sequência codante do gene *ace-1* (AÏZOUN et al., 2013) (Figura 15). Segundo Weill et al. (2004), esta mutação pontual é a única associada à resistência aos organofosforados e carbamatos em populações de *Anopheles* descrita até o momento.

Figura 15 – Estrutura cristalográfica de *ace-1* de *An. gambiae*.

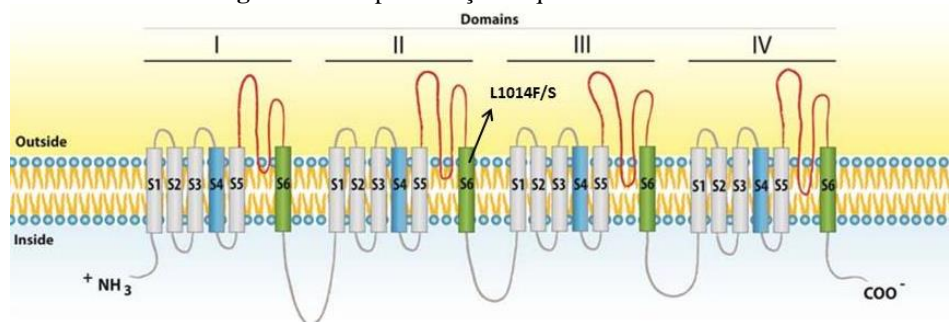


Fonte: adaptado de Djogbénu et al. (2008).

Legenda: destaque em laranja representa a posição 119 envolvida na resistência a inseticidas.

No caso da resistência ao DDT e piretróides, as mutações, frequentemente encontradas em populações africanas de *Anopheles*, ocorrem no sexto segmento transmembranar do domínio II do gene Na_v , conferindo o que é descrito como resistência “knock-down” (mutações do tipo *knock-down*) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b). Essas mutações ocorrem na posição 1014 da proteína codificada pelo gene Na_v e consistem em mutações nucleotídicas que ocasionam a substituição de uma leucina (TTA) por uma fenilalanina (TTT) (L1014F-*knock-down*) ou serina (TCA) (L1014S-*knock-down*) (AWOLOLA et al., 2007) (Figura 16).

Figura 16 - Representação esquemática do canal de sódio.



Fonte: adaptado de Martins & Valle (2012).

Legenda: a figura representa o canal de sódio e seus quatro domínios homólogos (I-IV), cada um composto por seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6). Destaque para as duas mutações pontuais que ocorrem no sexto segmento transmembranar do domínio II do canal de sódio.

A mutação L1014F-*kdr* é encontrada predominantemente na África Ocidental e a mutação L1014S-*kdr* na África Oriental, sendo designadas “*kdr-west*” e “*kdr-east*”, respectivamente (HAKIZIMANA et al., 2016; IBRAHIM et al., 2014; MARTINEZ-TORRES et al., 1998; RANSON et al., 2000). Além dessas mutações, recentemente uma nova mutação que ocorre entre os dois domínios III-IV do VGSC foi descrita em *An. gambiae* e *An. coluzzii*. A mutação consiste na substituição de uma asparagina por uma tirosina na posição 1575 da proteína codificada (N1575Y). Evidências apontam que essa mutação pode potencializar o efeito da mutação L1014F (DJÈGBÈ et al., 2014; EDI et al., 2017; JONES et al., 2012; LYND et al., 2018; YAHOUÉDO et al., 2016).

Nas Américas, estudos de detecção molecular de alelos que conferem resistência a inseticidas em *Anopheles* são escassos, por outro lado, o fenótipo de resistência é amplamente estudado, principalmente em populações de *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária nessa região (GALARDO et al., 2015; RIVERON et al., 2018). Segundo Silva et al. (2015) há fortes evidências de que *An. darlingi* pode ser resistente à deltametrina, devido à baixa mortalidade em bioensaios. No entanto, estudos de resistência molecular de *An. darlingi* na América do Sul foram negligenciados e ainda há muito a ser feito.

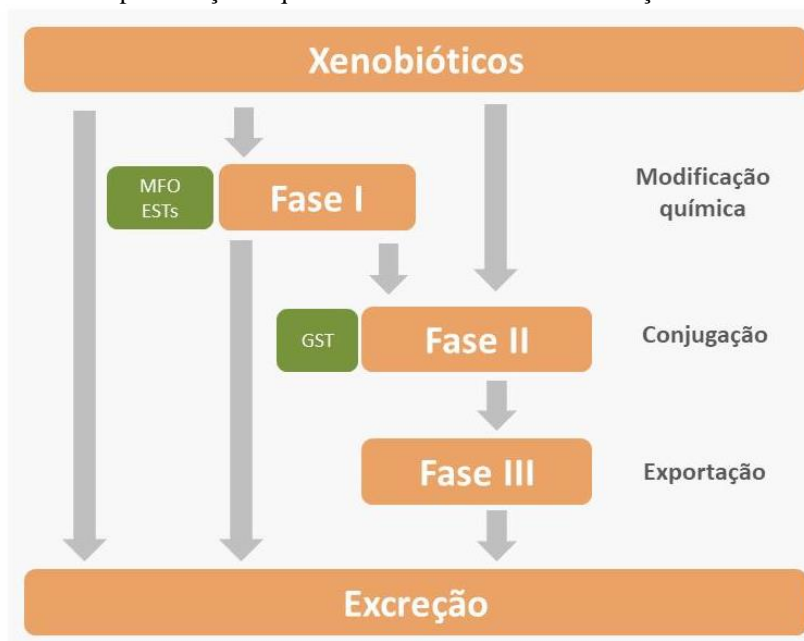
2.6.2 Mecanismos de resistência metabólica

A resistência metabólica é caracterizada pela capacidade aumentada de eliminação dos inseticidas ou xenobióticos através de enzimas específicas que metabolizam ou sequestram esses compostos, antes de atingirem o local de ação desejado e apresentarem efeitos tóxicos nos mosquitos (ALEMAYEHU et al., 2017). Essa resistência geralmente é resultado da super expressão de genes que codificam enzimas capazes de detoxificar inseticidas ou por substituições de aminoácidos nessas enzimas, que alteram a afinidade da enzima pelo inseticida aumentando a sua capacidade de metabolizar as moléculas de inseticidas. O aumento da expressão dos genes que codificam estas enzimas é a causa mais comum de resistência aos inseticidas nos mosquitos (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Três principais superfamílias de enzimas metabolizadoras estão envolvidas no processo de detoxificação de inseticidas: monooxigenases dependentes de citocromo P450 (P450s) ou monooxigenases de função mista (MFOs), Esterases (ESTs) e as Glutathione *S*-transferases (GSTs) (RANSON et al., 2002). As GSTs são as mais conservadas entre as três superfamílias e as mais frequentemente implicadas na resistência a inseticidas em populações de *Anopheles* (WILDING et al., 2009). Apesar disso, de forma geral, as MFOs constituem a principal família de enzimas associadas à resistência à maioria dos inseticidas (DAVID et al., 2013). As esterases estão frequentemente envolvidas com a resistência aos organofosforados, carbamatos e, em menor grau, aos piretróides (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

O processo de detoxificação por essas enzimas acontece em três fases distintas, ocorrendo de maneira totalmente integrada (Figura 17): As fases I e II envolvem a conversão de um xenobiótico lipofílico não polar em um metabólito mais solúvel em água e, portanto, menos tóxico, que pode ser eliminado mais facilmente da célula na fase III (SHEEHAN et al., 2001). A fase I é catalisada, pelas esterases e principalmente pelo citocromo P450, primeiro defensor enzimático contra compostos estranhos. O P450 é responsável por uma série de reações, das quais a oxidação parece ser a mais importante (BRAGA; VALLE, 2007; LISKA, 1998). As enzimas de fase I reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupo polar reativo na molécula, o que dá origem a substrato para as enzimas de Fase II, as GSTs (BRAGA; VALLE, 2007; LOW et al., 2007). Por sua vez, as enzimas da fase II, como as GSTs, catalisam a conjugação (fase II) de xenobióticos previamente ativados a um substrato solúvel em água, como glutathione reduzida (GSH), ácido UDP-glucurônico ou glicina, tornando-os mais hidrofílicas e permitindo sua exportação e excreção para fora da célula por meio de bombas de efluxo (fase III) (SHEEHAN et al., 2001; YU, 2008).

Figura 17 – Representação esquemática das fases de metabolização dos xenobióticos.



Fonte: o autor.

Legenda: MFO, Monooxigenases de função mista; ESTs, esterases; GST, Glutathione S - Transferases

2.6.2.1 Glutathione S-transferases (GSTs)

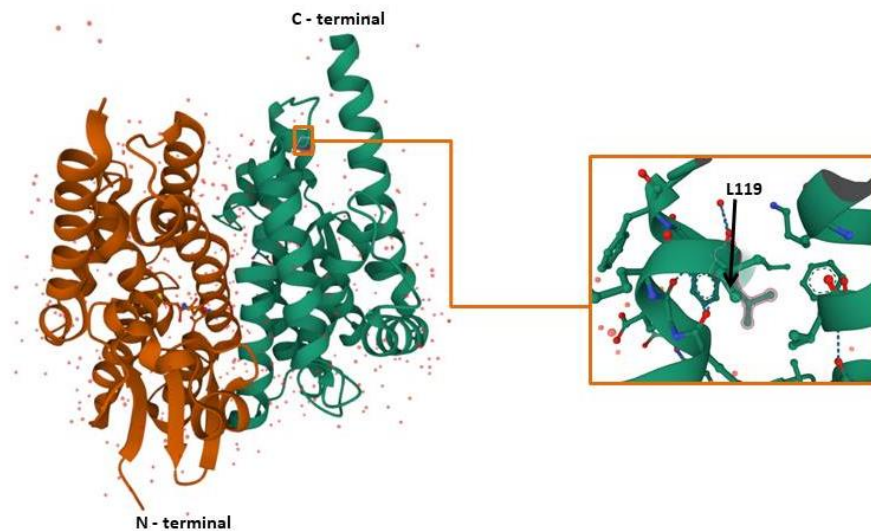
As glutathione S-transferases (GSTs) (EC 2.5.1.18) são uma superfamília de proteínas multifuncionais diméricas com papéis fundamentais na detoxificação celular de uma ampla gama de compostos endógenos e exógenos (xenobióticos) (FROVA, 2006). Essas enzimas catalisam a conjugação do grupo hidrofílico SH da glutathione reduzida (GSH) ao centro eletrofílico de compostos lipofílicos (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Além de catalisar a excreção de substratos (fase II da detoxificação enzimática), elas também desempenham outras funções dentro das células: remoção de espécies reativas de oxigênio (consequência do estresse oxidativo), transporte intracelular, catálise de reações em vias metabólicas não associadas à detoxificação e atuam como moléculas de sinalização (SHEEHAN et al., 2001).

Três subfamílias principais de GSTs são geralmente reconhecidas, classificadas de acordo com a sua localização na célula: GST microsomal, mitocondrial e citosólica (FROVA, 2006). Esta última constitui a grande maioria de GSTs encontrada nas células e tem sido a única associada a mecanismos de resistência aos inseticidas químicos (HEMINGWAY et al., 2004). Da subfamília de GST citosólica, pelo menos seis classes de GSTs de insetos foram descritas em mosquitos, por análise comparativa dos genomas de *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*: Omega, Sigma, Theta, Zeta, Delta e Epsilon (DING et

al., 2003; ORTELLI et al., 2003). Somente membros das classes Delta e Epsilon, que são artrópodes-específicos, têm sido associados à resistência a diferentes classes de inseticidas tais como organofosforados, organoclorados e piretróides (FOURNIER et al., 1992; KOSTAROPOULOS et al., 2001; MARINOTTI et al., 2013; VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001).

A classe epsilon é representada por um conjunto de oito genes (*GSTE1-GSTE8*) dispostos sequencialmente no cromossomo 3R de *An. gambiae*. Essa classe tem estreita associação com resistência ao DDT em populações de *Anopheles* (DING et al., 2003; LUMJUAN et al., 2005; RANSON et al., 2000). Na presença deste inseticida, genes da classe epsilon, se tornam superexpressos em mosquitos resistentes. O *GSTE2* tem sido o único gene associado à resistência metabólica nos mosquitos do gênero *Anopheles* (Figura 18) (LUMJUAN et al., 2005; RANSON et al., 2001; RIVERON et al., 2014). Além da superexpressão gênica, a substituição de aminoácidos na enzima codificada pela *GSTE2* tem sido associada à resistência aos inseticidas nos anofelinos. Por exemplo, Riveron et al. (2014) demonstraram que uma única alteração de aminoácido (L119F) na *GSTE2*, está associada a altos níveis de resistência metabólica ao DDT no vetor da malária *Anopheles funestus*. Essa alteração refere-se à substituição de uma leucina (CTT) por uma fenilalanina (TTT) na posição 119 na proteína codificada. Pontes et al. (2016) demonstraram, em um estudo de dinâmica molecular, que a Ag*GSTE2* F120L está associada à resistência ao DDT em *An. gambiae*. Mitchell et al. (2014) também descreveram uma variante *GSTE2*-I114T que está significativamente associada à resistência ao DDT em fêmeas de *Anopheles gambiae* (na forma molecular M) na África Ocidental.

Figura 18 – Estrutura cristalográfica da enzima *GSTE2* de *Anopheles gambiae*.



Fonte: Adaptado de <https://www.rcsb.org/3d-view/2IMI>

Legenda: a estrutura se refere a uma *GSTE2* selvagem de *Anopheles gambiae*. Em destaque a posição onde corre a mutação (L119F) frequentemente associada à resistência a inseticidas.

2.7 Marcadores genéticos utilizados em estudos da variabilidade genética

Além de vários outros fatores, biológicos, socioeconômicos e ambientais, o sucesso dos programas de controle também pode ser avaliado e analisado através do conhecimento dos padrões genéticos das populações de mosquitos vetores que se pretende controlar. Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados com base na estrutura genética das populações e vários marcadores genéticos têm constituído alvos de estudos (FENG et al., 2017). De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), marcador genético é toda e qualquer característica molecular, oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Até meados do século XX (1960), genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenotípicos, eram os únicos disponíveis para estudo de genética de populações. Com o surgimento das técnicas modernas de biologia molecular, diversos métodos de detecção de polimorfismos genéticos a nível do DNA passaram a ser utilizados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998): Isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso), Microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat* – Repetições de sequências simples), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados), DNA ribossômico (DNAr) e DNA mitocondrial (DNAm).

O DNAm possui genes e regiões gênicas variadas, e muitas dessas regiões já foram e continuam sendo utilizadas para análise de variabilidade genética em populações de mosquitos vetores (culicíneos e anofelinos). Entre essas regiões, destacam-se o Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*), Citocromo Oxidase Subunidade II (*COII*), NADH desidrogenase subunidade 4 (*ND4*) e 5 (*ND5*) (YANG; MA; WU, 2011). Os genes *COI* e *ND5*, são bem documentados em estudos com populações de *Anopheles spp.* (GUTIÉRREZ et al., 2010; MANIN et al., 2018; MAKHAWI et al., 2013; SARMA et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a malária tem sido um problema recorrente de saúde pública. Milhares de casos são registrados, todos os anos, em regiões de alta endemicidade, como é o caso dos estados da Amazônia Legal. Entretanto, num cenário recente, apesar do estado da Paraíba (PB) (região extra-amazônica) não ser endêmica para a malária, o município do Conde-PB registrou um surto da doença em 2019, associado à infecção por *P. vivax*. Historicamente, o município do Conde é conhecido por receber imigrantes refugiados, majoritariamente da Venezuela, país de alta endemicidade para a malária. Além disso, por ser uma área turística, recebe turistas do Brasil, incluindo da Amazônia, e de outros países, o que pode representar, futuramente, riscos de introdução de novas espécies de *Plasmodium* na região. No município, já foram registradas quatro espécies de *Anopheles*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. bellator* e *An. argyritarsis*, potenciais vetores da malária. Até o presente momento, não se sabe qual o vetor responsável pela transmissão recente dos casos da doença. Neste sentido, a identificação das espécies de *Anopheles* que estão circulando atualmente no município, bem como a realização de testes de detecção moleculares da infecção por *Plasmodium* spp. são extremamente necessários. Cabo Verde está na lista da OMS como um dos países que, até 2020, deveriam eliminar a malária. Ao longo dos últimos anos, os casos notificados não ultrapassaram 100 casos/ano. No entanto, em 2017 foram notificados mais de 430 casos da doença em Cabo Verde, considerado o maior número de casos registrados nos últimos 30 anos no país. Apesar disso, nos últimos 3 anos não foram registrados quaisquer casos autóctones no país tornando-se atualmente elegível para a obtenção da certificação da eliminação da malária da OMS. Com a inexistência de vacinas eficazes, o combate à malária depende principalmente do controle de mosquitos vetores, através do uso massivo de inseticidas químicos. No entanto, o uso indiscriminado desses compostos pode levar ao surgimento de resistência a esses xenobióticos. Os programas de controle vetorial em Cabo Verde e do município do Conde - PB são realizados sem nenhum conhecimento prévio sobre a dinâmica populacional de *Anopheles* vetores, bem como sem nenhum monitoramento do impacto das ações dos programas de controle. O conhecimento da estrutura genética da espécie vetora, envolvida no ciclo de transmissão da doença, e a detecção de mecanismos de resistência são requisitos essenciais, pois podem contribuir para prever a propagação de genes de interesse, como genes relacionados à resistência aos inseticidas, bem como verificar outras alterações genéticas nessas populações. Assim, faz-se necessário o estudo da variabilidade genética e a detecção de genes de resistência em *Anopheles* de Cabo Verde e do município do Conde - PB, Brasil,

visto que variações genéticas e mudanças no perfil de susceptibilidade a inseticidas podem variar entre populações e afetar a eficácia dos programas de controle e a epidemiologia da doença nas respectivas regiões de estudo.

4 PERGUNTAS CONDUTORAS

Quais são as espécies de *Anopheles* potencialmente responsáveis pela transmissão da malária nas duas regiões de estudo?

Qual é a taxa de infecção por *Plasmodium* spp. nos anofelinos coletados no município do Conde-PB?

Qual é a frequência de alelos associados à resistência aos inseticidas usados no controle, nas duas regiões estudadas?

Qual é o grau de diversidade genética das espécies de *Anopheles* estudadas nas duas regiões de estudo?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Caracterizar anofelinos de duas regiões de estudo (Praia-CV e Conde-PB) quanto à: presença de vetores da malária, infecção natural por *Plasmodium spp.*, ocorrência de alelos que conferem resistência a inseticidas químicos e variabilidade genética.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar através da taxonomia clássica e molecular espécies de *Anopheles* que ocorrem na Cidade da Praia (Cabo Verde) e no município do Conde-PB (Brasil);
- Investigar a taxa de infecção natural por *Plasmodium spp.* em *Anopheles spp* do município do Conde – PB;
- Identificar mutações nos genes *GSTE2*, *ace-1* e *Na_v*, associadas à resistência aos inseticidas químicos em espécies de *Anopheles* coletadas em ambas as regiões;
- Avaliar a diversidade genética dessas populações de *Anopheles* nas duas regiões de estudo.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Áreas de estudo

Este estudo apresenta uma análise de anofelinos coletados em duas regiões bem distintas, a primeira situada na ilha de Santiago, Cabo Verde, local que já foi considerado como área endêmica, mas que hoje está em vias de certificação de eliminação da malária. Por outro lado, a segunda é uma área livre de malária endêmica, localizada no município do Conde - PB, Brasil, mas que recentemente (2019) apresentou um surto com casos autóctones.

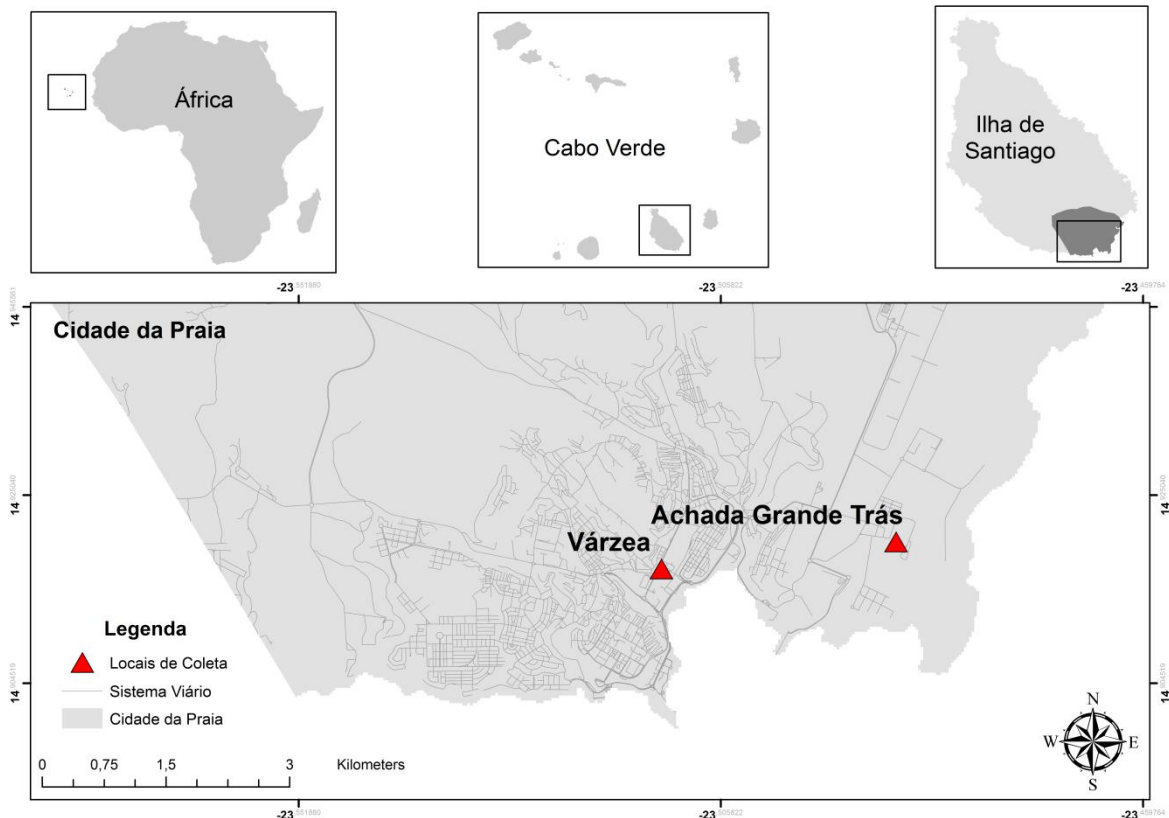
6.1.1 Ilha de Santiago, Cabo Verde

Cabo Verde é um país constituído por um arquipélago de origem vulcânica, situado aproximadamente a 500 km a oeste de Dakar (Senegal) na costa ocidental africana com uma extensão territorial de 4.033 km² (Figura 20). É caracterizado por um clima tropical seco, sem grandes variações de temperatura (média anual de 25 °C) e com escassa pluviometria (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012b). A estação chuvosa, de julho a outubro, é muito irregular e geralmente com poucas chuvas (média de 9 dias e 225 mm por ano) (BARROS, 2011). O arquipélago é constituído por dez ilhas, das quais nove são habitadas. Estas ilhas estão divididas em dois grupos denominados de Barlavento (Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal e Boa Vista) e Sotavento (Maio, Santiago, Fogo e Brava). As ilhas de Barlavento estão situadas ao norte do país e as ilhas do Sotavento ao sul, de acordo com a posição que ocupam em relação ao vento dominante do nordeste (ALBUQUERQUE; SANTOS, 1988; MINISTÉRIO DA SAÚDE DE CABO VERDE, 2009). A população residente no país é de aproximadamente 500.000 habitantes, com 60% do total residente na ilha de Santiago, a maior entre as ilhas (991 km²), onde está situada a capital, a cidade da Praia (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA DE CABO VERDE, 2010, 2013). As principais atividades econômicas da população são a agricultura, a pesca, a extração de sal, (RIBEIRO et al., 1980) e mais recentemente o turismo.

A cidade da Praia (Figura 20) está localizada ao sul da ilha de Santiago (14° 55' N 23° 30') sendo também sede do Concelho de mesmo nome. De acordo com o censo de 2010 realizado pelo INE (Instituto Nacional de Estatística), os dados apontavam que a população residente na cidade era de 132.317 habitantes, sendo 64.968 homens e 67.349 mulheres. A cidade é o principal foco da malária em Cabo Verde, com 90% dos casos autóctones nos

últimos anos (DEPINA et al., 2018a). Geograficamente, a cidade da Praia é descrita como um conjunto de planaltos, também designados como Achadas, e seus respectivos vales circundantes (MONTEIRO et al., 2011). Além disso, a região se caracteriza por ser uma área litorânea e com pouca vegetação nas partes baixas ou intermediárias da cidade, nas quais se localizam os bairros de Achada Grande Trás e Várzea.

Figura 20 - Localização geográfica do arquipélago de Cabo Verde e da cidade da Praia.



Fonte: editado no ArcGis (2020).

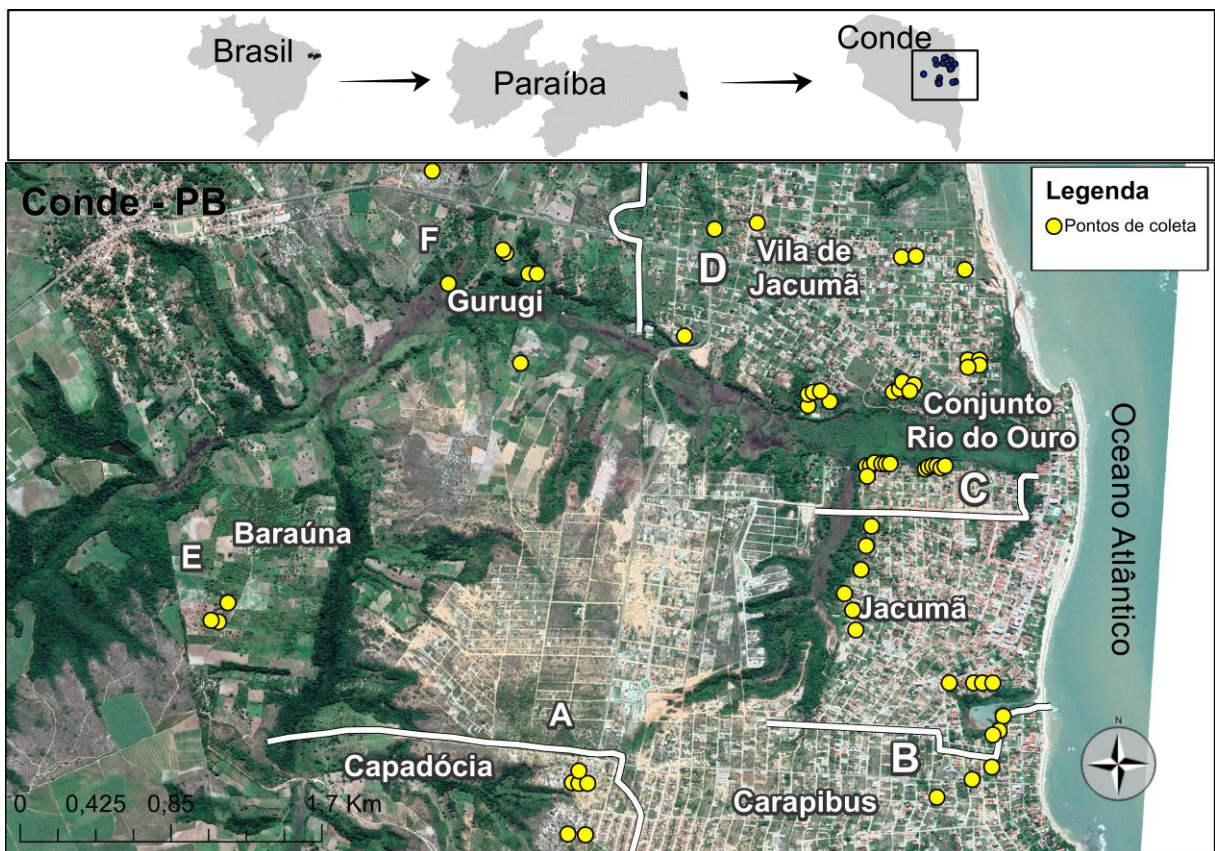
6.1.2 Município do Conde - Paraíba, Brasil

A República Federativa do Brasil situa-se na América do Sul e apresenta uma extensão territorial de 8.514.876 km². Segundo dados mais recentes do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), estima-se que o Brasil tenha 210,1 milhões de habitantes e uma taxa de crescimento populacional de 0,79% ao ano. (IBGE, 2020).

O país é dividido em 5.570 municípios, entre eles o município do Conde (Figura 21). Este está localizado na Região Metropolitana de João Pessoa, no litoral sul do estado da Paraíba. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2018, a

população no município foi estimada em 24.323 habitantes, distribuídos em aproximadamente 173 km² de área. É uma região coberta por Mata Atlântica, muito conhecida pelo seu turismo litorâneo, onde recebe muitos turistas de todo o país, além de estrangeiros (IBGE, 2020). Além disso, a região se caracteriza por possuir um corredor ecológico próximo a manguezais e mata ciliar, ao longo dos rios locais que constituem um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho.

Figura 21 - Localização geográfica do Brasil e do município do Conde, no Estado da Paraíba.



Fonte: editado no ArcGis (2019).

Legenda: O mapa destaca os seis principais bairros do município do Conde onde foram feitas as coletas: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Gurugi.

6.2 Identificação de mosquitos adultos do gênero *Anopheles*

6.2.1 Amostragem e identificação morfológica de mosquitos adultos

Em Cabo Verde, larvas do gênero *Anopheles spp.* foram coletadas, pelo grupo GIDTPiaget (Grupo de Investigação em Doenças Tropicais da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde), em criadouros naturais e artificiais¹¹ de mosquitos usando conchas adaptadas para a coleta de formas jovens (Figura 22), em duas localidades na cidade da Praia: Várzea: N14°55'1.27", W23°30'44.32" e Achada Grande Trás: N14°55'11.85", W23°29'12.22" (Figura 20), em maio de 2017 e outubro de 2017 (uma única coleta foi realizada para cada mês). Achada Grande Trás, situada a leste da cidade da Praia, é um bairro urbanizado e pouco arborizado. Por sua vez, o bairro da Várzea, também urbanizado, está situado a oeste do centro da cidade, a aproximadamente 3 Km de Achada Grande Trás. Ambos os bairros estão localizados a poucos quilômetros da orla marítima.

Após as coletas, as larvas foram transportadas ao laboratório de Entomologia da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde, onde foram mantidas em bandejas plásticas contendo água e ração de peixe *Nutra Fish básica*, rotuladas e separadas por localidade, sob condições padrão (temperatura 25-30 °C, umidade relativa 65-75% e com um ciclo de 12 h de luz/escuro) até a emergência de adultos. Estes foram identificados morfológicamente e separados por sexo, usando a chave de identificação descrita por Ribeiro et al. (1980) para destiguir mosquitos do complexo *Anopheles gambiae* de outros mosquitos do gênero *Anopheles*. Em seguida foram armazenados a -20 °C. Após a identificação morfológica, os mosquitos foram preservados em etanol 70% e transportados para o Departamento de Entomologia da FIOCRUZ-PE (Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco), onde foi feita a extração do DNA.

¹¹ Locais próximo às áreas de vegetação, com acúmulo de água parada.

Figura 22 –Concha adaptada para coleta de formas jovens.

Fonte: o autor.

No município do Conde, mosquitos adultos do gênero *Anopheles* foram coletados em diferentes localidades (Figura 21), entre julho e novembro de 2019, usando diferentes instrumentos: aspirador Elétrico Horst, Shannon, BG-sentinel + gelo seco, capturador de Castro, e CDC luminosa (Figura 23). Cada coleta foi realizada, de forma direcionada, uma vez por mês, por três dias seguidos no peridomicílio, intradomicílio (os pontos foram selecionados de acordo com os endereços de pacientes positivos para malária, disponibilizados pela secretaria da saúde do Conde), extradomicílio e residências próximas às casas de pacientes positivos para malária. As coletas com aspirador foram realizadas num período de maior pico de atividade hematofágica dos anofelinos, com duração de 15 minutos cada aspiração, das 18h às 21h. A BG-sentinel e a CDC luminosa foram utilizadas para a captura num período de aproximadamente 12h (das 18h até 6h do dia seguinte). Por último foram realizadas coletas no peridomicílio usando capturador de Castro. As coletas por esse método foram realizadas das 18h às 20h. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados. Após cada coleta, os mosquitos foram imobilizados com éter e, em seguida, os culicineos separados dos anofelinos. Estes últimos foram armazenados em tubos individuais contendo Sílica gel, para cada ponto, horário e método de coleta.

Figura 23 – Instrumentos utilizados na coleta de mosquitos adultos.



Fonte: o autor.

Legenda: A – Coleta de mosquitos com aspirador Elétrico Horst; B – Coleta com capturador de Castro; C – armadilha CDC luminosa; D – armadilha de Shannon, E – armadilha BG-sentinel + gelo seco.

Os mosquitos, devidamente identificados e acondicionados, foram encaminhados ao laboratório de entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) para sexagem e identificação morfológica de anofelinos por meio de taxonomia clássica, utilizando a chave descrita por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). Após a identificação, cada mosquito foi seccionado, separando a cabeça e tórax (incluindo as patas e as asas) do abdômen com o auxílio de uma pinça e um bisturi esterilizados. Após secção, as amostras foram armazenadas em tubos ependroff a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, antes de serem submetidas ao processo de extração de DNA.

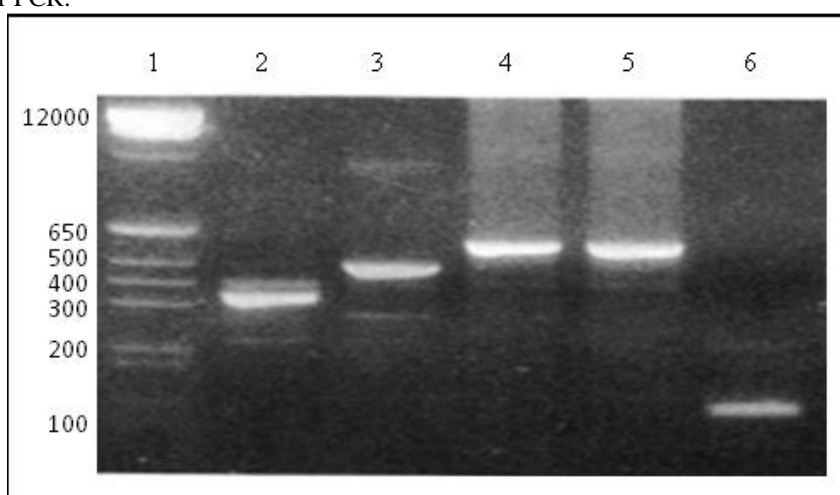
6.2.2 Extração de DNA e identificação molecular de espécies de *Anopheles*

Para os anofelinos coletados em Cabo Verde, o DNA de mosquitos individuais armazenados em álcool 70%, pertencentes ao complexo *An. gambiae*, foi extraído seguindo o protocolo descrito por Ayres et al. (2002). Os mosquitos foram individualmente homogeneizados em 400 μl de tampão de lise (contém Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 0,4 M, e EDTA 2 mM, pH 8,0), 7 μl de proteinase K a 10 mg/ml e 72 μl de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio). O homogenato, foi incubado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 8 horas. Em seguida foram adicionados 420 μl de NaCl 5M à suspensão, a mistura foi homogeneizada por aproximadamente 1 min e centrifugada a 9500 g, por 20 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de 800 μl de isopropanol, após homogeneização em “Vórtex”. Em seguida, a mistura sobrenadante + isopropanol foi incubada ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1h) e centrifugada

(9500 g, 20 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento (“*pellet*”) foi lavado com 500 µl de etanol 70% e ressuspendido em 100 µl de tampão TE (TRIS-EDTA, 10:1 mM). Após serem ressuspendidas, as amostras de DNA foram quantificadas no Nanodrop 2000 (ThermoScientific) e em seguida armazenadas a -20 °C, até sua utilização nas reações de PCRs (Polymerase Chain Reaction – Reação de polimerase em cadeia).

Posteriormente, os produtos da extração foram amplificados através da PCR convencional para identificação molecular das espécies do complexo *gambiae* usando o marcador genético IGS (Intergenic spacers – espaçadores intergênicos) (SCOTT; BROGDON; COLLINS, 1993). A reação se baseia na utilização de quatro *primers*, espécie-específicos, de cadeia antisenso (*reverse*) e um *primer* de cadeia senso (*forward*), idêntica em todas as espécies no complexo, que anela com uma sequência na extremidade 5' do IGS. A PCR foi realizada com os reagentes descritos na tabela 1. O DNA de *Anopheles gambiae* s.s. foi gentilmente cedida por Dra. Maria Helena Silva-Filha do Departamento de Entomologia do IAM/FIOCRUZ-PE, e usado nas reações com o propósito de mostrar um padrão de banda diferenciado no gel, entre as espécies. Os *primers* utilizados na reação estão descritos no quadro 2. Após a reação da PCR, cada produto resultante (4 µl) foi separado por meio de corrida eletroforética, em gel de agarose 1,5%, e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A distinção entre as espécies do complexo *gambiae* foi feita de acordo com o padrão de bandas presente no gel (Figura 24) (SCOTT; BROGDON; COLLINS, 1993).

Figura 24 – Representação dos fragmentos de DNA da região IGS de espécies do complexo *Anopheles gambiae* amplificados por PCR.



Fonte: adaptado de Scott et al. (1993).

Legenda: 1 – Marcador molecular 1Kb plus DNA ladder; 2 – *Anopheles arabiensis* (315 pb); 3 - *Anopheles gambiae* (390 pb); 4 – *Anopheles merus* (466 pb); 5 – *Anopheles melas* (464 pb); 6 – *Anopheles quadriannulatus* (153 pb).

Tabela 1 – Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR para amplificação da região IGS de *Anopheles gambiae* s.l.

Reagentes	Volume de uso (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	----	Até perfazer 25µl
Tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	2,5	2 mM
<i>primer</i> QD	2,5	10 µM
<i>primer</i> UN	1,5	10 µM
<i>primer</i> ME	1,5	10 µM
<i>primer</i> GA	0,7	10 µM
<i>primer</i> AR	0,5	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,25	5 U/µl
DNA molde	2,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

Quadro 2 - *Primers* usados na amplificação da região IGS em espécies do complexo *Anopheles gambiae*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	T _m (°C)	Amplicom (pb)
F UN	GTGTGCCCCCTTCCTCGATGT	58.3	-
R GA	CTGGTTTGGTCGGCACGTTT	59.3	390
R ME	TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA	57.2	464-466
R AR	AAG TGT CCT TCT CAA TCC TA	47.4	315
R QD	CAG ACC AAG ATG GTT AGT AT	42.7	153

Fonte: o autor.

Legendas: UN = *primer* cadeia senso que se anela na mesma posição do DNAr de todas as espécies do complexo *An. gambiae*. GA, ME, AR, QD são *primers* reversos específicos respectivamente para as espécies: *Anopheles gambiae* s.s, *Anopheles merus* e *Anopheles merus*, *Anopheles arabiensis* e *Anopheles quadrianulatus*. T_m = temperatura média de anelamento.

Para os anofelinos coletados no município do Conde, o DNA de cada parte seccionada de mosquitos individuais foi extraído seguindo também o protocolo de precipitação por álcool citado acima. Após lavagem com etanol 70%, o DNA de cabeça/torax e abdômen extraído foi ressuspensionado em 50µl e 30µl de tampão TE (TRIS-EDTA, 10:1 mM) respectivamente. O produto da extração também foi quantificado no Nanodrop 2000 (ThermoScientific). A identificação molecular das espécies de *Anopheles* coletadas, usou apenas a amostra cabeça/tórax de cada mosquito (incluindo as patas e as asas). Sendo assim, foi realizada uma PCR convencional tendo como alvo o gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*), frequentemente usado na taxonomia molecular de espécies de mosquitos. Para a amplificação

dessa região, foram utilizados os primers FW (5'-GGAGGRTTTGGAAAYTGAYTAGTYCC-3') e REV (5'-GCWGAWGTAARTAAAGCTCGWGTATC-3'), gerando um amplicon de aproximadamente 698 pb (PAIVA et al., 2018).

A PCR foi realizada usando o kit GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega, USA), conforme as instruções do fabricante (a mistura da reação está descrita na Tabela 2). A amplificação seguiu a seguinte programação: desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 50 seg, extensão a 72 °C por 1 min, e por fim uma extensão final a 72 °C por 8 min.

Tabela 2 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação por PCR do gene *COI* de *Anopheles spp.* coletados no município do Conde-PB.

Reagentes	Volume de uso (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25µl
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	5,0	5X
dNTP (Promega, USA)	2,0	2 mM
<i>Primer FW</i>	1,0	10 µM
<i>Primer REV</i>	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	2,5	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,2	5 U/µl
DNA molde	1,5	10 ng/µl

Fonte: o autor.

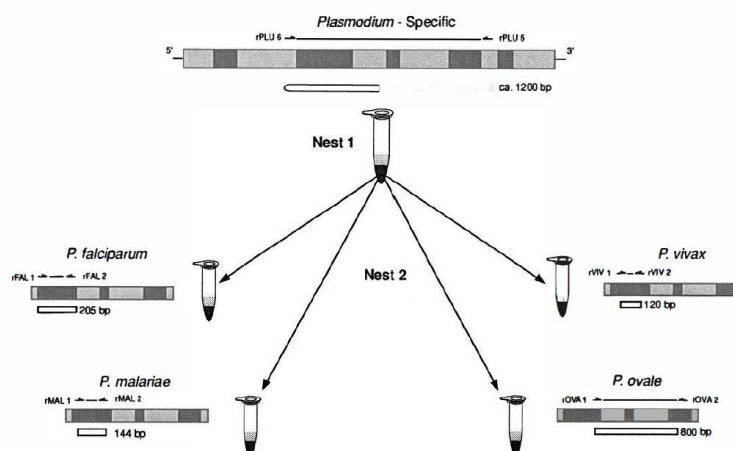
Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X e visualizado em transiluminador UV. Adicionalmente, todos os produtos de PCR foram sequenciados, no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/Fiocruz usando o sistema ABI 3500 xL da Applied Biosystems. As sequências de nucleotídeos produzidas a partir de cada amostra foram comparadas com as sequências depositadas em banco de dados como o Bold Systems (The Barcode of Life Data Systems – <http://www.boldsystems.org>) e o GenBank, usando o nucleotide BLAST (BLASTn) para confirmar a identidade das espécies coletadas. Além disso, uma reconstrução filogenética baseada no método bayesiano foi realizada usando a ferramenta PhyML 3.0 para avaliar a relação evolutiva entre as sequências *COI* das amostras coletadas e as sequências obtidas no banco de dados. A edição da árvore reconstruída foi realizada utilizando a ferramenta ITOL (Interactive Tree of Life – Árvore interativa da vida) para melhor visualização.

6.3 Determinação de infecção natural por *Plasmodium spp.*

A PCR para detecção molecular de espécies de *Plasmodium* foi realizada apenas nas amostras coletadas no município do Conde, diante da impossibilidade do uso das amostras de *Anopheles* coletadas em Cabo Verde (foram feitas apenas coletas de formas jovens). Todas as partes seccionadas dos mosquitos fêmeas coletadas no município foram utilizadas. As PCRs para cada secção (cabeça/tórax e abdômen) foram realizadas separadamente para avaliar a infectividade dos anofelinos analisados.

Para analisar a presença de DNA de espécies de *Plasmodium*, foi utilizada a técnica da Nested - PCR utilizando o método, descrito anteriormente por Snounou et al. (1993). A Nested-PCR se baseia na amplificação do gene que codifica para a subunidade 18s do RNA ribossômico (18s-rRNA) do *Plasmodium*. O gene contém regiões com sequências conservadas entre as diferentes espécies de *Plasmodium*, intercaladas com regiões contendo sequências específicas para cada espécie. A técnica consiste em duas reações de PCR convencional, e cinco pares de *primers* são necessários (Quadro 3): uma primeira reação (Nested-1) gênero específico (capaz de detectar amostras positivas para o *Plasmodium spp*), na qual se usa o par de *primer* rPLU5 e rPLU6 e uma Nested-2 (o template é o produto da Nested-1) na qual são necessários quatro pares de *primers* espécie específicos (rFAL1 + rFAL1 específicos de *P. falciparum*; rVIV1 + rVIV2 específicos de *P. vivax*; rOVA1 + rOVA2 específicos de *P. ovale*; rMAL1 + rMAL2 específicos de *P. malariae*). O tamanho do amplicon esperado na Nested-1 é de 1200 pb. Na Nested-2 os tamanhos dos fragmentos a serem amplificados são: 205 pb para *P. falciparum*, 144 pb para *P. malariae*, 800 pb para *P. ovale* e 120 pb para *P. vivax* (Figura 25).

Figura 25 - Representação esquemática dos produtos de PCR obtidos da região do gene 18s-rRNA a partir de quatro espécies de *Plasmodium* spp.



Fonte: Snounou, (1996).

Legenda: a figura mostra a posição dos pares de *primers* usados em cada reação bem como o tamanho de cada fragmento amplificado a partir de cada gene. As regiões mais escuras no fragmento específico para gênero (18s-rRNA) representam os fragmentos do gene que são específicos para cada espécie de parasita, enquanto as regiões mais claras representam sequências de nucleotídeos que são altamente conservadas entre as espécies.

Quadro 3 - *Primers* usados na amplificação da subunidade 18s do RNA ribossomal (18s-rRNA) de *Plasmodium* spp.

Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
rPLU5	CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC	~1200
rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	
rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	205
rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
rVIV1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	120
rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	
rMAL1	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC	144
rMAL2	AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	
rOVA1	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA	~800
rOVA2	GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG	

Fonte: adaptado de Snounou, (1996).

As PCR foram realizadas com os reagentes descritos na Tabelas 3 e 4. As duas reações (Nested-1 e 2) foram realizadas com uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos que incluem uma desnaturação de 94 °C por 1 min, anelamento 1 min a 58°C e uma extensão de 2 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em transiluminador U.V.

Tabela 3 – Reagentes e concentrações específicas utilizadas na reação de PCR Nested-1.

Reagentes	Volume de uso (μ l)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	----	Até perfazer 25 μ l
Tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	1,0	2 mM
<i>Primer rPLU5</i>	1,0	10 μ M
<i>Primer rPLU6</i>	1,0	10 μ M
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,5	5 U/ μ l
DNA molde	4,0	10 ng/ μ l

Fonte: O autor.

Tabela 4 – Reagentes e concentrações específicas utilizadas na reação de PCR Nested-2.

Reagentes	Volume de uso (μ l)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	----	Até perfazer 25 μ l
Tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	1,0	2 mM
<i>Primer 1</i>	1,0	10 μ M
<i>Primer 2</i>	1,0	10 μ M
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,5	5 U/ μ l
DNA molde	4,0	10 ng/ μ l

Fonte: O autor

Legenda: *Primers 1 e 2* – correspondem a qualquer um dos *primers* espécie-específico, dependendo da espécie de *Plasmodium* que se pretende amplificar.

Dois controles positivos, ou seja, DNA de *P. falciparum* e *P. vivax*, gentilmente cedidos pela Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (IOC-RJ), foram clonados no vetor pGEM-T Easy e três minipreps de cada controle foram produzidos a fim de aumentar a quantidade de DNA disponível para posterior uso como controle positivo nas reações de PCR.

6.4 Detecção de mutações associados a resistência em populações de *Anopheles*

O DNA dos indivíduos coletados em Cabo Verde, identificados como *An. arabiensis*, foi submetido a PCR para amplificar fragmentos de genes específicos associados à resistência aos inseticidas químicos. Os genes investigados foram: canal de sódio (Na_v) (código de acesso: KR867649.1), acetilcolinesterase (*ace-1*) (código de acesso: AGAP001356) e Glutathione S-transferases Epsilon subunidade 2 (*GSTE2*) (código de acesso: AARA008732), a fim de identificar as mutações L1014F/S, G119S e L119F respectivamente, já descritas em estudos prévios.

Dada a indisponibilidade das sequências desses genes em banco de dados para anofelinos encontrados no município do Conde, foi usado um conjunto de *primers* diferentes dos que foram avaliados para a população de *Anopheles* coletado em Cabo Verde, baseado no genoma de *Anopheles darlingi*.

Esses genes e suas respectivas mutações foram escolhidos para análise molecular, por serem os principais genes associados à resistência aos inseticidas químicos em populações de *Anopheles spp.*

6.4.1 Detecção de mutações do tipo *kdr* no gene Na_v

Para a pesquisa das mutações pontuais, L1014F e/ou L1014S no gene Na_v de *Anopheles arabiensis* coletados em Cabo Verde, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 458 pb (Apêndice A), usando o seguinte par de *primers*: Anarabkdr FW (5'-TTTACAATGCCAACGCAATC-3') e Anarabkdr REV (5'-GATCTTGGTCCATGTTAATTTGC-3') (DA CRUZ et al., 2019). A PCR foi realizada de acordo com o método descrito em da Cruz et al. (2019). Os reagentes utilizados na reação se encontram na Tabela 5. A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; e finalmente uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Para a pesquisa dessas mutações pontuais nas populações de *Anopheles* do município do Conde, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 374 pb, usando os *primers* 42F (5'-TCGTGTTTTATG CGGAGAATGG-3') e 422R (5'-CACGGACGCAATTTGACTTGT-3'), desenhados inicialmente para amplificar o fragmento que compreende os exons 20 e 21 e o íntron 20 do canal de sódio de *Anopheles darlingi* (SILVA, 2014). A amplificação foi

realizada utilizando as seguintes condições: 94 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 48°C por 30 seg e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os reagentes utilizados na reação se encontram descritos na Tabela 6.

Os produtos de PCR (4 µl), de amostras coletadas em Cabo Verde e no município do Conde, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em Tris-Borate-EDTA (TBE) com brometo de etídio (5 mg/ml) e visualizado em transiluminador UV. Confirmada a presença de bandas no gel, os produtos de PCR foram enviados para o sequenciamento, a fim de procurar as mutações de interesse.

Tabela 5 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção das mutações L1014S/1014F no gene *Na_v* de *Anopheles arabiensis*.

Reagentes	Volume usado (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25µl
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	2,5	2 mM
Primer Anarabkdr FW	1,0	10 µM
Primer Anarabkdr REV	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,25	5U/µl
DNA molde	2,0	10 ng/µl

Fonte: o autor

Tabela 6 – Reagentes e concentrações específicas para a detecção das mutações L1014S/1014F no gene *Na_v* das diferentes espécies de *Anopheles* coletados no município do Conde.

Reagentes	Volume usado (µl)	Concentração final
Go taq® Color Less Master Mix (Promega, USA)	13,0	1X
H ₂ O livre de nuclease (Promega, USA)	8,75	Até perfazer 25µl
42F	1,0	10 µM
422r	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	0,25	25 mM
DNA molde	1,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

6.4.2 Detecção da mutação G119S no gene *ace-1*

A presença da mutação G119S no fragmento do gene *ace-1*, de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde, foi investigada através do ensaio de PCR-RLFP previamente descrito por Weill

et al. (2004), com algumas modificações feitas por da Cruz et al., (2019). Os *primers* específicos Ex3AGdir (5'-GATCGTGGACACCGTGTTCG-3') e Ex3AGrev (5'-AGGATGGCCCGCTGGAACAG-3') foram utilizadas na reação de PCR (volume final: 25 µl) para amplificar um fragmento de aproximadamente 541 pb, que compreende uma região situada no éxon 3 do gene (Apêndice B). A presença de G119S cria um sítio de restrição *AluI* nesta região dos indivíduos resistentes, o qual é clivado por esta enzima e permite então, a distinção entre os indivíduos susceptíveis e resistentes (WEILL et al., 2004). Os reagentes e as suas respectivas concentrações utilizadas na PCR-RFLP estão descritas na tabela 7. As condições de PCR incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg e 72°C por 30 seg, com uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR (4 µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em transiluminador UV.

Tabela 7 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação G119S no gene *Ace-1* de *Anopheles arabiensis*.

Reagentes	Volume de uso (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25µl
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	2,5	2 mM
<i>Primer</i> ExAGdir	1,0	10 µM
<i>Primer</i> ExAGrev	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,25	5 U/µl
DNA molde	2,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

Após a reação de PCR convencional, a reação de digestão pela enzima de restrição *AluI* (New England Biolab), para detectar a mutação G119S no fragmento do gene *ace-1*, foi realizada como descrito por da Cruz et al (2019). A digestão ocorreu num volume final de 25 µl, a 37 °C por 180 min (clivagem do fragmento) e, por último, incubada a 80 °C durante 20 min (para interromper a atividade enzimática da digestão). Posteriormente, 5 µl dos produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados em transiluminador UV. Os reagentes utilizados na reação estão descritos na Tabela 8. Esta digestão produz dois fragmentos nos indivíduos com o genótipo homocigoto sem a mutação G119S (SS): um de 403 pb e outro de 150 pb. Nos indivíduos com a mutação G119S (RR), a digestão produz um fragmento de 253 pb e outro de 150 pb. Os indivíduos com o genótipo

heterozigoto (RS) mostram uma combinação das três bandas relatadas acima (BAFFOUR-AWUAH et al., 2016).

Tabela 8 - Composição do mix de reação da digestão enzimática para a detecção da mutação G119S no gene *Ace-1*.

Reagentes	Volume de uso (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	16,0	Até perfazer 25µl
Tampão 10X CutSmart™ Buffer (<i>New england biolab</i>)	1,0 (1X)	1X
Enzima <i>AluI</i>	0,5	5U/µl
Produto de PCR	7,5	----

Fonte: o autor.

Para a genotipagem do gene *ace-1* nas populações de *Anopheles* do município do Conde, o par de *primers* Adace1F (5'-GCCGGCCGAAAAGTGGAG-3') e Adace1R (5'-CTTAGAGCAAGGTTCTGATCGA-3') foi utilizado para amplificar um fragmento de aproximadamente 344 pb (LOUREIRO, 2018). A PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os reagentes utilizados na reação estão descritos na Tabela 9. Os produtos de PCR (4 µl) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em Tris-Borate-EDTA (TBE) com brometo de etídio (5 mg/ml) e visualizado em transiluminador UV. Posteriormente, estes produtos de PCR foram sequenciados, a fim de procurar a mutação de interesse.

Tabela 9 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação G119S no gene *ace-1* de espécies de *Anopheles* coletados no município do Conde.

Reagentes	Volume usado (µl)	Concentração final
Go taq® Color Less Master Mix (Promega, USA)	13,0	1X
H ₂ O livre de nuclease (Promega, USA)	8,75	Até perfazer 25µl
Adace1F	1,0	10 µM
Adace1R	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	0,25	25 mM
DNA molde	1,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

6.4.3 Detecção da mutação L119F no gene *GSTE2*

A PCR convencional foi realizada para detectar a mutação L119F no gene *GSTE2*, de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde, de acordo com o protocolo descrito por da Cruz et al (2019). Os *primers forward* (5'- AGTTCGCTGCGAAAATGTCC-3') e *reverse* (5'- CCAAATGCTTCCAAATTTAACTC-3') foram utilizados na reação (volume final: 25 µl) para amplificar um fragmento de 895 pb (Apêndice C) (MAIA, 2013) e a reação seguiu a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão descritas na Tabela 10. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris-Borate-EDTA (TBE) com brometo de etídio (5 mg/ml) e visualizados em transiluminador UV. Posteriormente, os produtos de PCR foram sequenciados, a fim de procurar a mutação de interesse.

Tabela 10 – Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação L119F no gene *GSTE2* de *Anopheles arabiensis*.

Reagentes	Volume de uso (µl)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25µl
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	2,5	5X
dNTP (Promega, USA)	2,5	2 mM
<i>Primer forward</i> <i>GSTE2</i> -Ag	1,0	10 µM
<i>Primer reverse</i> <i>GSTE2</i> -Ag	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	1,0	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,25	5 U/µl
DNA molde	2,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

Para detecção da mutação L119F nas populações de *Anopheles* coletadas no município do Conde, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 717 pb, usando o par de *primers* PFGSTE2 (5'-TGCACACCCTTCACCTTAGC-3') e PRGSTE2 (5'-CGTTGGCCTCCTCGTAGTAC-3'). Esses *primers* foram desenhados usando a ferramenta *Primer 3 Plus*, baseado no gene *GSTE2* de *Anopheles darlingi* disponível no Vectorbase (código de acesso: ADAC008205) (Apêndice D). Os reagentes utilizados na reação estão descritos na tabela 11 e a amplificação foi realizada seguindo as mesmas condições utilizadas para a população de *Anopheles arabiensis* coletada em Cabo Verde, com modificação apenas

na temperatura de anelamento (54 °C). Os produtos de PCR também foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris-Borate-EDTA (TBE) com brometo de etídio (5 mg/ml) e visualizados em transiluminador UV. Posteriormente, estes produtos foram sequenciados.

Tabela 11 - Reagentes e concentrações específicas para a detecção da mutação L119F no gene *GSTE2* de espécies de *Anopheles* coletados no município do Conde.

Reagentes	Volume usado (µl)	Concentração final
Go taq® Color Less Master Mix (Promega, USA)	13,0	1X
H ₂ O livre de nuclease (Promega, USA)	8,75	Até perfazer 25µl
PFGSTE2	1,0	10 µM
PRGSTE2	1,0	10 µM
MgCl ₂ (Promega, USA)	0,25	25 mM
DNA molde	1,0	10 ng/µl

Fonte: o autor.

6.4.4 Sequenciamento de DNA, análise e detecção de mutações

Os fragmentos de DNA, de amostras coletadas nas duas regiões de estudo, amplificados por PCR para avaliação de mutações foram enviados para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) da FIOCRUZ-PE, mediante o sistema automático ABI 3500xl (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados no sequenciamento foram lidos no Programa CodonCode Aligner (versão 4.7) no qual foi feita uma avaliação da qualidade das sequências, edição e montagem dos contigs (sequências com qualidade ≥ 20 foram utilizadas para gerar as sequências consenso com base no critério de PHRED). O alinhamento das sequências e identificação das mutações foi feito no programa BioEdit usando o algoritmo Clustal W (versão 7.2.6) (HALL, 1999).

6.5 Estudo da diversidade genética de populações de *Anopheles*

Para esta análise, dois genes mitocondriais frequentemente usados em estudos evolutivos, citocromo C oxidase subunidade I (*COI*) e NADH desidrogenase subunidade 5 (*ND5*) foram amplificados por PCR a partir do DNA de amostras de mosquitos de *Anopheles*,

referente às coletas no item 6.2.1.1 representativo da ilha de Santiago e do município do Conde.

Foram utilizados um *primers*, Forward (5'-GGAGGRTTTGGAAAYTGAYTAGTYCC-3') e Reverse (5'-GCWGAWGTAARTAAAGCTCGWGTATC-3') para amplificar um fragmento de aproximadamente 698 pb do gene *COI* das espécies de *Anopheles* de Cabo Verde e município do Conde (PAIVA et al., 2018). O par de *primers* DMP3A (5'-AGGATGAGATGGCTTAGGTT-3') e 19CL (5'-CTTCCA CCAATTACTGCTATAACAG-3') foi utilizado para amplificar um fragmento de aproximadamente 969 pb do gene *ND5* em anofelinos coletados em Cabo Verde (ABOUD et al., 2014).

Para as espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde, um fragmento de aproximadamente 417pb do gene *ND5* foi amplificado usando o par de *primers* degenerados PFND5DEG (5'-GCY CCH ACN CCD GTD TCH GC-3') e PRND5DEG (5'- GCY AAR AAA GGY ATN CCA CAT AAR GC-3'). Esses *primers* foram desenhados¹² usando a ferramenta Primer 3 Plus, baseado no alinhamento de sequências *ND5* das diferentes espécies de *Anopheles* encontradas no município do Conde-PB.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit Go Taq® Colorless Master mix, conforme as instruções do fabricante (Promega). As concentrações dos reagentes utilizados para amplificar os genes *COI* e *ND5* das espécies de *Anopheles* coletadas tanto em Cabo Verde como no município do Conde estão descritas nas tabelas 12, 13 e 14. A PCR que tem como alvo o gene *COI* de anofelinos de Cabo Verde e município do Conde foi realizado nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, anelamento a 58°C 50 seg, extensão inicial a 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 8 min. A PCR que visa amplificar o gene *ND5* de anofelinos de Cabo Verde foi realizado nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, anelamento a 62°C por 1 min, extensão inicial a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Por sua vez, a PCR que visa amplificar o *ND5* das espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde foi realizada usando as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação inicial a 94 °C por 30s, anelamento a 45 °C 30s, extensão inicial a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 5 min. Para

¹² Esses *primers* foram desenhados pelo fato do gene *ND5* das espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde não apresentarem regiões suficientemente conservadas quando alinhadas com *Anopheles arabiensis*.

amplificação do gene *COI* de anofelinos coletados no município do Conde, foi usado as mesmas condições de PCR descritas no item 6.2.1.2.

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X e visualizado em transiluminador UV. Em seguida, os produtos foram sequenciados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) da FIOCRUZ-PE mediante o equipamento ABI 3500xl da Applied Biosystems, utilizando o método de Sanger.

Tabela 12 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação do gene *COI* de *Anopheles* spp. coletados na ilha de Santiago e no município do Conde-PBA.

Reagentes	Volume de uso (μ l)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25 μ l
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	5,0	5X
dNTP (Promega, USA)	2,0	2 mM
Primer FW - COI	1,0	10 μ M
Primer REV - COI	1,0	10 μ M
MgCl ₂ (Promega, USA)	2,5	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,2	5 U/ μ l
DNA molde	1,5	10 ng/ μ l

Fonte: o autor.

Tabela 13 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação do gene *ND5* de *Anopheles* spp. coletados na ilha de Santiago.

Reagentes	Volume de uso (μ l)	Concentração final
H ₂ O mili-Q autoclavada	-----	Até perfazer 25 μ l
tampão Green GoTaq® (Promega, USA)	5,0	5X
dNTP (Promega, USA)	2,0	2 mM
DMP3A	1,0	10 μ M
19 CL	1,0	10 μ M
MgCl ₂ (Promega, USA)	2,5	25 mM
TaqDNA polimerase (Promega, USA)	0,2	5 U/ μ l
DNA molde	1,5	10 ng/ μ l

Fonte: o autor.

Tabela 14 - Reagentes e concentrações específicas para amplificação do gene ND5 de *Anopheles spp.* coletados no município do Conde-PB.

Reagentes	Volume usado (μ l)	Concentração final
Go taq® Color Less Master Mix (Promega, USA)	13,0	1X
H ₂ O livre de nuclease (Promega, USA)	8,75	Até perfazer 25 μ l
PFND5DEG	1,0	10 μ M
PRND5DEG	1,0	10 μ M
MgCl ₂ (Promega, USA)	0,25	25 mM
DNA molde	1,0	10 ng/ μ l

Fonte: o autor.

6.5.1 Análise estatística das informações genéticas

Foram realizados dois grupos de análises: uma análise local da variabilidade genética dos genes *COI* e *ND5* das populações de *Anopheles* coletadas em Cabo Verde e no município do Conde; uma análise global comparando as sequências dos genes *COI* e *ND5* das populações de *Anopheles* coletadas em Cabo Verde com um conjunto de dados de outros países obtidos a partir do GenBank para verificar a relação genética entre eles.

Eletroferogramas gerados no sequenciamento dos genes supracitados foram editados (edição e montagem de contigs) no programa CodonCode Aligner v. 4.7 e um alinhamento múltiplo foi gerado no Bioedit usando o algoritmo Clustal W (número de Bootstrap:1000) (HALL, 1999). A diversidade genética das populações de *Anopheles* usadas neste estudo foi estimada usando o software DNASP versão 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e os seguintes parâmetros foram calculados: número de sítios polimórficos (S), diversidade de haplótipos (hd) e diversidade nucleotídica (π). Além disso, testes de neutralidade (Teste D de Tajima e Fu & Li) foram realizados para testar a hipótese da evolução nula (FU & LI, 1993; TAJIMA, 1989).

A fim de determinar as relações evolutivas dos anofelinos para cada região de estudo, inferências filogenéticas, a partir da frequência de haplótipos, foram realizadas baseado no método de Máxima verossimilhança, usando PhyML v.3.0 (GUINDON et al., 2010). As árvores geradas foram visualizadas e editadas usando a ferramenta iTOL v.4 (LETUNIC; BORK, 2019). Para verificar a frequência e a relação entre os diferentes haplótipos das populações de *Anopheles* estudadas, em ambos os genes, o software Population Analysis with

Reticulate Tree (PopArt v.1.7) foi usado para construir diferentes redes de haplótipos utilizando o método de Median Joining Network (BANDLET; FORSTER; ROHL, 1999). Por último, a diferenciação genética e fluxo gênico entre os locais de coleta das populações de *Anopheles*, para ambos os genes, foram estimados a partir do índice de fixação par-a-par (F_{ST}) e número de migrantes (Nm) respectivamente, usando o software Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para testar a significância do F_{ST} , 1023 permutações foram realizadas e os P -values gerados. A significância foi definida em $P < 0,05$. Valores de F_{ST} entre 0,00-0,05 indicam pouca diferenciação genética, 0,05-0,15 diferenciação moderada, 0,15-0,25 alta diferenciação e acima de 0,25 um grau muito alto de diferenciação genética (BRAGINETS et al., 2003; KADDUMUKASA et al., 2020; PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; SLATKIN, 1985). Esse mesmo programa foi usado para verificar a correlação entre a distância genética e distância geográfica entre as populações de *Anopheles arabiensis* analisadas neste estudo, por meio do teste de Mantel baseado em 1000 permutações (MANTEL, 1967).

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Em relação à amostragem realizada em Cabo Verde, o trabalho não envolveu aspectos éticos com procedimentos envolvendo seres humanos ou animais de laboratório. Portanto, não se fez necessário obter o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de ética no uso de Animais (CEUA). Quanto às coletas realizadas no município do Conde-PB, foram usadas amostras cedidas pelo projeto “**Investigações dos casos de malária registrados no município do Conde, estado da Paraíba, em 2019, com base em inquérito epidemiológico, clínico, laboratorial e entomológico**” (número de parecer: 3.494.568), aprovado pelo CEP/IAM (anexo), uma vez que parte da amostragem foi realizada no interior dos imóveis.

8 RESULTADOS

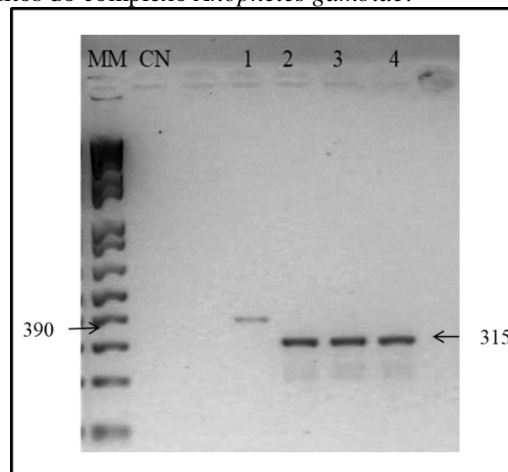
8.1 Identificação morfológica e molecular de anofelinos coletados nas duas regiões de estudo

8.1.2 Ilha de Santiago

Um total de 549 mosquitos do gênero *Anopheles*, em 2017, em dois bairros da cidade da Praia, ilha de Santiago (Achada Grande Trás – 326; Várzea - 223) foram morfológicamente identificados como pertencentes ao complexo *An. gambiae*.

Do total de indivíduos identificados por taxonomia clássica, 241 exemplares foram utilizados para a identificação molecular de espécies do complexo *Anopheles gambiae*. A amplificação da região IGS ocorreu em 235 amostras de DNA obtidos e *An. arabiensis* foi a única espécie do complexo presente nos indivíduos coletados, como mostra a figura 26. De forma aleatória, 10 amostras de produto de PCR foram sequenciadas e posteriormente a identidade das espécies foi confirmada através de BLASTn no NCBI.

Figura 26 – Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados a partir da PCR da região IGS utilizado para taxonomia molecular de mosquitos do complexo *Anopheles gambiae*.



Fonte: o autor.

Legenda: MM - Marcador molecular 1Kb plus DNA ladder; CN – controle negativo da reação; 1 – *Anopheles gambiae* s.s usado como controle positivo da reação (390 pb); 2 a 4 – *Anopheles arabiensis* (315pb).

8.1.3 Município do Conde – PB

Durante o período de estudo na Paraíba, 73 pontos de coleta foram investigados, distribuídos pelas localidades do município do Conde. Destes pontos, em 16 foram encontrados anofelinos (21,9%) (Figura 27), nos quais um total de 323 mosquitos do gênero *Anopheles* foram coletados. Em colaboração com um taxonomista, inicialmente, foi feita a taxonomia clássica de apenas cinco indivíduos. Mas, devido à forma de coleta, várias características morfológicas foram perdidas. Assim, a identificação foi realizada através da amplificação e sequenciamento de um fragmento específico do gene *COI*.

O DNA de 318 amostras¹³ foi sequenciado para identificação molecular das espécies. Destes, 303 sequências tiveram qualidade satisfatória para análise. Portanto, 303 espécimes foram identificados, comparando as sequências de *COI* das amostras coletadas com sequências de *COI* disponíveis nos bancos de dados do NCBI e Bold System, dos quais nove espécies foram identificadas: *An. aquasalis* (135), *An. albitarsis* s.l (30), *An. argyritarsis* (18), *An. minor* (62), *An. triannulatus* (32), *An. peryassui* (15), *An. oswaldoi* (5), *An. braziliensis* (3) e *An. sawyeri* (3). As três primeiras espécies são consideradas potenciais transmissores do parasita causador da malária no estado da Paraíba. As 20 sequências que não tiveram a espécie identificada por meio de análise molecular foram identificadas como *Anopheles spp.* (Tabela 15). As espécies mais abundantes encontradas neste estudo foram *An. aquasalis* (41,79%) e *An. minor* (19,20%), correspondendo a 60,99% dos anofelinos coletados. A identidade de todas as espécies identificadas molecularmente foi confirmada através da reconstrução filogenética altamente robusta, utilizando a inferência bayesiana (Figura 28). Do total de anofelinos coletados¹⁴, 156 foram coletados no extradomicílio, 13 no intradomicílio e 154 no peridomicílio (Tabela 16). Das armadilhas utilizadas para a captura, a CDC luminosa foi a que coletou maior número de anofelinos (132), seguido da BG sentinel + gelo seco (81). Por outro lado, a coleta por Shannon (1) e BG sem gelo seco (2) não se mostraram eficientes neste estudo.

¹³ Não foi possível a obtenção do DNA dos cinco anofelinos, inicialmente identificados morfológicamente, portanto foram identificados provisoriamente como *Anopheles spp.*

¹⁴ Inclui 5 *Anopheles spp.* os quais não foi possível extrair o DNA para análises moleculares, 20 *Anopheles spp.* cujas sequências não tiveram qualidade satisfatória para identificação molecular e os restantes 303 espécimes identificados.

Figura 27 – Pontos de coleta de mosquitos do gênero *Anopheles* no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.



Fonte: editado no ArcGis (2019).

Legenda: Os pentágonos indicam a distribuição de 73 pontos investigados para coleta de mosquitos do gênero *Anopheles*: pentágonos brancos - locais investigados onde anofelinos não foram encontrados; pentágonos amarelos - locais investigados positivos para anofelinos. Letras maiúsculas de A a F - seis principais bairros onde os mosquitos foram coletados e estão descritos na legenda da figura 21.

Tabela 15 – Número de espécies de *Anopheles* coletadas através de diferentes instrumentos no município do Conde de julho a novembro de 2019.

Espécies de <i>Anopheles</i>	Instrumentos de coleta						Total
	Aspirador	BG + gelo seco	BG sem gelo seco	C. de castro	CDC luminosa	Shanon	
<i>An. albitarsis</i> s.l	14	8	0	4	4	0	30
<i>An. minor</i>	18	7	0	36	1	0	62
<i>An. aquasalis</i>	2	43	2	1	86	1	135
<i>An. oswaldoi</i>	0	0	0	3	2	0	5
<i>An. triannulatus</i>	0	4	0	2	26	0	32
<i>An. argyritarsis</i>	3	8	0	2	5	0	18
<i>An. peryassui</i>	2	0	0	13	0	0	15
<i>An. braziliensis</i>	0	0	0	1	2	0	3
<i>An. sawyeri</i>	0	0	0	1	2	0	3
<i>Anopheles spp*</i> .	0	11	0	5	4	0	20
Total	39	81	2	68	132	1	323

Fonte: o autor.

* - sem identificação molecular.

Tabela 16 – Número de espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde por ambiente de coleta no período de julho a novembro de 2019.

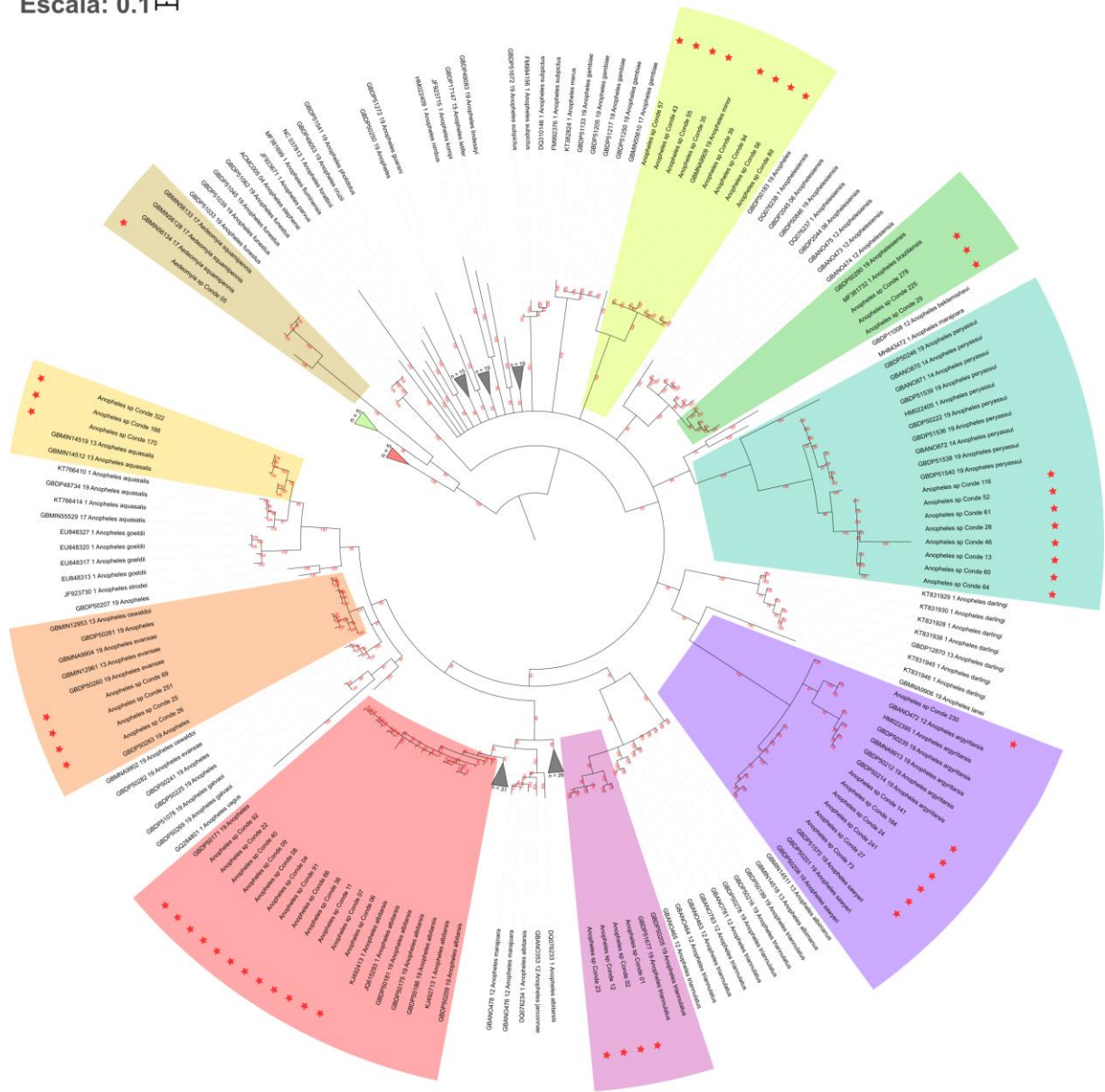
Espécies de <i>Anopheles</i>	Ambiente de coleta			Total
	Intradomicílio	Peridomicílio	Extradomicílio	
<i>An. albitarsis</i> s.l	7	22	1	30
<i>An. minor</i>	4	58	0	62
<i>An. aquasalis</i>	1	29	105	135
<i>An. oswaldoi</i>	0	3	2	5
<i>An. triannulatus</i>	0	9	23	32
<i>An. argyritarsis</i>	0	10	8	18
<i>An. peryassui</i>	1	14	0	15
<i>An. braziliensis</i>	0	1	2	3
<i>An. sawyeri</i>	0	3	0	3
<i>Anopheles spp*</i>	0	5	15	20
Total	13	154	156	323

Fonte: o autor.

* - sem identificação molecular

Figura 28 – Árvore filogenética do fragmento do gene *COI* de anofelinos coletados no município do Conde, de julho a novembro de 2019.

Escala: 0.1



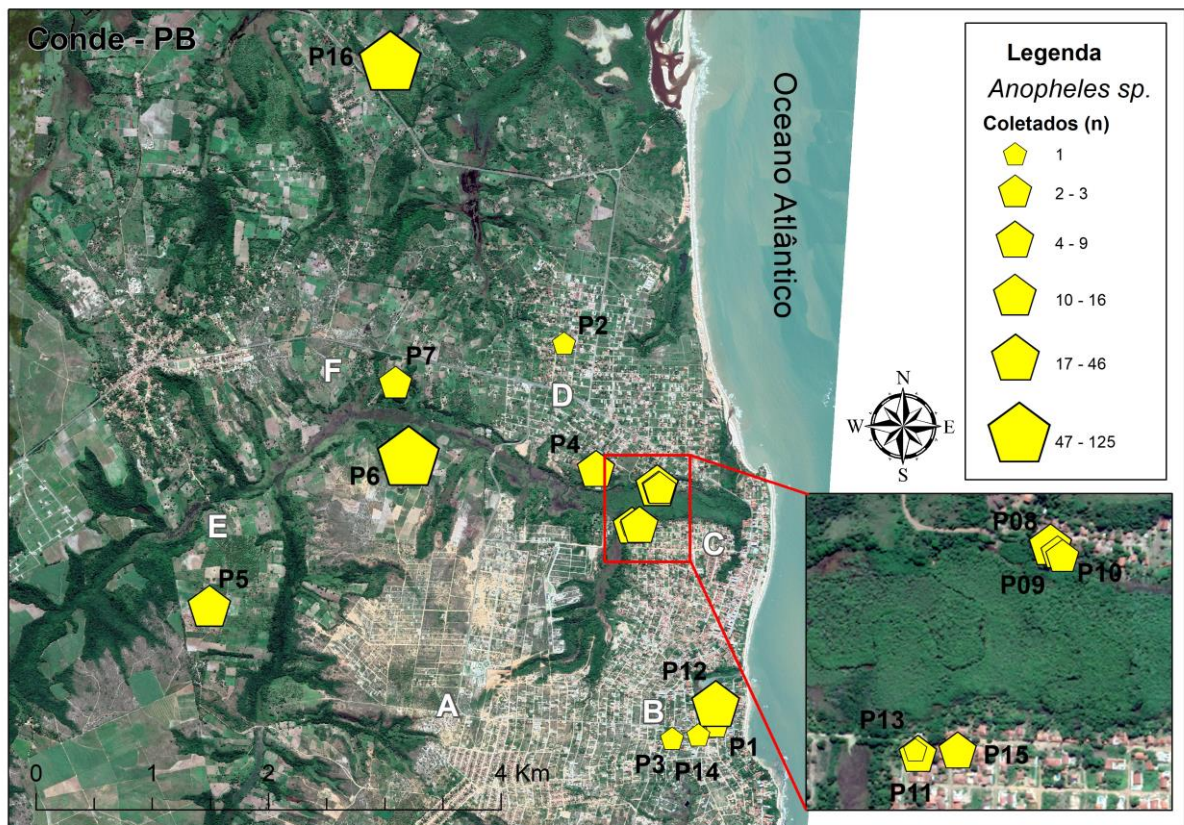
Clados

<i>Ad. squamipennis</i>	<i>An. peryassui</i>	<i>An. triannulatus</i>	<i>An. oswaldoi</i> <i>An. evansae</i>
<i>An. minor</i>	<i>An. argyritarsis</i>	<i>An. albitarsis</i>	<i>An. aquasalis</i>
<i>An. braziliensis</i>	<i>An. sawyeri</i>		

Fonte: o autor.
 Legenda: *Ad.*, *Aedomya*. Triângulos representam clados colapsados: vermelho representa espécies do gênero *Culex*, cor verde do gênero *Aedes* e cinza do gênero *Anopheles*. As estrelas representam as espécies coletadas no município do Conde. Valores de suporte de ramo refletem valores de probabilidade posterior. A escala representa a distância evolutiva entre as espécies. Árvore disponível online: <https://itol.embl.de/tree/200133261452041582127131>. A árvore foi construída usando o método de bayesiana, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi GTR+G+I.

Dos 16 pontos de coletas positivos para anofelinos, os pontos P6 e P16 foram os que registraram maior abundância, correspondendo a 66,9% (216) do total de *Anopheles* coletados (Figura 29 e Tabela 17). Além disso, os pontos supracitados foram os que também apresentaram maior diversidade de espécies de *Anopheles*, como mostra a figura 30. O ponto P16 se trata de uma área mais arborizada, afastada do aglomerado urbano, já o ponto P6 se trata de uma área próximo a um corredor ecológico constituído por rios e manguezais, também afastado do aglomerado urbano. As espécies *An. aquasalis* e *An. albitarsis* s.l foram coletadas em maior número de pontos de coleta, e *An. oswaldoi*, *An. braziliensis* e *An. sawyeri* foram coletadas em apenas três pontos, conforme detalhado na tabela 17.

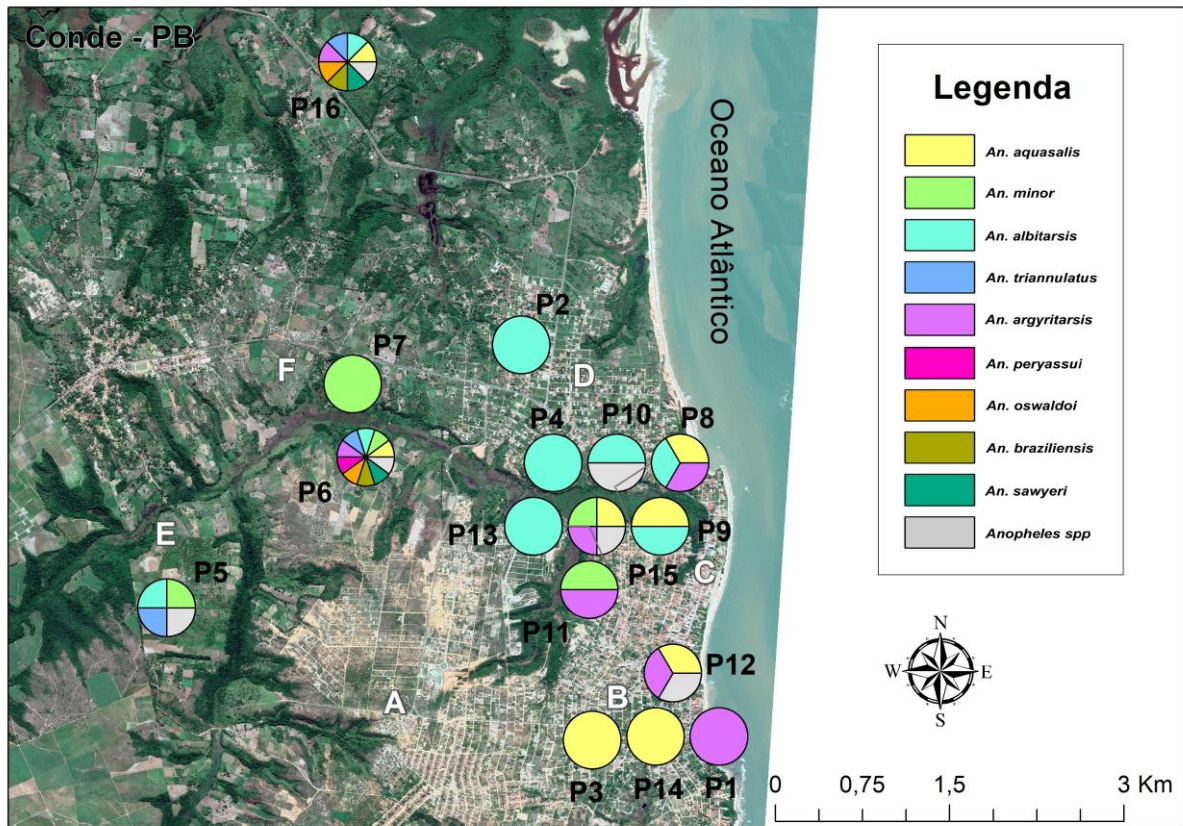
Figura 29 – Densidade de anofelinos por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.



Fonte: editado no ArcGis (2019).

Legenda: A densidade dos *Anopheles* é representada por seis pentágonos amarelos que variam em tamanho, variando de 1 a 125 mosquitos coletados por ponto. As letras maiúsculas de A a F - bairros onde os mosquitos foram coletados e são descritos na legenda da figura 21.

Figura 30 - Diversidade de espécies de *Anopheles* por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.



Fonte: editado no ArcGis (2019).

Legenda: círculos coloridos referem-se às suas espécies de *Anopheles* correspondentes: círculo amarelo – *An. aquasalis*; círculo verde – *An. minor*; círculo azul claro – *An. albitarsis* s.l.; círculo azul escuro – *An. triannulatus*; círculo roxo – *An. argyritarsis*; círculo rosa – *An. peryassui*; círculo laranja – *An. oswaldoi*; círculo verde claro – *An. braziliensis*; círculo verde escuro – *An. sawyeri*; círculo cinza – *Anopheles* spp. As letras maiúsculas de A a F referem-se aos seis principais bairros onde os mosquitos foram coletados e são descritos na legenda da figura 21.

As áreas com maior risco de ocorrência de malária com base na análise da distribuição dos anofelinos coletados e de casos registrados no município estão identificadas no mapa de estimativa de densidade do kernel (KDE) (Figura 31). A maior concentração de casos, notificados no município do Conde, durante o surto ocorrido em 2019, foi registrada entre as áreas C e D, seguida da área A. (Figura 31.a). Análise da distribuição dos três potenciais vetores da malária no estado da Paraíba - *An. albitarsis* s.l, *An. argyritarsis* e *A. aquasalis* - por pontos de coleta (Figura 31.b, 31.c), mostrou que os pontos entre as áreas C e D foram os que apresentaram maior risco de transmissão e maior risco de ocorrência dessas espécies. Vale destacar a existência de uma segunda área de alto risco para *An. aquasalis* e *An. argyritarsis* na área B (Figura 31.c).

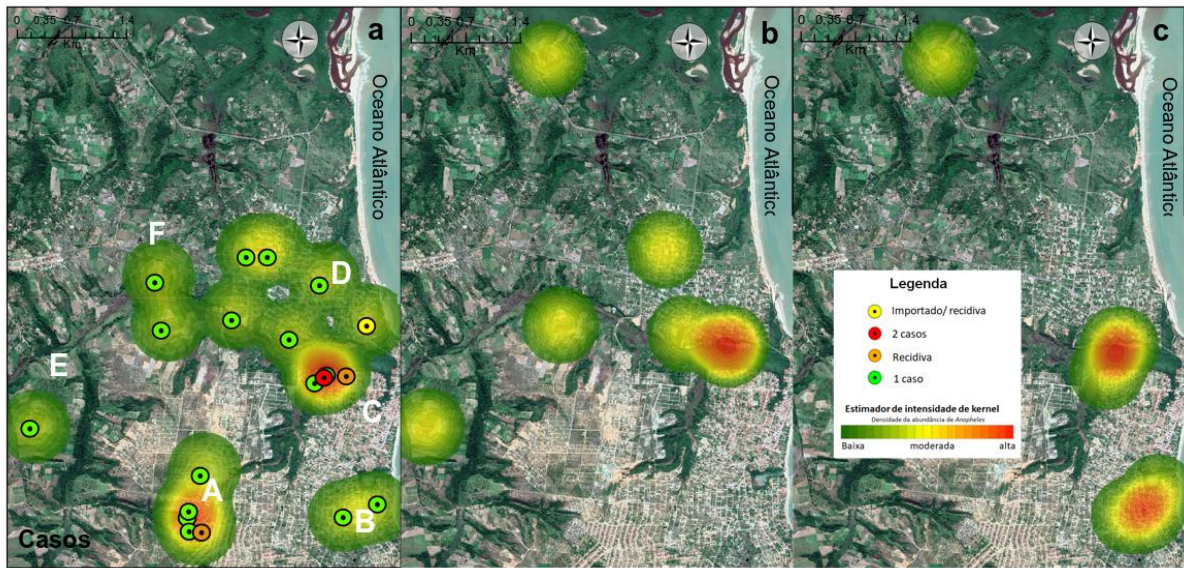
Tabela 17 – Densidade de espécies de *Anopheles* coletadas por ponto de coleta no município do Conde-PB, de julho a novembro de 2019.

Pontos de coleta (P)	An. aquasalis*	An. minor	An. albitarsis s.l.*	An. triannulatus	An. argyritasis*	An. peryassui	An. oswaldoi	An. braziliensis	An. sawyeri	Anopheles spp.	Total
1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	6
5	-	2	9	4	-	-	-	-	-	1	16
6	1	51	7	3	3	15	3	1	2	5	91
7	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
8	10	-	1	-	1	-	-	-	-	-	12
9	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
10	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	3
11	-	5	-	-	1	-	-	-	-	-	6
12	32	-	-	-	5	-	-	-	-	9	46
13	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
14	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
15	4	2	-	-	3	-	-	-	-	-	9
16	85	-	2	25	4	-	2	2	1	4	125
Total	135	62	30	32	18	15	5	3	3	20	323

Fonte: o autor.

Legenda: * Potencial vetor na transmissão do parasita causador da malária no estado da Paraíba.

Figura 31 - Mapa de estimativa de densidade do kernel (KDE) mostrando as áreas de risco para a ocorrência de malária e de três potenciais *da* malária, no estado da Paraíba.



Fonte: adaptado do ArqGis (2020).

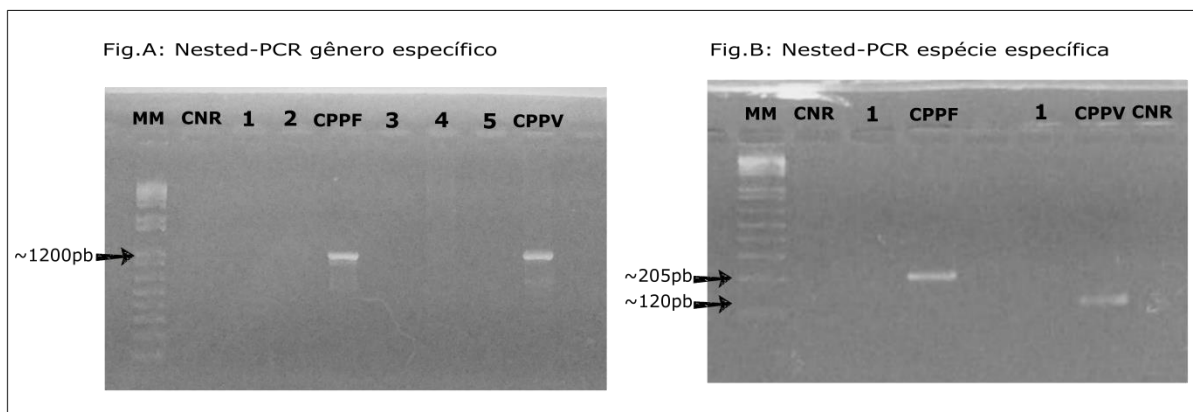
Legenda: Os pontos quentes (hotspot) são identificados em uma escala de cores de verde a vermelho (risco baixo a alto, respectivamente). **a**, KDE de casos de malária com base no número e distribuição de casos por residências. Os círculos coloridos identificam a distribuição dos casos de malária por geolocalização. Cada círculo verde indica um caso; o círculo amarelo indicando um caso importado da Venezuela, com recidiva após o tratamento; os círculos laranjas indicando casos que apresentaram recidiva após o tratamento; círculos vermelhos indicando residências onde foram registrados dois casos; **b**, KDE de distribuição de *An. albitarsis* s.l por pontos de coleta; **c**, KDE de distribuição de *An. aquasalis* e *An. argyritarsis* por pontos de coleta. As letras maiúsculas de A a F referem-se aos seis principais bairros onde os mosquitos foram coletados e estão descritos na legenda da figura 21.

8.2 Determinação de infecção natural por *Plasmodium* spp. em anofelinos coletados no município do Conde, estado da Paraíba

Para detecção de *Plasmodium* spp. foram utilizados um total de 312 fêmeas de espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde. Destes, 64 mosquitos fêmeas¹⁵ tinham realizado repasto sanguíneo antes da captura (observação feita durante a separação dos mosquitos coletados, no microscópio estereoscópico). A Nested-PCR realizada separadamente para cada secção (cabeça/tórax e abdômen) não detectou nenhuma amostra positiva no conjunto analisado (Figura 32).

¹⁵ *An. aquasalis* (n = 39), *An. minor* (n = 2), *An. albitarsis* s.l (n = 3), *An. argyritarsis* (n = 4), *An. braziliensis* (n = 2), *An. peryassui* (n = 1), *An. sawyeri* (n = 1), *An. triannulatus* (n = 10), *Anopheles* spp. (n = 2).

Figura 32 - Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados a partir da Nested-PCR da região 18S-RNAr de *Plasmodium spp.*



Fonte: o autor.

Legenda: MM, marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder; CNR, controle negativo da reação; 1, 2, 3,4 e 5, amostras negativas; CPPF, controle positivo de *Plasmodium falciparum*; CPPV, controle positivo *Plasmodium vivax*.

8.3 Detecção de mutações associados à resistência aos inseticidas químicos

A genotipagem de fragmentos dos genes de resistência foi realizada para a população de *Anopheles arabiensis* coletada em Cabo Verde e para três espécies consideradas potenciais vetores da malária proveniente do município do Conde-PB: *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis* s.l e *Anopheles argyritarsis*.

8.3.1 Detecção da mutação G119S no gene *ace-1*

Para o fragmento de gene *ace-1*, a análise molecular revelou a ausência da mutação G119S em 157 indivíduos de *Anopheles arabiensis* investigados. Todos os indivíduos foram considerados homozigotos para a forma selvagem do gene (Tabela 18). Produtos da PCR, escolhidos de forma aleatória (10 amostras), foram enviados para o sequenciamento e a ausência da mutação G119S nas amostras analisadas foi confirmada.

Tabela 18 – Genótipo do *locus ace-1* de *Anopheles arabiensis* nas diferentes localidades de coleta da cidade da Praia, Ilha de Santiago.

Locais de coleta	N	Genótipos		
		SS	RR	RS
Várzea	34	34	0	0
AGT	123	123	0	0
Total	157	157	0	0

Fonte: o autor.

Legenda: N - Número de *Anopheles arabiensis* analisados; AGT – Achada Grande Trás; RR – genótipo homocigoto com a mutação G119S; RS – genótipo heterocigoto; SS genótipo homocigoto sem a mutação G119S.

O sequenciamento do fragmento do gene *ace-1* para as três espécies de *Anopheles* (*Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis* s.l e *Anopheles argyritarsis*), coletadas no município do Conde-PB, consideradas para análise também revelou a ausência da mutação supracitada (Tabela 19). O total de indivíduos analisados para cada espécie foi: *Anopheles aquasalis* – 40 (37 sequências com qualidade satisfatória para análise); *Anopheles albitarsis* s.l – 30 (29 sequências com qualidade satisfatória para análise); *Anopheles argyritarsis* – 18 (16 sequências com qualidade satisfatória para análise).

Tabela 19 - Genótipos do *locus ace-1* de três espécies de *Anopheles* (*An. albitarsis* s.l, *An. aquasalis* e *An. argyritarsis*) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.

Espécies (N)	Áreas de coleta	Genótipos do <i>locus ace1</i>		
		SS	RR	RS
<i>An. albitarsis</i> s.l (30)	Área F	9	0	0
	Área C	1	0	0
	Área D	11	0	0
	Área E	8	0	0
	Total	29	0	0
<i>An. aquasalis</i> (40)	Área B	10	0	0
	Área C	4	0	0
	Área D	10	0	0
	Área F	13	0	0
	Total	37	0	0
<i>An. argyritarsis</i> (18)	Área B	5	0	0
	Área C	4	0	0
	Área D	1	0	0
	Área F	6	0	0
	Total	16	0	0

Fonte: o autor.

Legenda: N - número de indivíduos analisados; RR – genótipo homocigoto com a mutação G119S; RS – genótipo heterocigoto; SS genótipo homocigoto sem a mutação G119S. Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila de Jacumã; Área E, Baraúna; Área F, Gurugi.

8.3.2 Detecção da mutação L119F no gene *GSTE2*

Do total de 107 indivíduos da espécie *Anopheles arabiensis*, coletados em Cabo Verde, sequenciados, 102 amostras tiveram qualidade satisfatória para análise. A sequência codificadora completa (600 pb) do fragmento de *GSTE2* amplificado foi analisada e a mutação pontual L119F não foi encontrada em nenhuma amostra analisada (Tabela 20).

Tabela 20 – Genótipo do locus *GSTE2* de *Anopheles arabiensis* nas diferentes localidades de coleta da cidade da Praia, Ilha de Santiago.

Locais de coleta	N	Genótipos		
		SS	RR	RS
Várzea	59	59	0	0
AGT	43	43	0	0
Total	102	102	0	0

Fonte: o autor.

Legenda: N - Número de *Anopheles arabiensis* analisados; AGT – Achada Grande Trás; RR – genótipo homocigoto com a mutação L119F; RS – genótipo heterocigoto; SS - genótipo homocigoto sem a mutação L119F.

A genotipagem de *GSTE2* para as três espécies de *Anopheles* coletadas no município do Conde-PB revelou também a ausência da mutação L119F (Tabela 21). O total de indivíduos analisados para cada espécie foi: *Anopheles aquasalis* – 40 (39 sequências com qualidade satisfatória para análise); *Anopheles albitarsis* s.l – 30 (28 sequências com qualidade satisfatória para análise); *Anopheles argyritarsis* – 18 (17 sequências com qualidade satisfatória para análise).

Tabela 21 - Genótipos do locus *GSTE2* de três espécies de *Anopheles* (*An. albitarsis s.l.*, *An. aquasalis* e *An. argyritarsis*) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.

Espécies (N)	Áreas de coleta	Genótipos do locus <i>GSTE2</i>		
		SS	RR	RS
<i>An. albitarsis s.l.</i> (30)	Área F	8	0	0
	Área C	1	0	0
	Área D	11	0	0
	Área E	8	0	0
	Total	28	0	0
<i>An. aquasalis</i> (40)	Área B	11	0	0
	Área C	4	0	0
	Área D	11	0	0
	Área F	13	0	0
	Total	39	0	0
<i>An. argyritarsis</i> (18)	Área B	6	0	0
	Área C	3	0	0
	Área D	1	0	0
	Área F	7	0	0
	Total	17	0	0

Fonte: o autor.

Legenda: N - número de indivíduos analisados; RR – genótipo homozigoto com a mutação L119F; RS – genótipo heterozigoto; SS - genótipo homozigoto sem a mutação L119F; Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila de Jacumã; Área E, Baraúna; Área F, Gurugi.

8.3.3 Detecção de mutações do tipo *Kdr* no gene *Na_v*

De 152 *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde sequenciados para o gene *Na_v*, 137 tiveram qualidade satisfatória para análises. Destes, 10 apresentaram o genótipo de heterozigoto (RS) e 16 homozigoto (RR) para a mutação *kdr-east* (L1014S). Por outro lado, 16 mosquitos apresentaram o genótipo de heterozigoto (RS) e 14 homozigoto (RR) para a mutação a *kdr-west* (L1014F). Os demais indivíduos analisados (81) apresentaram a forma selvagem do gene. As frequências alélicas de L1014S e L1014F encontradas foram de 0,15 e 0,17 respectivamente (Tabela 22). A frequência alélica de L1014F encontrada foi igual em indivíduos coletados nos dois bairros. Por outro lado, a frequência alélica de L1014S foi maior no bairro da Várzea (Figura 33).

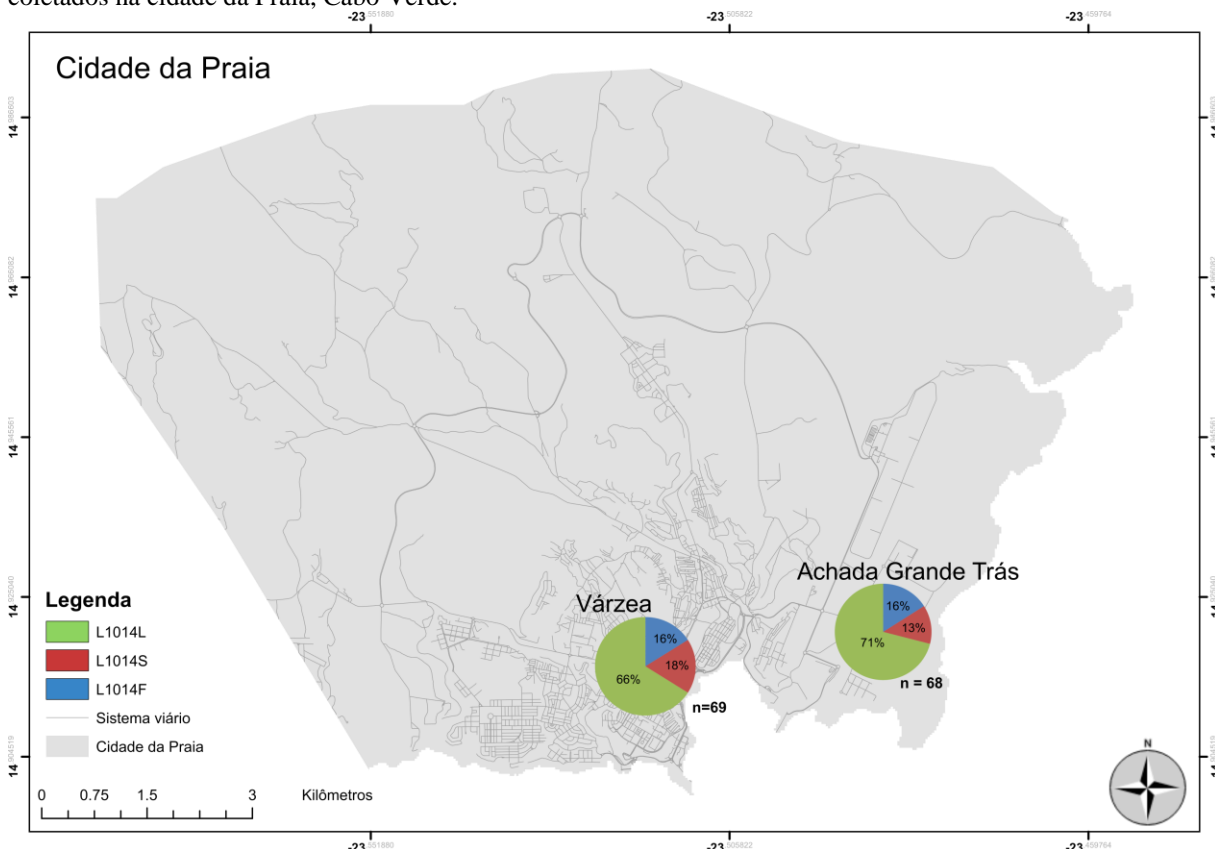
Tabela 22 - Genótipo e frequência dos alelos L1014S e L1014F, do gene Na_v , da população de *Anopheles arabiensis* coletada em diferentes localidades da cidade da Praia, Cabo Verde.

Localidades	N	Genótipo suscetível alélica		Genótipos L1014S Freq. alélica			Genótipos L1014F Freq. alélica		
		SS	S	RR	RS	R1	RR	RS	R2
Várzea	69	44	0,66	12	1	0,18	10	2	0,16
AGT	68	37	0,71	4	9	0,13	4	14	0,16
Total	137	81	0,68	16	10	0,15	14	15	0,17

Fonte: o autor.

Legenda: N - Número de *Anopheles arabiensis* analisados; AGT – Achada Grande Trás; RR – indivíduos homozigotos resistentes; RS – indivíduos heterozigotos; SS indivíduos homozigotos suscetíveis, R – alelo resistente L1014S; S – alelo selvagem.

Figura 33 - Distribuição da frequência alélica de L1014S e L1014F, do gene Na_v , em mosquitos *Anopheles* coletados na cidade da Praia, Cabo Verde.



Fonte: editado no QGis (2019).

Legenda: n – número total de indivíduos usados para detecção das mutações L1014S e L1014F no gene Na_v .

Assim como os genes *ace-1* e *GSTE2*, a genotipagem do gene Na_v para as espécies de *Anopheles* do município do Conde, consideradas para análise, revelou também a ausência das mutações pontuais L1014F/S (Tabela 23). O total de indivíduos analisados para cada espécie foi: *Anopheles aquasalis* – 40 (38 sequências com qualidade satisfatória para análise);

Anopheles albitarsis s.l – 30 (29 sequências com qualidade satisfatória para análise);
Anopheles argyritarsis – 18 (17 sequências com qualidade satisfatória para análise).

Tabela 23 - Genótipos do locus Na_v de três espécies de *Anopheles* (*An. albitarsis* s.l, *An. aquasalis* e *An. argyritarsis*) coletadas em diferentes áreas do município do Conde-PB.

Espécies (N)	Áreas de coleta	Genótipos do locus Na_v		
		SS	RR	RS
<i>An. albitarsis</i> s.l (30)	Área F	9	0	0
	Área C	1	0	0
	Área D	10	0	0
	Área E	9	0	0
	Total	29	0	0
<i>An. aquasalis</i> (40)	Área B	12	0	0
	Área C	4	0	0
	Área D	10	0	0
	Área F	12	0	0
	Total	38	0	0
<i>An. argyritarsis</i> (18)	Área B	6	0	0
	Área C	4	0	0
	Área D	1	0	0
	Área F	6	0	0
	Total	17	0	0

Fonte: o autor.

Legenda: N - número de indivíduos analisados; RR – genótipo homocigoto com as mutação L1014F/S; RS – genótipo heterocigoto; SS - genótipo homocigoto sem as mutações L1014F/S; Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila de Jacumã; Área E, Baraúna; Área F, Gurugi

8.4 Estudo da diversidade genética de populações de *Anopheles*

8.4.1 Caracterização genética da população de *Anopheles arabiensis* coletada em Cabo Verde

Para a avaliação local do gene *COI*, foram sequenciados um total de 50 indivíduos e 46 sequências tiveram qualidade satisfatória para análise após o sequenciamento, seguindo o critério de PHRED. Desses, 29 indivíduos pertenciam ao bairro de Achada Grande e 17 ao bairro da Várzea.

A edição das sequências no programa CodonCode Aligner resultou em um fragmento de 672 pb. As análises da diversidade genética dessas sequências revelaram, de modo geral, a presença de dois haplótipos para as duas localidades de estudo, um sítio segregante e uma

diversidade nucleotídica de 0.00039. A diversidade genética entre as duas localidades foi semelhante. Quanto aos testes de neutralidade, tanto o teste Tajima's D como o teste de Fu e Li's mostram-se não significativos ($P > 0,10$) com valores positivos, como mostra a tabela 24.

Tabela 24 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *COI* de 46 indivíduos de *Anopheles arabiensis* coletados em duas localidades da cidade da Praia no ano de 2017.

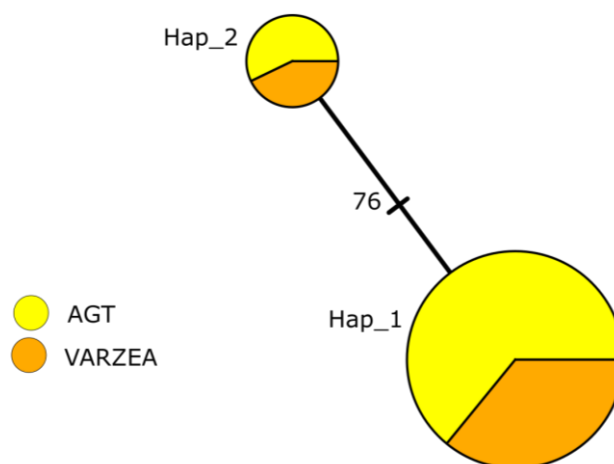
Parâmetros genéticos	Populações analisadas		
	Várzea	AGT	Total
<i>n</i>	17	29	46
<i>s</i>	1	1	1
<i>h</i>	2	2	2
<i>hd</i>	0,309	0,246	0,264
π	0,00046	0,00037	0,00039
<i>K</i>	0,309	0,246	0,264
<i>D</i>	0,08512 ns	- 0,05156 ns	0,21872 ns
<i>D*</i>	0,67700 ns	0,5985 ns	0,55053 ns

Fonte: o autor.

Legenda: S, número de sítios polimórficos; h, número de haplótipos; hd, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; K, número médio de diferenças nucleotídicas; D, teste de Tajima; D*, teste de Fu e Li's; ns, não significante. $P > 0,10$.

A rede de haplótipos construída usando o método de Median Joining Network mostra que a relação entre os haplótipos diferiu por um passo mutacional (Figura 34). A tabela 25 mostra a distribuição dos haplótipos das populações de *Anopheles arabiensis* nas duas localidades de coleta em Cabo Verde. Ambos os haplótipos (Hap 1 e Hap 2), foram encontrados em todas as duas áreas de coleta, e o haplótipo 1 foi mais frequente, principalmente na população de Achada Grande Trás.

Figura 34 – Rede de haplótipos do gene *COI* (672 pb) das populações de *Anopheles arabiensis* coletados em duas localidades da cidade da Praia, Cabo Verde, no ano de 2017.



Fonte: o autor.

Legenda: AGT, Achada Grande Trás; Hap 1, corresponde ao haplótipo 1; Hap 2, corresponde ao haplótipo 2; 76, corresponde ao passo mutacional entre os haplótipos. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Tabela 25 – Distribuição dos haplótipos do gene *COI* de *Anopheles arabiensis* coletados nas duas localidades da cidade da Praia, Cabo Verde, no ano de 2017.

Haplótipos	N	Sítio variável na sequência do gene <i>COI</i>		Freq. dos hap. por Localidade	
		76		AGT	VAR
H1	39	G	25	14	
H2	7	A	4	3	

Fonte: O autor

Legenda: N, número de indivíduos encontrado em cada haplótipo; AGT, Achada Grande Trás; VAR, Várzea. A tabela mostra o sítio variável quando comparados com o haplótipo mais comum (H1).

Para a análise global, sequências de *COI* obtidas no GenBank foram adicionadas ao conjunto de dados de Cabo Verde. Após Blastn no NCBI, foram retornados 72 sequências de *COI* de *Anopheles arabiensis*. Sequências com mais de 25% de dados de sequências ausentes foram eliminadas e as restantes (31) foram alinhadas no bioedit com a população de Cabo Verde. Após alinhamento, o conjunto de sequências foi editado na ferramenta AliView v:1.26, resultando num fragmento final de 441 pb. A combinação dos dados resultou num total de 77 sequências analisadas: Cabo Verde (46), Quênia (3), Malawi (3), Sudão (1), Zâmbia (4), Arábia Saudita (4), Yemen (1), Etiópia (14) e Uganda (1) (Apêndice E).

A análise de polimorfismos entre as populações resultou em 3,17% (14/441) de sítios segregantes, dos quais sete foram informativos - “parsimony informative sites” (4, 76, 127, 154, 280, 325, 427) (Apêndice F). No total, foi observado uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0446 e uma diversidade haplotípica (h) de 0,717. Quando comparados os países, Etiópia (h

= 11, $hd = 0,957$) e Malawi ($h = 3$, $hd = 1$) foram os mais diversos. O teste de Tajima's D foi negativo (-2.20972) e estatisticamente não significativa (P-value > 0,05) (Tabela 26). Além disso, quando os dados de Cabo Verde foram combinados com o grupo de dados obtidos do GenBank, um total de 17 haplótipos foram encontrados. Os haplótipos Hap_1 ($n = 11$ sequências), Hap_16 ($n = 29$) e Hap_17 ($n = 7$), foram os mais frequentes. Esses dois últimos foram encontrados exclusivamente nas populações de Cabo Verde. Além disso, o Hap_4, considerado o haplótipo mais antigo deste grupo de dados, foi encontrado exclusivamente no Yemem. Já o Hap_1 foi o mais disperso (Figura 35 e Figura 36, Tabela 27). Apesar de Cabo Verde não compartilhar haplótipos com nenhum outro país, os haplótipos 16 e 17 encontrados na população de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde se mostraram filogeneticamente mais próximas do Hap_8 encontrado na Etiópia (código de acesso: MK628484.1), com 99,77% e 99,55% de identidade respectivamente (Figura 37).

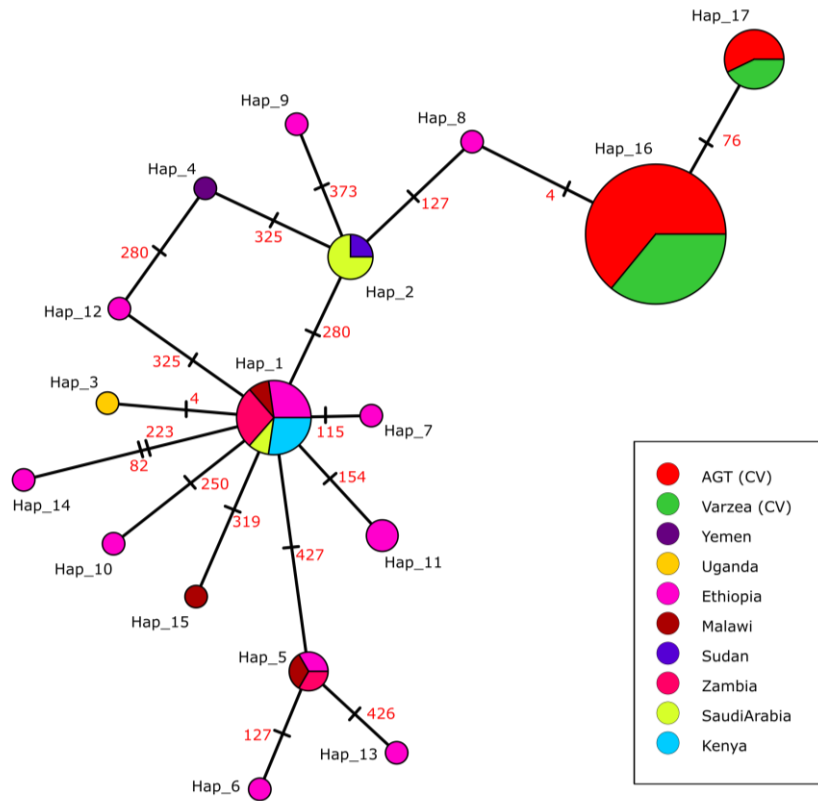
Tabela 26 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *COI* de 77 indivíduos de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>hd</i>	π	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>D*</i>
Várzea (CV)	17	1	2	0,309	0,00046	0,309	0,08512 ns	0,67700 ns
AGT (CV)	29	1	2	0,246	0,00037	0,246	-0,05156 ns	0,5985 ns
Zambia	4	1	2	0,500	0,00113	0,500	-0,61237 ns	-0,61237 ns
Quênia	3	0	1	0,0	0,0	0,0	nd	nd
Etiópia	14	11	11	0,957	0,00488	2,154	-1,48716 ns	-1,26905 ns
Uganda	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Arábia Saudita	4	1	2	0,500	0,00113	0,500	-0,61237 ns	-0,61237 ns
Yemem	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sudão	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Malawi	3	2	3	1,000	0,00302	1,333	nd	nd
Total	77	14	17	0,717	0,00446	1,967	-0,87762 ns	-2,20972 ns

Fonte: o autor.

Legenda: *S*, número de sítios polimórficos; *h*, número de haplótipos; *hd*, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; *K*, número médio de diferenças nucleotídicas; *D*, teste de Tajima; *D**, teste de Fu e Li's; ns, não significativa; nd, não determinado.

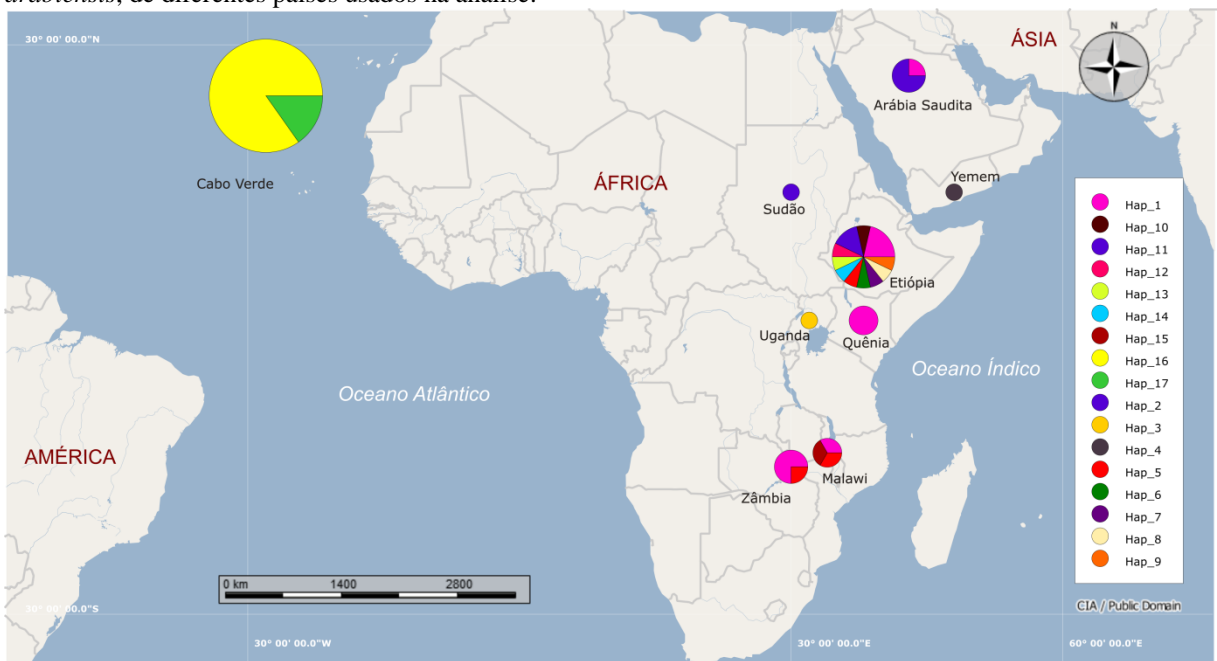
Figura 35 – Rede de haplótipos de 77 seqüências do gene *COI* (441pb) de populações de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.



Fonte: o autor

Legenda: CV, Cabo Verde; Hap_16 e Hap_17, haplótipos encontrados nas duas populações de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde; as seqüências dos demais países foram recuperadas do GenBank; em vermelho destacam-se os passos mutacionais entre cada haplótipo; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 36 – Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* das populações de *Anopheles arabiensis*, de diferentes países usados na análise.



Fonte: Adaptado da ferramenta popART, versão 1.7.

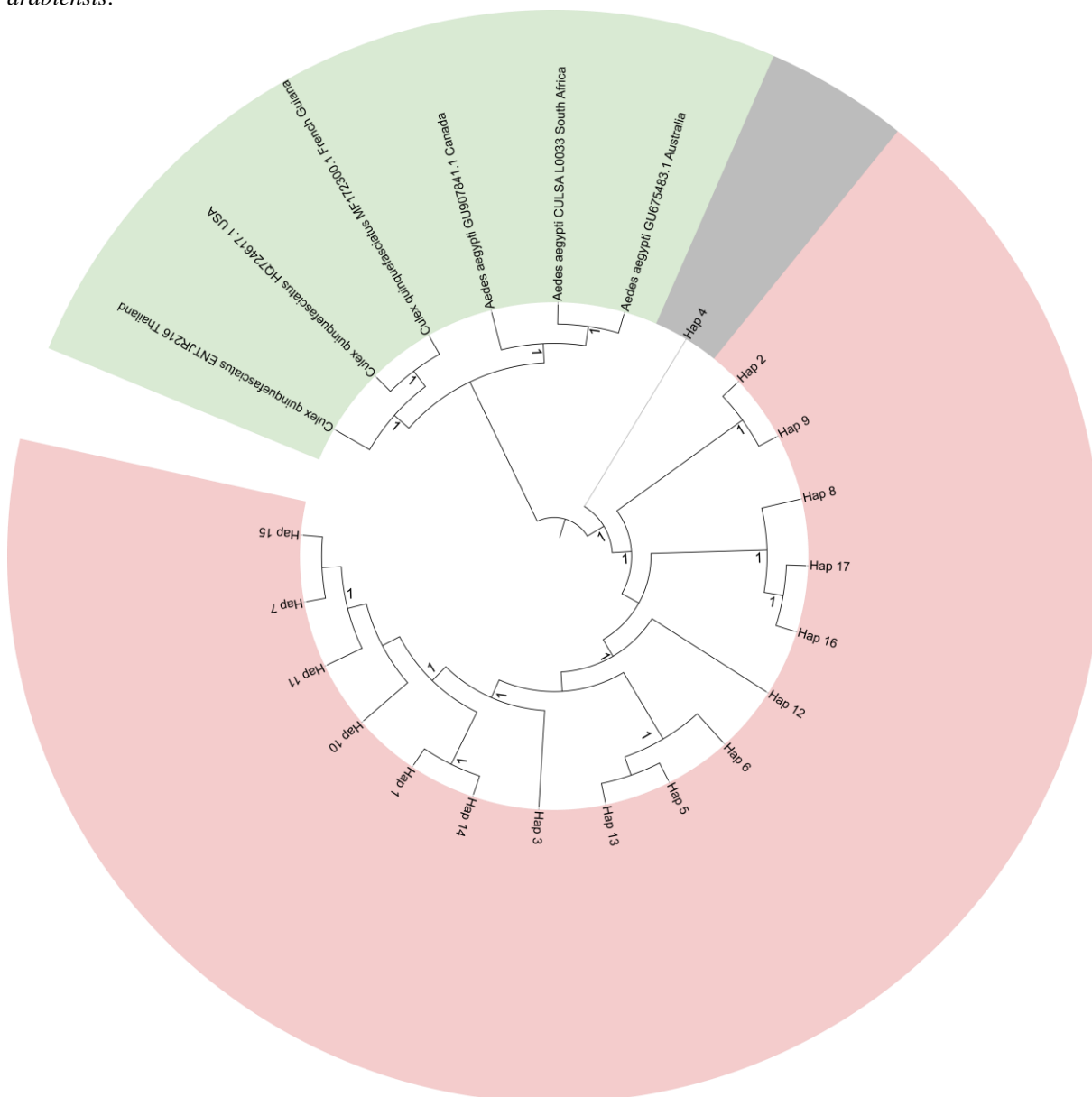
Tabela 27 – Frequência haplotípica do gene *COI* por populações de *Anopheles arabiensis* analisadas.

Haplótipos	Quênia (3)	Arábia Saúdita (4)	Uganda (1)	Sudan (1)	Yemem (1)	Zambia (4)	Etopia (14)	Malawi (3)	Várzea (17)	AGT (29)	Total
H01	3	1	0	0	0	3	3	1	0	0	11
H02	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	4
H03	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H04	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
H05	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3
H06	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H07	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H08	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H09	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H11	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
H12	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
H15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
H16	0	0	0	0	0	0	0	0	14	25	39
H17	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	7

Fonte: o autor.

Legenda: AGT, Achada Grande Trás.

Figura 37 – Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* de diferentes populações de *Anopheles arabiensis*.



Fonte: o autor.

Legenda: Hap 16 e 17, haplótipos encontrados nas duas populações de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde. Destaque em verde representando o grupo externo. Destaque rosa, grupo de *Anopheles arabiensis* obtidos no GenBank. Destaque cinza, haplótipo ancestral encontrado no Yemem. A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi o GTR+G. A análise envolveu 17 haplótipos com um total de 441 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

Em relação a diferenciação genética entre as 10 populações geográficas, os valores do índice de fixação F_{st} (com base em 1000 simulações) foram significativamente mais altos (variação: 0,69002 a 0,92831; $P < 0,05$; $P < 0,01$) quando as duas populações de *Anopheles arabiensis* coletadas em Cabo Verde foram comparadas com as populações dos outros países analisados nesse estudo. O nível mais alto de diferenciação genética foi entre as populações de Cabo Verde e Quênia ($F_{st} = 0,92831$ e $0,91558$; $P < 0,01$). Por outro lado, uma comparação entre as populações continentais mostrou, de forma geral, um baixo a moderado nível de diferenciação genética entre si (variação: - 0,17647 a 0,71429; $P > 0,05$), com exceção das populações de Yemem, Sudão e Uganda (Tabela 28) que apresentam diferenciação genética muito alta. Quanto ao número de migrantes por geração (Nm), que estima o fluxo gênico entre as populações, comparações entre as populações de Cabo Verde com as demais populações representativas dos outros países revelaram valores baixos (variação Nm : 0,03861 a 0,16719), confirmando baixo fluxo gênico e a alta diferenciação genética entre populações de Cabo Verde com as populações dos outros países (Tabela 28). Nenhuma correlação estatisticamente significativa, baseada no teste de Mantel, foi detectada entre a distância genética e a distância geográfica das populações de *Anopheles arabiensis* consideradas nesta análise ($r = - 0,326$, $r^2 = 0,106268$, $p = 0,93$).

Tabela 28 - Diferenciação genética (*F_{st}*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal) entre as populações de *Anopheles arabiensis* baseado no gene *COI*.

	QN	AS	UG	SD	YM	ZB	ET	MW	VAR	AGT
QN	-	0,31579	0,00000	0,00000	0,00000	∞	∞	∞	0,0461	0,03861
AS	0,6129	-	0,20000	∞	0,33333	0,50000	4,73352	49,600000	0,08304	0,06629
UG ^a	1,00000	0,71429	-	0,00000	0,00000	0,33333	∞	0,76923	0,08268	0,06510
SD ^a	1,00000	-1,00000	1,00000	-	0,00000	0,33333	∞	2,00000	0,08268	0,06510
YM ^a	1,00000	0,60000	1,00000	1,00000	-	0,14286	1,92157	2,00000	0,05385	0,04259
ZB	-0,09091	0,50000	0,60000	0,60000	0,77778	-	∞	0,50000	0,05573	0,04450
ET	-0,14397	0,09554	-0,00513	-0,15976	0,20648	-0,12038	-	∞	0,22461	0,16719
MW	0,00000	0,39394	0,20000	0,20000	0,50000	-0,17647	-0,10337	-	0,06665	0,05008
VAR	0,91558**	0,85758**	0,85811	0,85811	0,90278	0,89971**	0,69002**	0,88237**	-	∞
AGT	0,92831**	0,88294**	0,88479*	0,88479*	0,92151*	0,91827**	0,74941**	0,90896**	-0,04290	-

Fonte: o autor.

Legenda: QN, Quênia; AS, Arábia Saudita; UG, Uganda; SD, Sudão; YM, Yemem; ZB, Zâmbia; ET, Etiópia; MW, Malawi; VAR, Várzea; AGT, Achada Grande Trás; ∞ - infinito; ^a - populações nas quais foi usada apenas uma sequência para a análise; *, significante ($p < 0,05$); **, significante ($p < 0,01$).

A análise local do gene *ND5* de 50 amostras sequenciadas, gerou um total de 46 sequências com qualidade satisfatória, de acordo com o critério de PHRED. Destes, 23 indivíduos pertenciam ao bairro de Achada Grande e o restante, ao bairro da Várzea. A edição das sequências no programa CodonCode Aligner resultou em um fragmento de 794 pb. Após as análises, verificou-se a ausência de sítios polimórficos nas sequências, demonstrando haver apenas um haplótipo do gene *ND5* de *Anopheles arabiensis* na área de estudo.

Para esse gene, também foi feita uma análise global, sendo incluídas mais 49 sequências de diferentes países ao grupo de dados, após Blastn no NCBI: Sudão (10), Malawi (10), Etiópia (7), Senegal (10), África do Sul (3) e Quênia (9) (Apêndice G). O alinhamento e edição desse grupo de dados resultou num fragmento final de 665 pb.

A análise de polimorfismos entre as populações resultou em 3,45% (23/665) de sítios segregantes, dos quais 9 foram informativos “parsimony informative sites” (75, 29, 165, 201, 243, 306, 321 423, 516) (Apêndice H). No geral, foi observado uma diversidade nucleotídica de 0,00264 e uma diversidade haplotípica de 0,74087. Na comparação da diversidade entre os países, Etiópia ($h = 7$, $hd = 1$) e Senegal ($h = 10$, $hd = 1$) foram os mais diversos. Os testes de neutralidades para cada população se mostraram negativos e não significantes (P-value >0,05) (Tabela 29). Além disso, um total de 30 haplótipos foi identificado entre as populações analisadas, incluindo o haplótipo único encontrado em Cabo Verde. Os haplótipos mais frequentes foram Hap_1 ($n = 48$ sequências), Hap_3 ($n = 5$), Hap_10 ($n = 4$), Hap_4 ($n = 3$) e Hap_13 ($n = 3$). Das populações de *Anopheles arabiensis* analisadas, Sudão e Malawi foram as únicas que compartilharam haplótipo (Hap_1) com a população de Cabo Verde. O Hap_7, considerado o haplótipo mais antigo deste grupo de dados, foi encontrado no Sudão e Senegal. Os Hap_1, 3 e 4 foram os mais dispersos (Figura 38, Figura 39 e Tabela 30). O hap_1 que inclui sequências de *ND5* de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde, Sudão e Malawi se mostrou filogeneticamente mais próxima do Hap_15 encontrado na Etiópia (código de acesso: AY009971.1), com 99,85% de identidade (Figura 40).

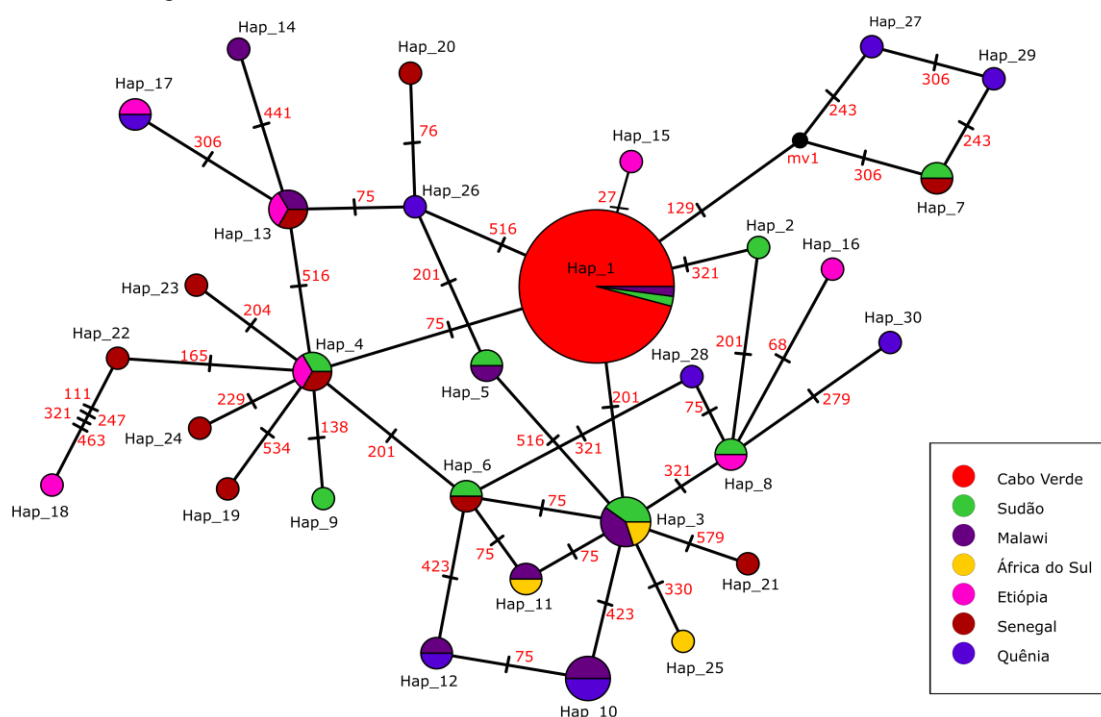
Tabela 29 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *ND5* de 95 indivíduos de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>hd</i>	π	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>D*</i>
Cabo Verde	46	0	1	0,00000	0,00000	0,00000	nd	nd
Sudão	10	7	9	0,97778	0,00327	2,17778	- 0,50775 ns	- 0,62876 ns
Malawai	10	5	8	0,95556	0,00331	2,20000	0,15426 ns	0,20368 ns
Etiópia	7	11	7	1,00000	0,00616	4,09524	- 0,4753 ns	- 0,52531 ns
Senegal	10	11	10	1,00000	0,00418	2,77778	- 1,27892 ns	- 1,25376 ns
África do Sul	3	2	3	1,00000	0,00201	1,33333	nd	nd
Quênia	9	9	8	0,97222	0,0056	3,72222	0,57094 ns	1,06477 ns
Total	95	23	30	0,74087	0,00264	1,75857	- 1,86357*	- 3,57995**

Fonte: o autor.

Legenda: *, significativo ($p < 0,05$); **, significativo ($p < 0,02$); nd, não determinado; ns, não significativo ($p > 0,05$).

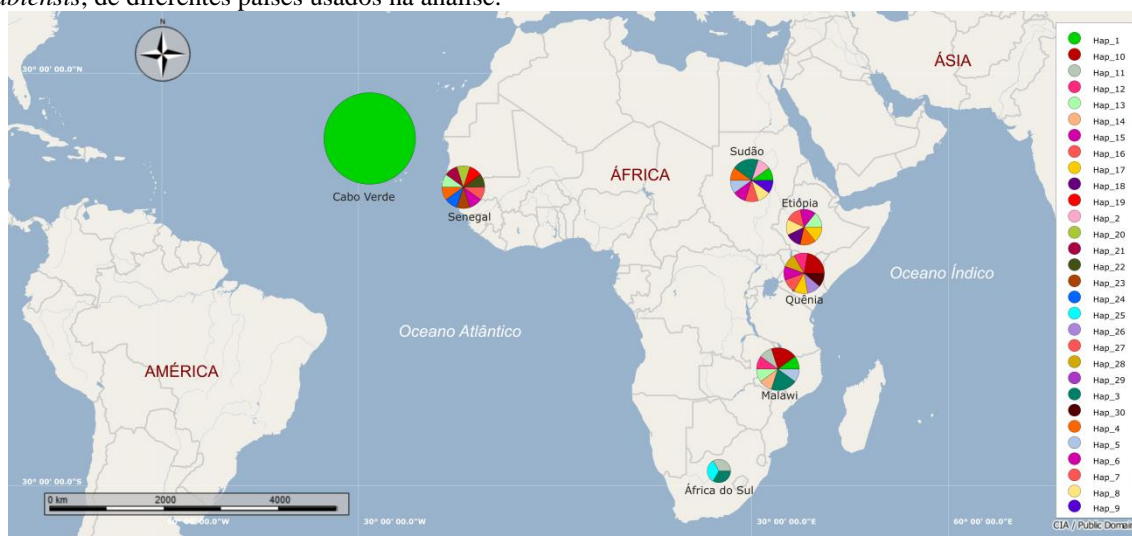
Figura 38 - Rede de haplótipos de 95 sequências do gene *ND5* (665 pb) de populações de *Anopheles arabiensis* usados na análise global.



Fonte: o autor

Legenda: Hap_1, haplótipo único encontrado nas duas populações de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde; as sequências dos demais países foram recuperadas do GenBank; em vermelho destacam-se os passos mutacionais entre cada haplótipo; mv1, vetor médio; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 39 – Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* das populações de *Anopheles arabiensis*, de diferentes países usados na análise.



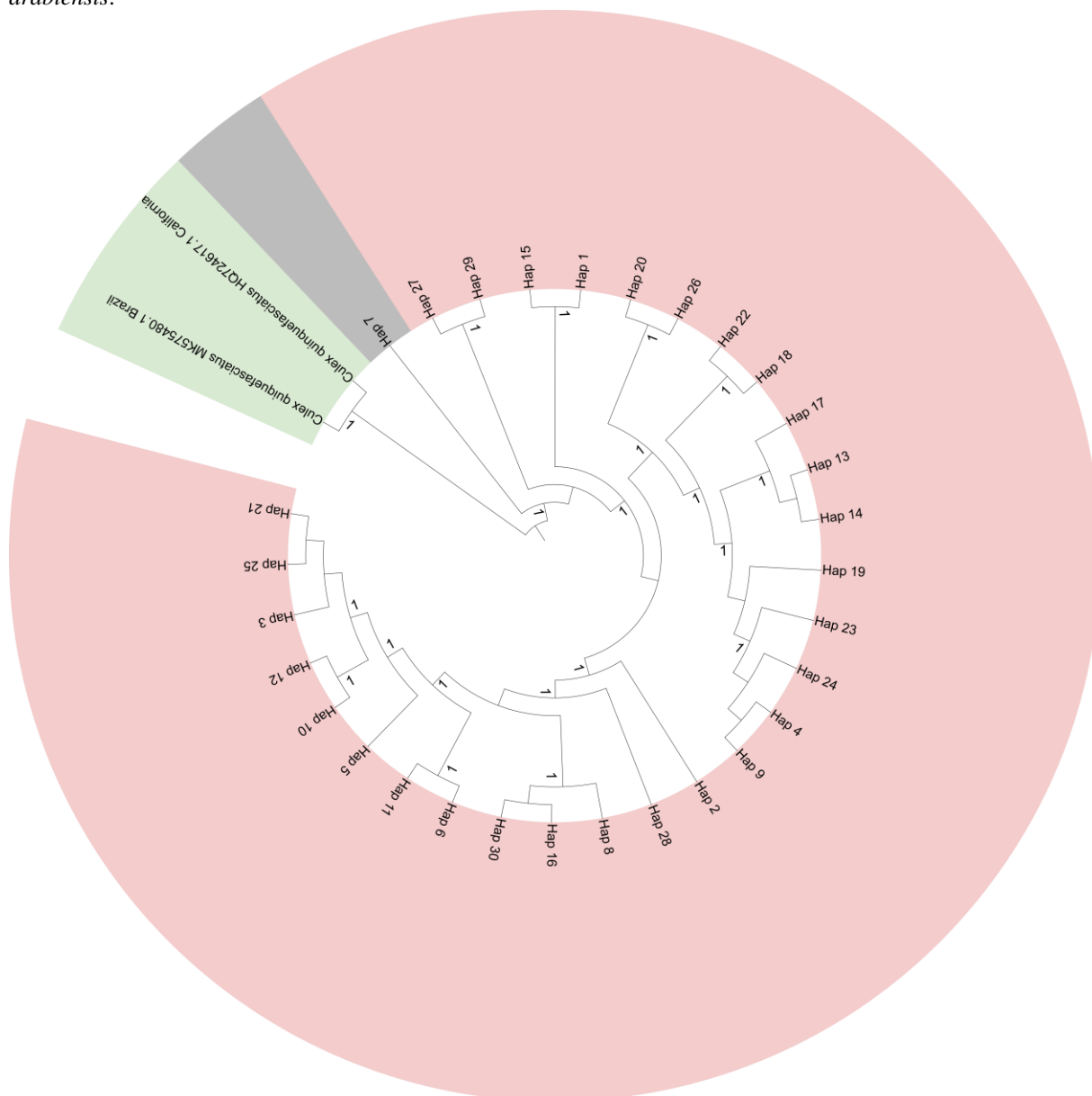
Fonte: Adaptado da ferramenta popART, versão 1.7.

Tabela 30 - Frequência haplotípica do gene *ND5* por populações de *Anopheles arabiensis* analisadas.

Haplótipos	Cabo Verde (46)	Sudão (10)	Malawi (10)	Etiópia (7)	Senegal (10)	África do Sul (3)	Quênia (9)	Total
H01	46	1	1	0	0	0	0	48
H02	0	1	0	0	0	0	0	1
H03	0	2	2	0	0	1	0	5
H04	0	1	0	1	1	0	0	3
H05	0	1	1	0	0	0	0	2
H06	0	1	0	0	1	0	0	2
H07	0	1	0	0	1	0	0	2
H08	0	1	0	1	0	0	0	2
H09	0	1	0	0	0	0	0	1
H10	0	0	2	0	0	0	2	4
H11	0	0	1	0	0	1	0	2
H12	0	0	1	0	0	0	1	2
H13	0	0	1	1	1	0	0	3
H14	0	0	1	0	0	0	0	1
H15	0	0	0	1	0	0	0	1
H16	0	0	0	1	0	0	0	1
H17	0	0	0	1	0	0	1	2
H18	0	0	0	1	0	0	0	1
H19	0	0	0	0	1	0	0	1
H20	0	0	0	0	1	0	0	1
H21	0	0	0	0	1	0	0	1
H22	0	0	0	0	1	0	0	1
H23	0	0	0	0	1	0	0	1
H24	0	0	0	0	1	0	0	1
H25	0	0	0	0	0	1	0	1
H26	0	0	0	0	0	0	1	1
H27	0	0	0	0	0	0	1	1
H28	0	0	0	0	0	0	1	1
H29	0	0	0	0	0	0	1	1
H30	0	0	0	0	0	0	1	1

Fonte: o autor.

Figura 40 – Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *ND5* de diferentes populações de *Anopheles arabiensis*.



Fonte: o autor.

Legenda: Destaque em cinza, haplótipo ancestral encontrado no Sudão e Senegal; destaque em verde, grupo externo; Destaque em rosa, grupo de *Anopheles arabiensis* obtidos no GenBank. Hap 1, haplótipo encontrado nas populações de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde, Sudão e Malawi. A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi o HKY85 +I. A análise envolveu 30 haplótipos com um total de 665 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

Quanto a diferenciação genética, os valores de F_{st} (com base em 1000 permutações) variaram de 0,52296 a 0,95529, com p significativo ($P < 0,01$) quando a população de *Anopheles arabiensis* coletada em Cabo Verde foi comparada com as outras seis populações dos outros países analisados nesse estudo. O nível mais alto de diferenciação genética observado foi entre as populações de Cabo Verde e África do Sul ($F_{st} = 0,95529$; $P < 0,01$). Assim como nas análises do gene *COI*, uma comparação entre as populações dos outros países mostraram, de forma geral, baixo a moderado nível de diferenciação genética entre si (variação: -0,00630 a 0,11427; $P > 0,05$), com exceção da comparação entre SN e AS que apresentaram grande diferenciação genética (Tabela 31). Em relação ao número de migrantes por gerações, as análises revelaram valores baixos quando a população de Cabo Verde foi comparada com os demais países (variação Nm : 0,02340 a 0,45609), confirmando baixo fluxo gênico e moderada diversidade genética entre população de Cabo Verde e as populações dos outros países (Tabela 31). Para esse gene, O teste de Mantel mostrou uma correlação muito fraca, mas estatisticamente significativa, entre a distância genética e a distância geográfica das populações de *Anopheles arabiensis* consideradas nesta análise ($r = 0,326$, $r^2 = 0.106478$, $p = 0,001$).

Tabela 31 - Diferenciação genética (F_{st} , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (Nm acima da diagonal) entre as populações de *Anopheles arabiensis* baseado no gene *ND5*.

	CV	SD	MW	ET	SN	AS	QN
CV	-	0,45609	0,23275	0,31016	0,37226	0,02340	0,37317
SD	0,52296**	-	26,62162	∞	10,13636	9,76608	∞
MW	0,68236**	0,01844	-	5,00184	3,87543	44,34211	∞
ET	0,61716**	-0,00237	0,09088	-	∞	3,65328	56,88608
SN	0,57322**	0,04701	0,11427*	-0,00630	-	1,81223	6,90476
AS	0,95529**	0,04870	0,01115	0,12039	0,21624*	-	23,46429
QN	0,57263**	-0,02623	-0,01821	0,00871	0,06752	0,02086	-

Fonte: o autor.

Legenda: CV, Cabo Verde; SD, Sudão; MW, Malawi; ET, Etiópia; SN, Senegal; AS, África do Sul; QN, Quênia; ∞ , infinito; *, significativo ($p < 0,05$); ** significativo ($p < 0,01$).

8.4.2 Caracterização genética da população de *Anopheles* coletados no município do Conde-PB

A caracterização genética dos genes *COI* e *ND5* foi realizada apenas com as três espécies consideradas potenciais vetoras na região extra-amazônica: *Anopheles argyritarsis*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* s.l. Essas espécies de *Anopheles* foram coletadas nas diferentes áreas de coletas do município do Conde, com exceção da área A, na qual nenhuma espécie de *Anopheles* foi coletada durante o período de coleta (Figura 21). O número de sequências consideradas nas análises variou de acordo com o número de indivíduos coletados por espécies.

Para a espécie *Anopheles argyritarsis*, um total de 18 sequências do gene *COI* foi considerado para análise. Destes, seis sequências correspondem a indivíduos coletados na área B e o restante está distribuído nas áreas C (n=4), D (n= 1) e F (n=7). A análise de polimorfismos revelou um total de 17 sítios polimórficos de 642 sítios analisados. Destes, quatro sítios foram identificados como informativos (147, 573, 630, 638) (Apêndice I). Além disso, foram encontrados nove haplótipos, uma diversidade haplotípica de 0,797 e uma diversidade nucleotídica de 0,00396, sendo a área F a localidade de coleta com maior diversidade ($h = 5$, $hd = 0,90476$). Os testes de neutralidades revelaram valores de Tajima's D negativo (-1.86534) com p estatístico significativo ($P < 0,05$) e Fu and Li's D* negativo (-2.28576), porém não significativo ($0,10 > P > 0,05$) (Tabela 32). Do total de haplótipos gerados, o haplótipo Hap_1 (n=8 sequências) foi encontrado em maior frequência, estando presente em todas as quatro áreas analisadas. O haplótipo ancestral (Hap_3) foi encontrado exclusivamente na área F. Esta área apresentou o maior número de haplótipos do total identificado (5/9) (Figura 41, Figura 42, Figura 43 e Tabela 33).

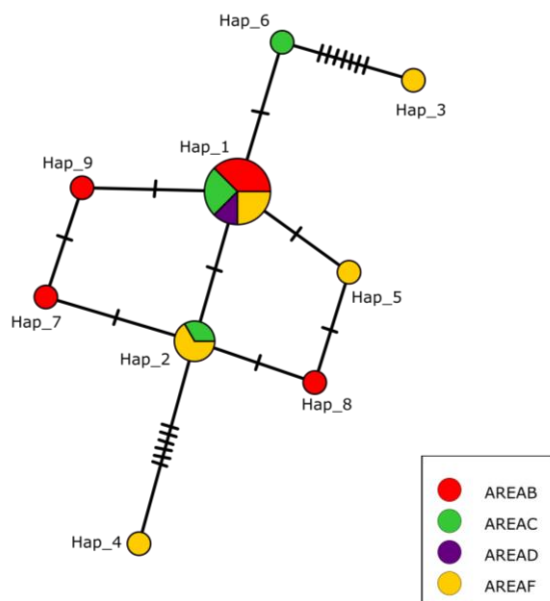
Tabela 32 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *COI* de *Anopheles argyritarsis* coletados no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	n	s	h	hd	π	K	D	D*
Área B	6	3	4	0,80000	0,00218	1,40000	0,33839 ns	0,51052 ns
Área C	4	2	3	0,83333	0,00156	1,00000	- 0,7099 ns	- 0,7099 ns
Área D	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área F	7	16	5	0,90476	0,00757	4,85714	- 1,42195 ns	- 1,55437 ns
Total	18	17	9	0,7970	0,00396	2,542	- 1,86534*	- 2,28576 ns

Fonte: o autor.

Legenda: *, significativo ($p < 0,05$); nd, não determinado; ns, não significativo ($p > 0,05$). Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji

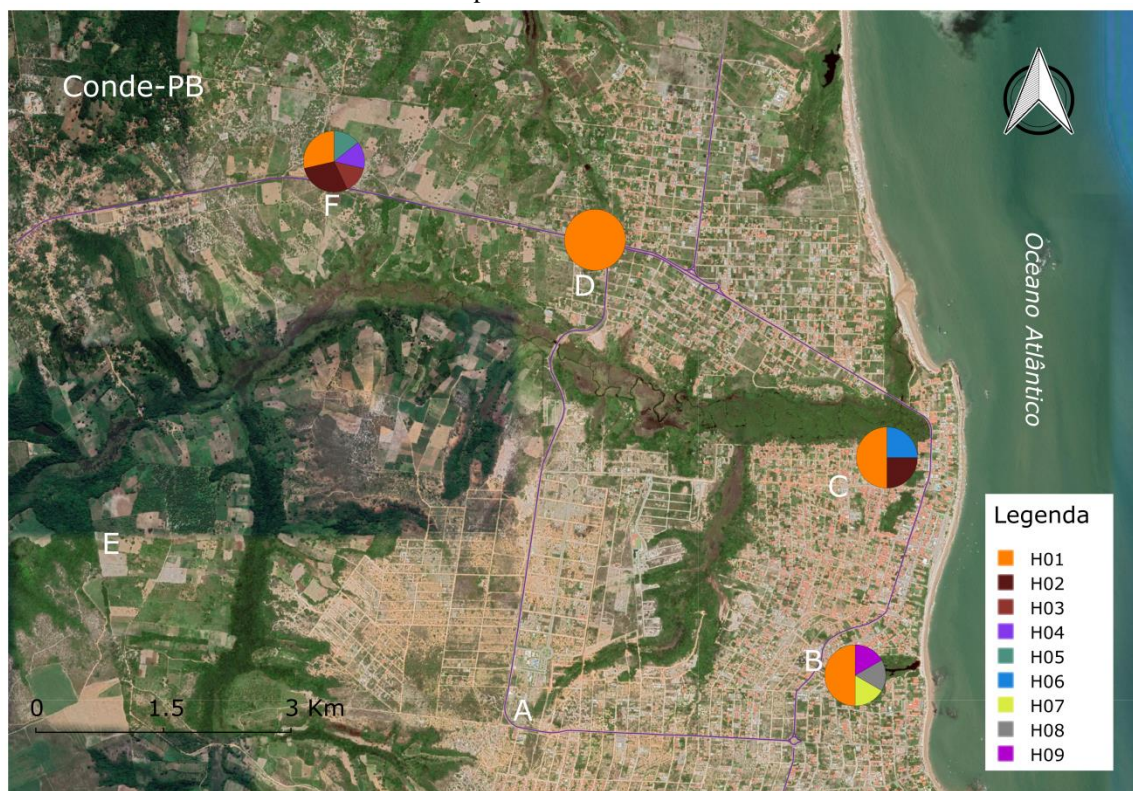
Figura 41 - Rede de haplótipos do gene *COI* (642 pb) da população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carabipus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

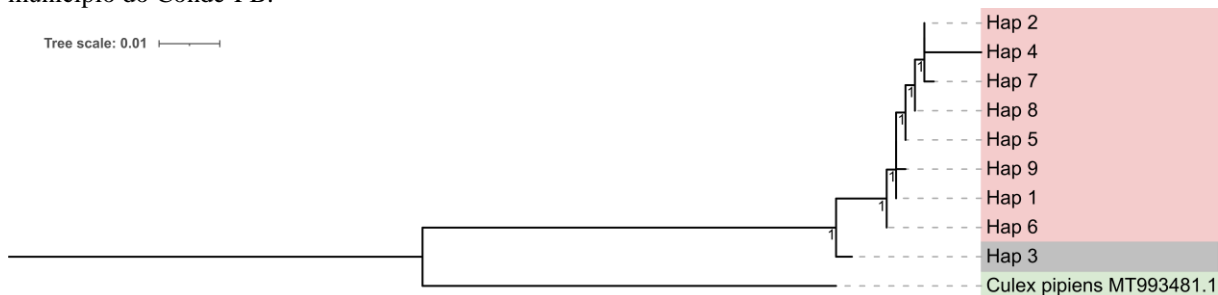
Figura 42 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carabipus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Guruji.

Figura 43 - Filograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada no município do Conde-PB.



Fonte: o autor.

Legenda: Destaque em cinza, haplótipo ancestral encontrado na área F; destaque em verde, grupo externo; A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi GTR + G. A análise envolveu 9 haplótipos com um total de 642 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

Tabela 33 - Frequência haplotípica do gene *COI* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área D (1)	Área F (7)	Área C (4)	Área B (6)	Total
H01	1	2	2	3	8
H02	0	2	1	0	3
H03	0	1	0	0	1
H04	0	1	0	0	1
H05	0	1	0	0	1
H06	0	0	1	0	1
H07	0	0	0	1	1
H08	0	0	0	1	1
H09	0	0	0	1	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carabipus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

A comparação entre as áreas nas quais foram coletadas *Anopheles argyritarsis* resultou em baixos valores de *Fst* (variação: - 1,0000 a - 0,03205), indicando baixa diferenciação genética entre si. Por outro lado, foi verificado valores altos de *Nm*, confirmando o alto fluxo gênico entre indivíduos coletados nas diferentes áreas consideradas para análise (Tabela 34).

Tabela 34 - Diferenciação genética (F_{st} , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (Nm acima da diagonal), do gene *COI*, entre *Anopheles argyritarsis* coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área D	Área F	Área C	Área B
Área D	-	∞	∞	∞
Área F	- 0,88889	-	∞	∞
Área C	- 1,00000	- 0,11643	-	∞
Área B	- 0,68000	- 0,03205	- 0,04348	-

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito.

A amplificação do gene *ND5*, por PCR, dos 18 indivíduos de *Anopheles argyritarsis* coletados no município do Conde resultou em um fragmento de 407 pb após o sequenciamento. A análise de polimorfismos revelou a presença de um sítio segregante (A137G), com baixa diversidade nucleotídica (0,00027) e haplotípica (0,111), sendo a área F a localidade de coleta com maior diversidade ($h = 2$, $hd = 0,285$). Os testes de neutralidade revelaram valores de Tajima's D e de Fu and Li's D^* negativos, ambos com p estatístico não significativo ($P > 0,05$) (Tabela 35). Além disso, foram observados dois haplótipos: o Hap_1 foi o mais frequente, tendo sido encontrado em todas as 4 áreas positivas para *An. argyritarsis*, com exceção da área B (Carapibus). Por outro lado, o Hap_2 se mostrou presente apenas na área F (Bairro de Guruji) (Figura 44, Figura 45 e Tabela 36).

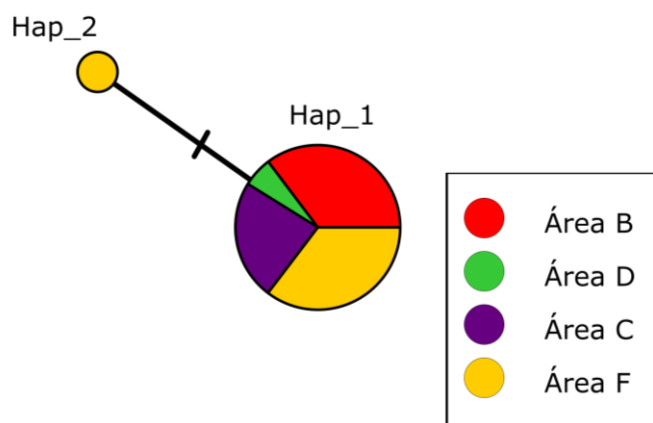
Tabela 35 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *ND5* de *Anopheles argyritarsis* coletadas no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	n	s	h	hd	π	K	D	D^*
Área B	6	0	1	0,000	0,0000	0,0000	nd	nd
Área C	4	0	1	0,000	0,0000	0,0000	nd	nd
Área D	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área F	7	1	2	0,28571	0,0007	0,28571	- 1,00623 ns	- 1,04881 ns
Total	18	1	2	0,111	0,00027	0,111	- 1,49949 ns	- 1,61172 ns

Fonte: o autor.

Legenda: nd, não determinado; ns, não significativo ($p > 0,05$). Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji

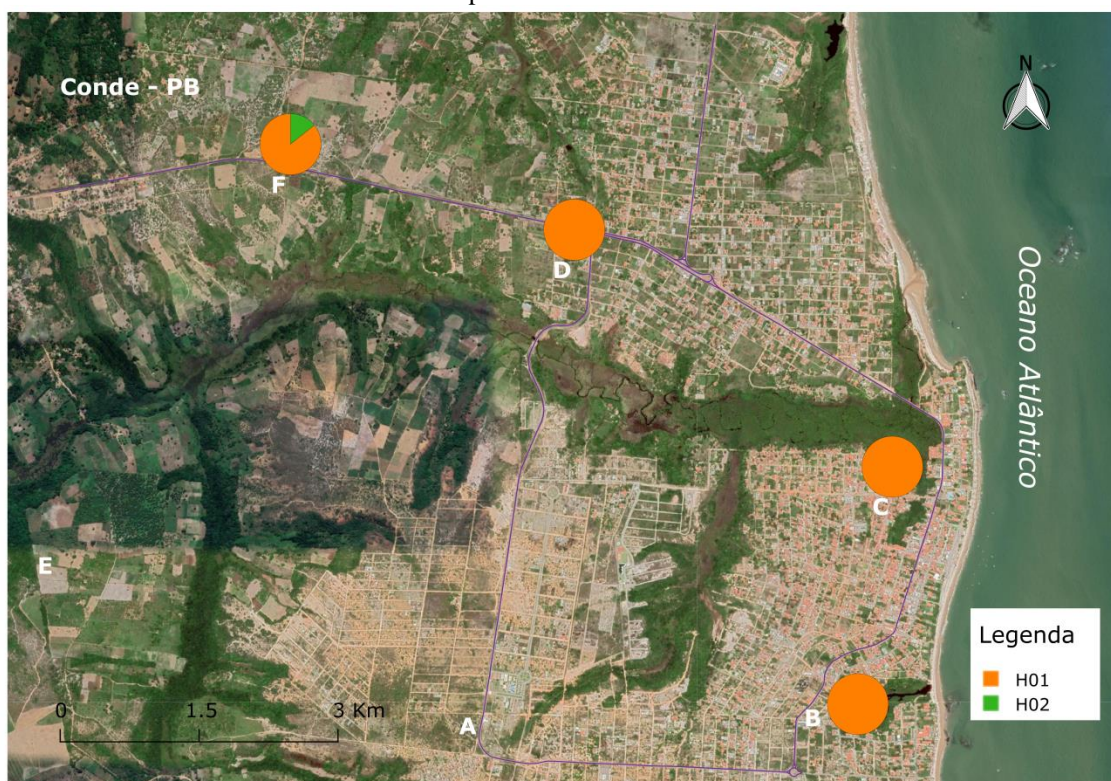
Figura 44 - Rede de haplótipos do gene *ND5* (407 pb) da população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 45 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Guruji.

Tabela 36 - Frequência haplotípica do gene *ND5* da população de *Anopheles argyritarsis* coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área B (6)	Área D (1)	Área C (4)	Área F (7)	Total
H01	6	1	4	6	17
H02	0	0	0	1	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

Assim como no gene *COI*, a análise de diferenciação genética do gene *ND5* entre indivíduos coletados nas diferentes áreas do município do Conde resultou em baixos valores de *Fst* (variação: - 0,02439 a 0,0) e consequentemente altos valores de *Nm*, confirmando a baixa diferenciação genética e o alto fluxo gênico entre as áreas nas quais foram coletadas *An. argyritarsis* (Tabela 37).

Tabela 37 - Diferenciação genética (*Fst*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal), do gene *ND5*, entre *Anopheles argyritarsis* coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área B	Área D	Área C	Área F
Área B	-	∞	∞	∞
Área D	0.00000	-	∞	∞
Área C	0.00000	0.00000	-	∞
Área F	- 0,02439	- 1,00000	- 0.09804	-

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito

Para a espécie *Anopheles aquasalis*, um total de 40 sequências (636 pb) do gene *COI* foram utilizadas para análise, correspondentes a indivíduos coletados nas áreas B (n = 12), C (n = 4), D (n = 11) e F (n = 13). A análise de polimorfismos revelou um total de 20 sítios polimórficos. Destes, 5 sítios foram identificados como informativos (5, 75 120, 237, 423 e 435) (Apêndice J). As análises revelaram um total de 15 haplótipos, uma diversidade nucleotídica de 0,00294 e uma diversidade haplotípica de 0,85128. A área com maior diversidade genética foi a área B ($h = 7$, $hd = 0,84615$) seguida da área F ($h = 7$, $hd = 0,87879$). Além disso, os testes de neutralidades resultaram em valores de Tajima's D e D* negativos e significantes ($P < 0,05$) (Tabela 38). Quanto à distribuição dos haplótipos, verificou-se que os haplótipos 1, 2 e 3 foram os mais frequentes (n = 6, 10 e 11 respectivamente). Este último foi o mais disperso, estando presente em todas as quatro áreas analisadas. O hap_11 (haplótipo ancestral), assim como os hap_12 a 15 foram encontrados exclusivamente na área F (Guruji). Além disso, os haplótipos 4 a 6 foram encontrados na área D (Vila Jacumã) e os haplótipos 7 a 10 foram encontrados na área B (Carapibus) (Figura 46, Figura 47, Figura 48, Tabela 39).

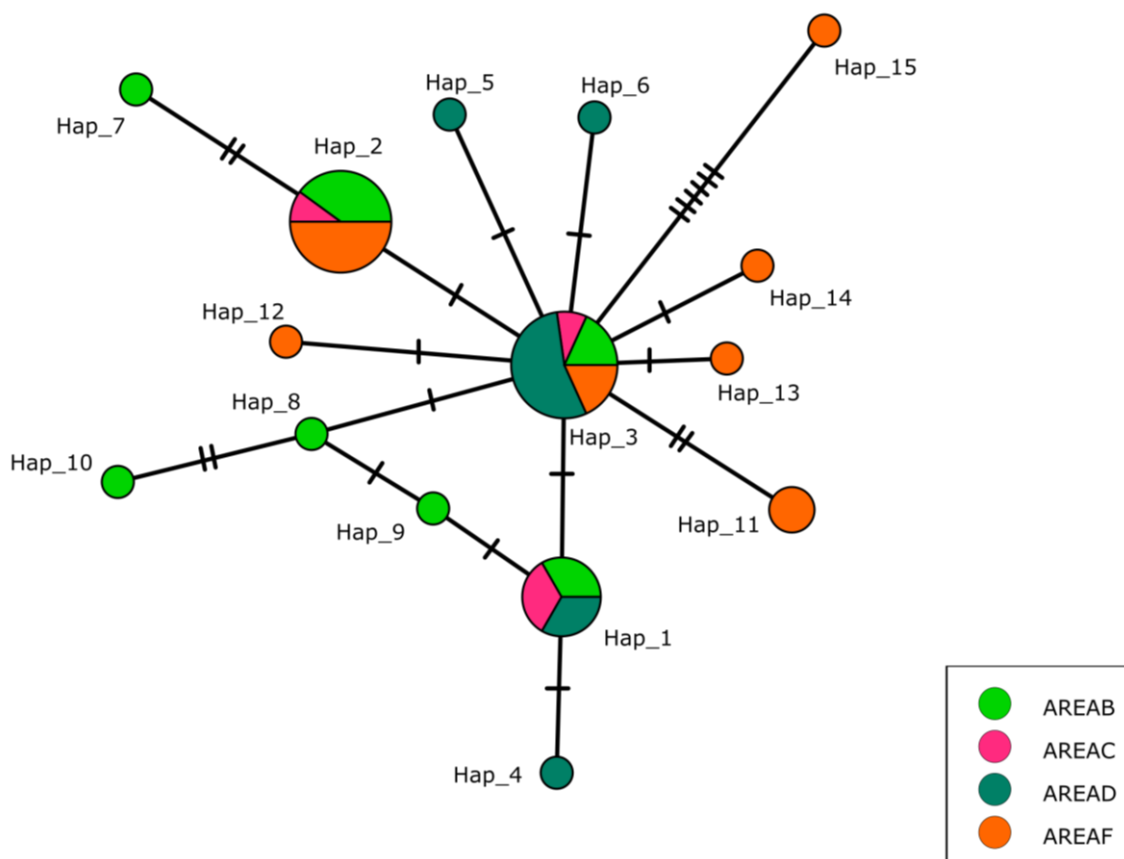
Tabela 38 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *COI* de *Anopheles aquasalis* coletadas no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>hd</i>	π	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>D</i> *
Área B	12	7	7	0,87879	0,87879	2,01515	- 0,51124 ns	- 0,78603 ns
Área C	4	2	3	0,83333	0,00183	1,16667	0,59158 ns	0,59158 ns
Área D	11	4	5	0,70909	0,00154	0,98182	- 1,02918 ns	- 1,21104 ns
Área F	13	12	7	0,84615	0,00387	2,46154	- 1,48390 ns	- 1,68235 ns
Total	40	20	15	0,85128	0,00294	1,86923	- 1,99258*	- 3,50843**

Fonte: o autor.

Legenda: *, significante ($p < 0,05$); **, significante ($p < 0,02$); ns, não significante ($p > 0,05$). Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

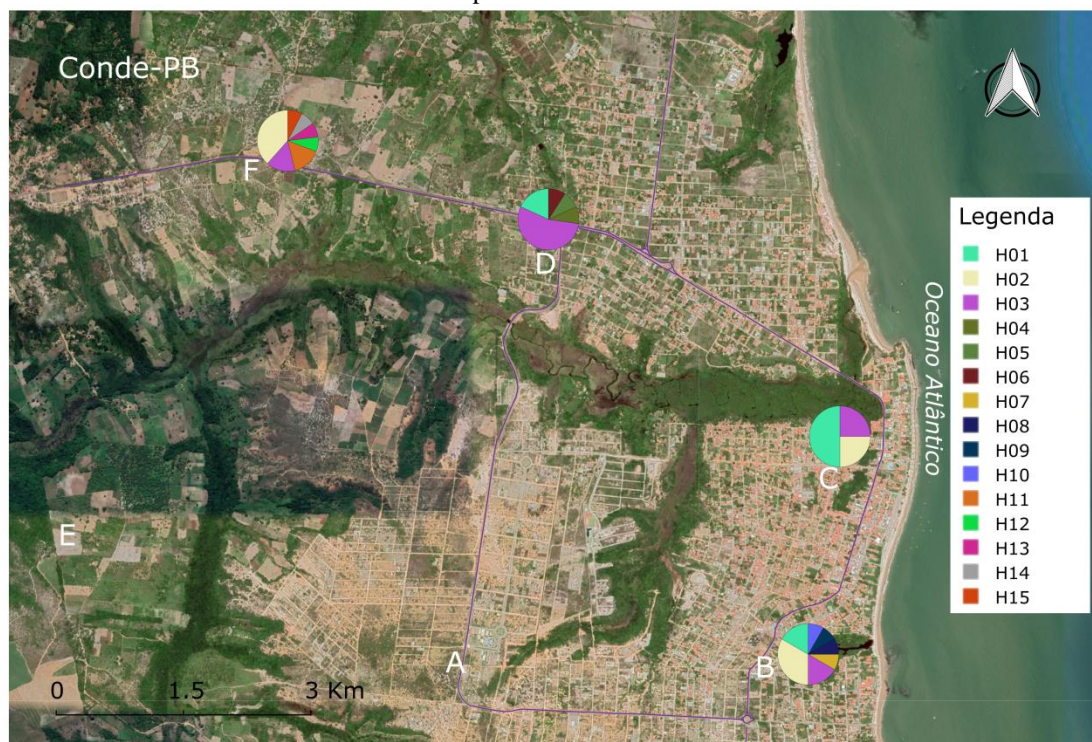
Figura 46 - Rede de haplótipos do gene *COI* (636 pb) da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 47 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Guruji.

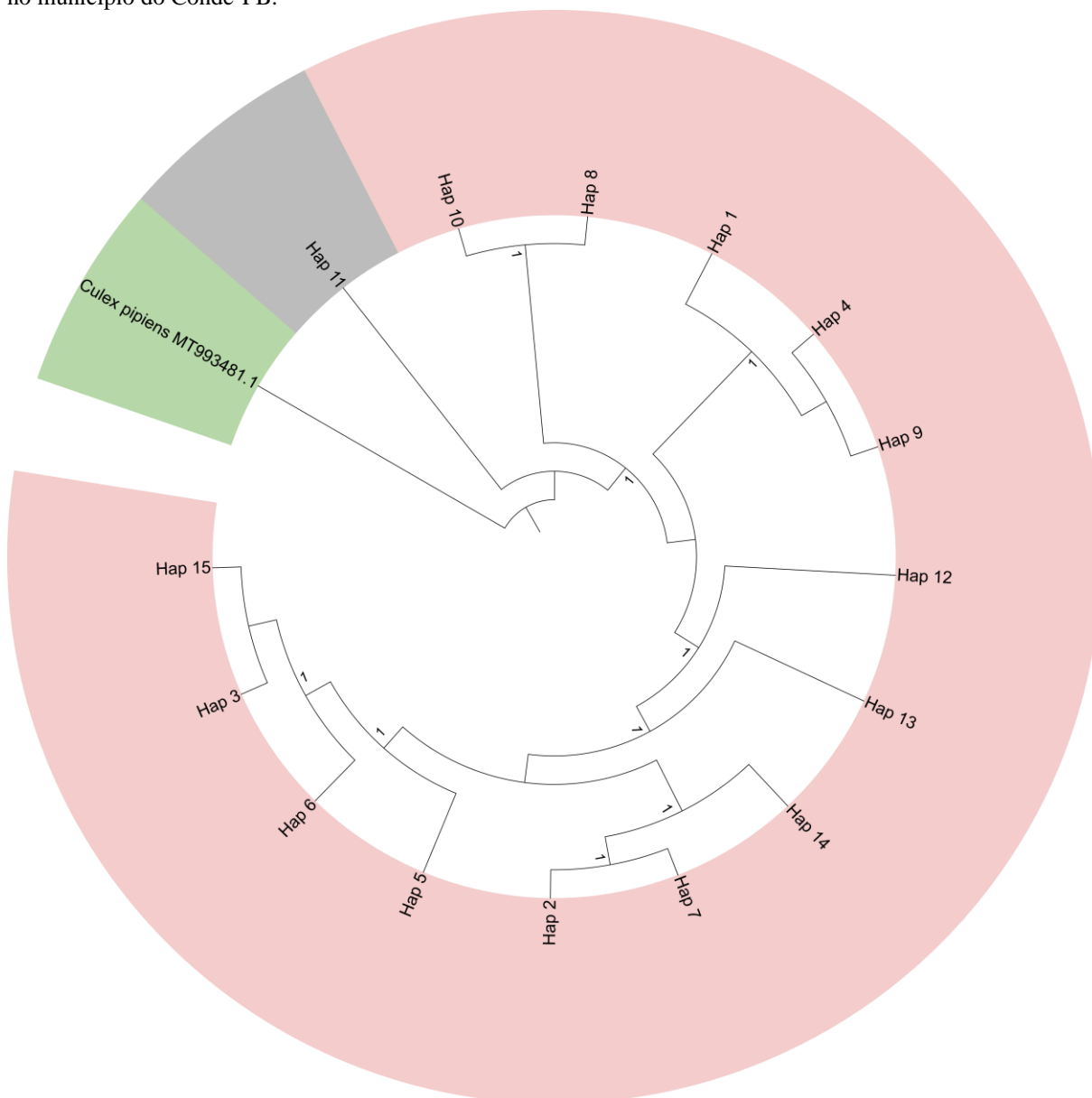
Tabela 39 - Frequência haplotípica do gene *COI* da população de *Anopheles aquasalis* coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área C (4)	Área D (11)	Área B (12)	Área F (13)	Total
H01	2	2	2	0	6
H02	1	0	4	5	10
H03	1	6	2	2	11
H04	0	1	0	0	1
H05	0	1	0	0	1
H06	0	1	0	0	1
H07	0	0	1	0	1
H08	0	0	1	0	1
H09	0	0	1	0	1
H10	0	0	1	0	1
H11	0	0	0	2	2
H12	0	0	0	1	1
H13	0	0	0	1	1
H14	0	0	0	1	1
H15	0	0	0	1	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

Figura 48 - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles aquasalis* coletada no município do Conde-PB.



Fonte: o autor.

Legenda: Destaque em cinza, haplótipo ancestral encontrado na área F; destaque em verde, grupo externo; A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi GTR + G. A análise envolveu 15 haplótipos com um total de 636 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

A comparação entre as áreas nas quais foram coletados espécimes de *Anopheles aquasalis*, resultou em baixos valores de *Fst* (variação: -0,03608 a 0,0994) e altos valores de *Nm*, confirmando assim a baixa diferenciação genética e um alto fluxo gênico entre os indivíduos, com exceção da comparação da área D com as áreas B e F que apresentam moderada diferenciação genética (Tabela 40).

Tabela 40 - Diferenciação genética (F_{st} , abaixo da diagonal) e fluxo gênico (Nm acima da diagonal), do gene *COI*, entre *Anopheles aquasalis* coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área C	Área D	Área B	Área F
Área C	-	∞	∞	∞
Área D	- 0,03608	-	4,86592	4,52727
Área B	- 0,07317	0,09318*	-	23,11684
Área F	0,00392	0,09946*	0,02117	-

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito.

A análise de polimorfismos do gene *ND5* para os 40 espécimes de *Anopheles aquasalis*, revelou a presença de dois sítios segregantes (T75C e G234A) dos 409 sítios analisados, todos considerados “singletons”, e três haplótipos. No geral, foi observada uma diversidade nucleotídica de 0,00024 e uma diversidade haplotípica de 0,09872. A área F apresentou maior diversidade genética ($h = 3$, $hd = 0,29487$) Ambos os testes de neutralidade, D e D^* , revelaram valores negativos com p estatístico não significativo (Tabela 41). Dos três haplótipos encontrados, o Hap_1 foi o mais frequente ($n = 38$) e está distribuído por todas as áreas nas quais foram coletadas *Anopheles aquasalis*. Por outro lado, os Hap_2 e 3 foram encontrados apenas na área F (Guruji) (Figura 49, Figura 50, Tabela 42).

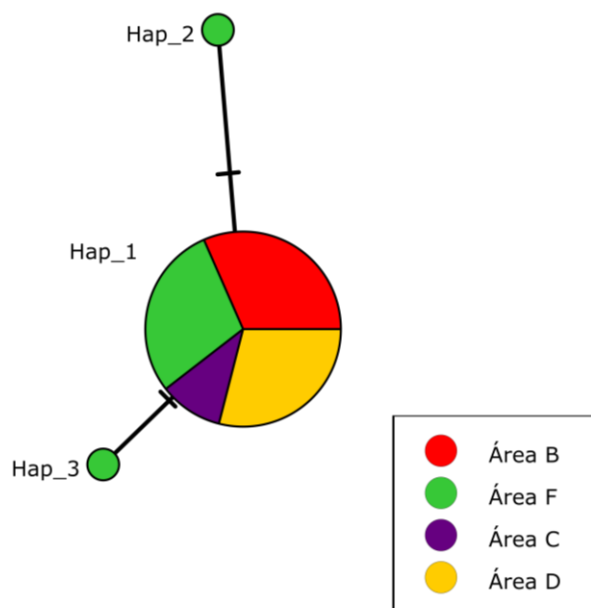
Tabela 41 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *ND5* de *Anopheles aquasalis* coletadas no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	n	s	h	hd	π	K	D	D^*
Área C	4	0	1	0,000	0,0000	0,0000	nd	nd
Área D	11	0	1	0,000	0,0000	0,0000	nd	nd
Área B	12	0	1	0,000	0,0000	0,0000	nd	nd
Área F	13	2	3	0,29487	0,00075	0,30769	- 1,46801ns	- 1,77640 ns
Total	40	2	3	0,09872	0,00024	0,1000	- 1,48662 ns	- 2,42724 ns

Fonte: o autor.

Legenda: ns, não significativo ($p > 0,05$). Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

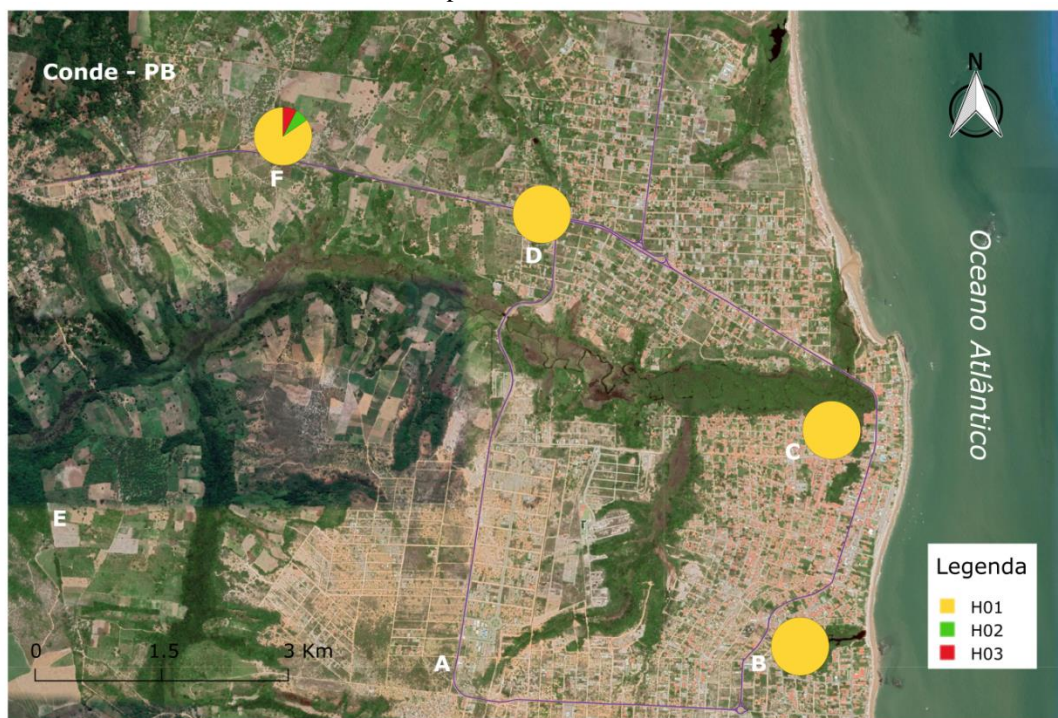
Figura 49 - Rede de haplótipos do gene *ND5* (409pb) da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji; O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 50 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles aquasalis* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Guruji

Tabela 42 - Frequência haplotípica do gene *ND5* da população de *Anopheles aquasalis* coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área B (12)	Área F (13)	Área C (4)	Área D (11)	Total
H01	12	11	4	11	38
H02	0	1	0	0	1
H03	0	1	0	0	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

A análise da diferenciação genética para o gene *ND5* revelou baixos valores de *Fst* e altos valores de *Nm*, quando foram comparadas as diferentes áreas nas quais espécies de *Anopheles aquasalis* foram coletadas, resultando também em uma baixa diferenciação genética e alto fluxo gênico (Tabela 43).

Tabela 43 - Diferenciação genética (*Fst*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal), do gene *ND5*, entre *Anopheles aquasalis* coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área B	Área F	Área C	Área D
Área B	-	∞	∞	∞
Área F	- 0,00645	-	∞	∞
Área C	0,00000	- 0,13043	-	∞
Área D	0,00000	- 0,01359	0,00000	-

Fonte: o autor.

Legenda: Área B, Carapibus; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito.

Em relação à população de *Anopheles albitarsis* s.l, um total de 30 sequências do gene *COI*, com um tamanho de 668 pb foi analisado, proveniente de 4 áreas de coletas: área C (n = 1), D (N = 11), E (N = 9) e F (N = 9). A análise de polimorfismos revelou um total de 29 sítios segregantes. Destes, 11 sítios foram identificados como informativos (1, 2, 3, 97, 126, 153, 426, 444 519, 642, e 65) (Apêndice K). Além disso, foram observados 24 haplótipos, uma diversidade nucleotídica de 0,00733 e uma diversidade haplotípica de 0,9770. A área D apresentou maior diversidade genética ($h = 10$, $hd = 0,98182$). Os testes de neutralidades resultaram em valores de Tajima's D negativo não significativo (-1,42969; $P > 0,10$), e D^* negativos estatisticamente significativo (-2,63978; $P < 0,05$) (Tabela 44). Dos haplótipos encontrados no município do Conde, os Hap_3 e 6 foram os mais frequentes. O Hap_3 foi encontrado nas áreas E e F, enquanto o Hap_6 foi encontrado nas áreas E e D. o Hap_21, considerado o haplótipo mais ancestral para o conjunto de sequências analisadas, foi registrado apenas na área D (Vila Jacumã) (Figura 51, Figura 52, Figura 53 e Tabela 45).

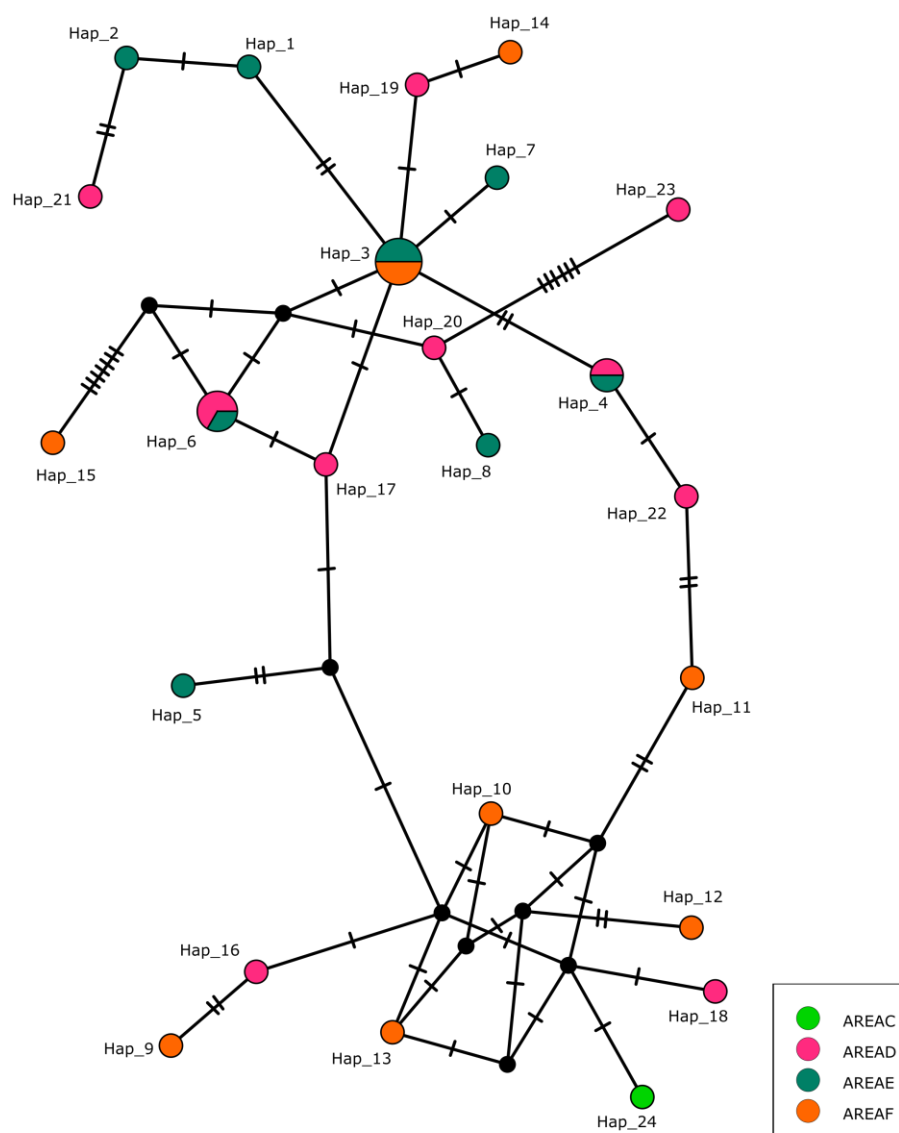
Tabela 44 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *COI* de *Anopheles albitarsis s.l* coletados no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	n	s	h	hd	π	K	D	D^*
Área C	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área D	11	16	10	0,98182	0,00713	4,76364	-0,57038 ns	-0,50439 ns
Área E	9	11	8	0,97222	0,00516	3,44444	-0,70006 ns	-0,14617 ns
Área F	9	11	8	0,97222	0,00923	6,16667	-0,99563 ns	-1,14070 ns
Total	30	29	24	0,9770	0,00733	4,89409	-1,42969 ns	-2,63978*

Fonte: o autor.

Legenda: *, significativo ($p < 0,05$); ns, não significativo ($p > 0,05$). Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji

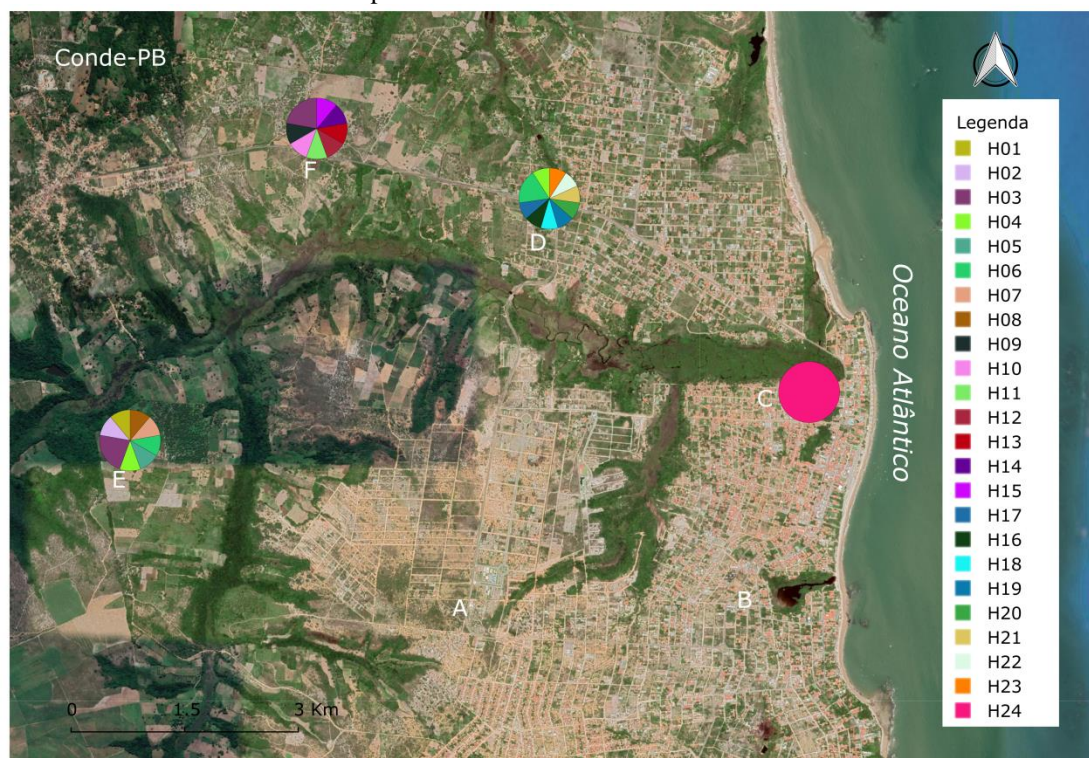
Figura 51 - Rede de haplótipos do gene *COI* (668 pb) da população de *Anopheles albitarsis s.l* coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área D, Vila Jacumã; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área F, Guruji; Área E, Baraúna. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo.

Figura 52 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles albitarsis* s.l coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Gurugi.

Tabela 45 - Frequência haplotípica do gene *COI* da população de *Anopheles albitarsis* s.l coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área E (9)	Área F (9)	Área D (11)	Área C (1)	Total
H01	1	0	0	0	1
H02	1	0	0	0	1
H03	2	2	0	0	4
H04	1	0	1	0	2
H05	1	0	0	0	1
H06	1	0	2	0	3
H07	1	0	0	0	1
H08	1	0	0	0	1
H09	0	1	0	0	1
H10	0	1	0	0	1
H11	0	1	0	0	1
H12	0	1	0	0	1
H13	0	1	0	0	1
H14	0	1	0	0	1
H15	0	1	0	0	1
H16	0	0	1	0	1
H17	0	0	1	0	1
H18	0	0	1	0	1

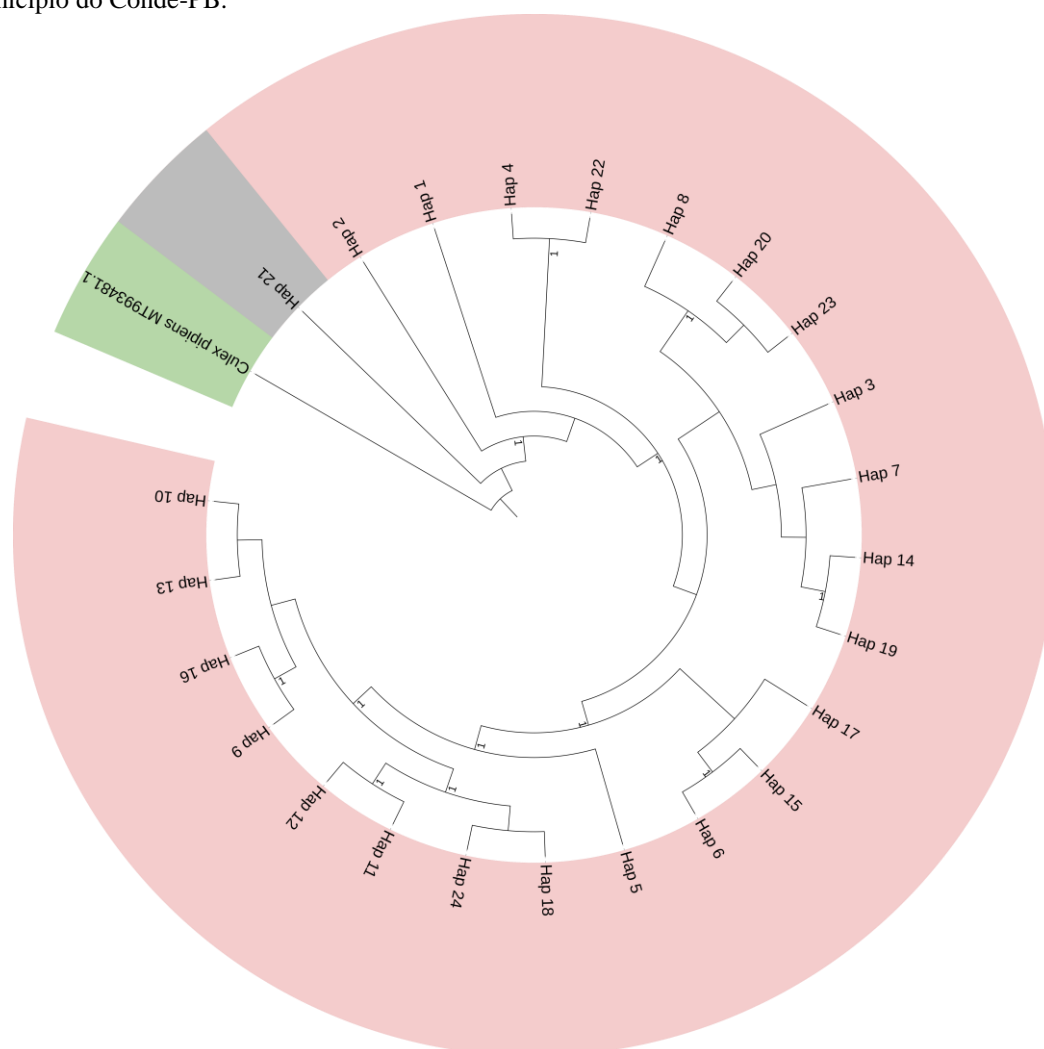
(continuação)

Haplótipos	Área E (9)	Área F (9)	Área D (11)	Área C (1)	Total
H19	0	0	1	0	1
H20	0	0	1	0	1
H21	0	0	1	0	1
H22	0	0	1	0	1
H23	0	0	1	0	1
H24	0	0	0	1	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

Figura 53 - Dendrograma baseado nos haplótipos do gene *COI* da população de *Anopheles albicans s.l* coletada no município do Conde-PB.



Fonte: o autor.

Legenda: Destaque em cinza, haplótipo ancestral encontrado na área D; destaque em verde, grupo externo; A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi HKY85 +G+I. A análise envolveu 15 haplótipos com um total de 668 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

Quanto a diferenciação genética, para esse gene, foi observado baixos valores de *Fst* (variação: - 0,29070 a 0,09655) quando comparado as diferentes áreas de coleta. Por outro lado, as análises para verificar o número de migrantes revelaram moderado a altos valores de *Nm*, confirmando o alto fluxo gênico e a baixa diferenciação genética entre indivíduos das diferentes áreas analisadas (Tabela 46).

Tabela 46 - Diferenciação genética (*Fst*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal), do gene *COI*, entre *Anopheles albitarsis* s.l coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área E	Área F	Área D	Área C
Área E	-	6,76957	∞	1,40909
Área F	0,06878	-	10,48590	∞
Área D	- 0,02910	0,04551	-	4,67857
Área C	0,26190	- 0,29070	0,09655	-

Fonte: o autor.

Legenda: Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito.

A análise de polimorfismos no gene *ND5* para essa mesma população, revelou a presença de 1,20% de sítios segregantes (5/415 posições nucleotídicas). Destes, três foram descritos como sítios informativos (135, 225 e 229) e dois como “Singletons” (69 e 105) (Apêndice L). Além disso, foram observados cinco haplótipos, uma diversidade nucleotídica de 0,00152 e um diversidade haplotípica de 0,4050. Para esse gene, a área F apresentou maior diversidade genética ($h = 4$, $hd = 0,58333$). Ambos os testes de neutralidade (D e D*) resultaram em valores negativos não significativos (Tabela 47). Dos 5 haplótipos encontrados, o Hap_1 foi o mais comum, com ocorrência em todas as quatro áreas nas quais foram coletadas *Anopheles albitarsis* s.l. O Hap_4, haplótipo ancestral, foi encontrado exclusivamente na área F (Guruji) (Figura 54, Figura 55, Figura 56, Tabela 48).

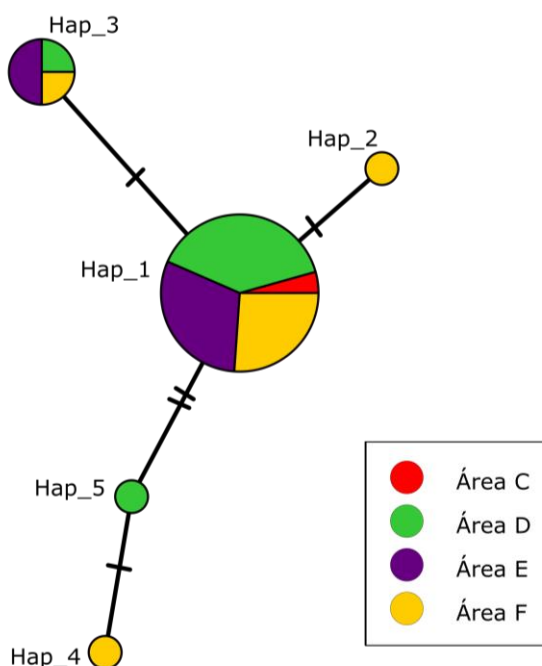
Tabela 47 - Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene *ND5* de *Anopheles albitarsis* s.l coletadas no município do Conde-PB.

Populações	Parâmetros genéticos e testes de neutralidades							
	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>hd</i>	π	<i>K</i>	<i>D</i>	<i>D*</i>
Área C	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área D	11	3	3	0,34545	0,00131	0,54545	- 1,59996 ns	- 1,87398 ns
Área E	9	1	2	0,38889	0,00094	0,38889	0,15647 ns	0,8404 ns
Área F	9	5	4	0,58333	0,00268	1,11111	- 1,67754 ns	- 1,88124 ns
Total	30	5	5	0,4050	0,00152	0,63000	- 1,36660 ns	- 0,60837 ns

Fonte: o autor.

Legenda: ns, não significativa ($p > 0,05$). Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

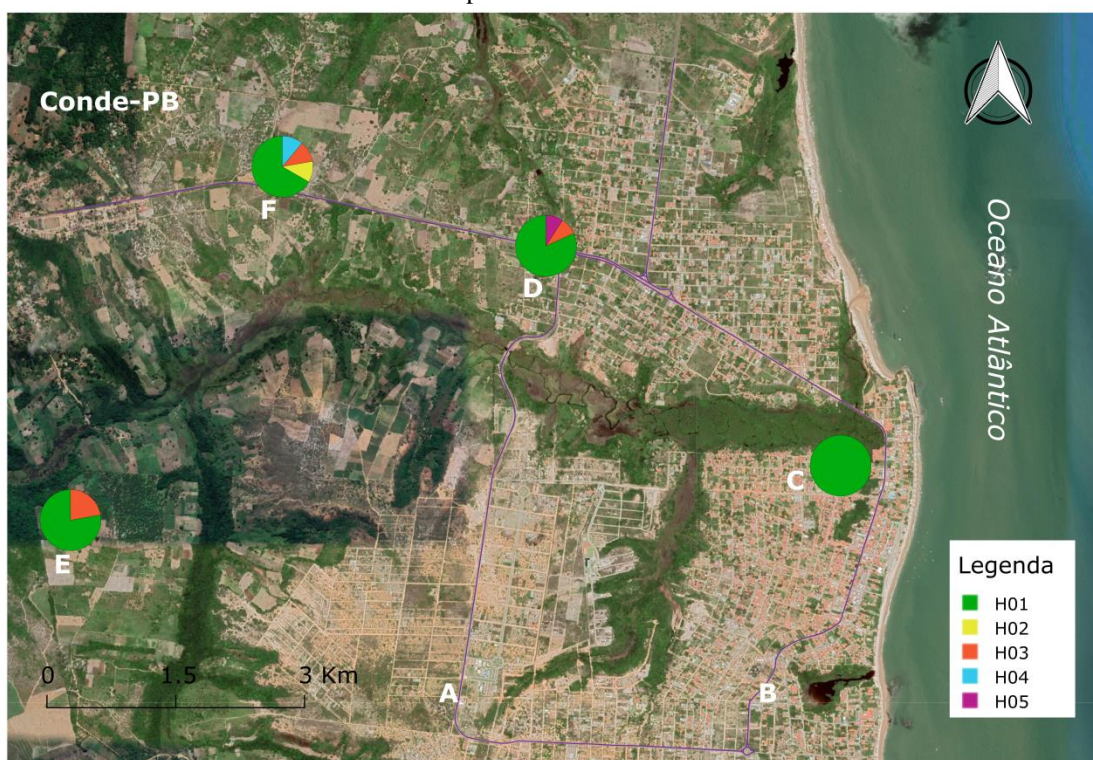
Figura 54 - Rede de haplótipos do gene *ND5* (415 pb) da população de *Anopheles albitalarsis* s.l coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: o autor.

Legenda: Área D, Vila Jacumã; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área F, Guruji; Área E, Baraúna. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo

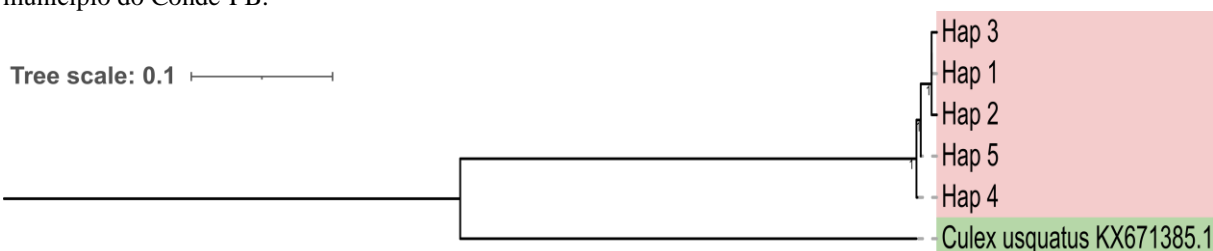
Figura 55 - Mapa representando a distribuição dos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles albitalarsis* s.l coletada em diferentes áreas do município do Conde-PB no ano de 2019.



Fonte: editado no QGis (2021).

Legenda: A, Capadócia; B, Carapibus; C, Conjunto Rio do Ouro; D, Vila de Jacumã; E, Baraúna; F, Guruji.

Figura 56 - Filograma baseado nos haplótipos do gene *ND5* da população de *Anopheles albitarsis* s.l coletada no município do Conde-PB.



Fonte: o autor.

Legenda: Hap 4, haplótipo ancestral; destaque em verde, grupo externo; A árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion). Para o suporte dos ramos, foi usado o modelo de ALRT SH-like. O melhor modelo automático retornado pela plataforma foi GTR + I. A análise envolveu 5 haplótipos com um total de 415 posições nucleotídicas no grupo final de dados.

Tabela 48 - Frequência haplotípica do gene *ND5* da população de *Anopheles albitarsis* s.l coletada no município do Conde-PB.

Haplótipos	Área F (9)	Área E (9)	Área D (11)	Área C (1)	Total
H01	6	7	9	1	23
H02	1	0	0	0	1
H03	1	2	1	0	4
H04	1	0	0	0	1
H05	0	0	1	0	1

Fonte: o autor.

Legenda: Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.

Quanto a comparação da diferenciação genética e fluxo gênico da população de *Anopheles albitarsis* s.l por área de coleta, as análises resultaram em baixos valores de *Fst* e consequentemente altos valores de *Nm*, confirmando assim uma baixa diferenciação genética e alto fluxo gênico entre as áreas analisadas (Tabela 49).

Tabela 49 - Diferenciação genética (*Fst*, abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm* acima da diagonal), do gene *ND5*, entre *Anopheles albitarsis* s.l coletados em diferentes áreas do município do Conde-PB.

	Área F	Área E	Área D	Área C
Área F		∞	∞	∞
Área E	- 0,02966		∞	∞
Área D	- 0,07352	- 0,03097		∞
Área C	- 1,00000	- 0,75000	- 1,00000	

Fonte: o autor.

Legenda: Área E, Baraúna; Área C, Conjunto Rio do Ouro; Área D, Vila Jacumã; Área F, Guruji.; ∞ , infinito.

9 DISCUSSÃO

Numa perspectiva global a malária ainda é um sério problema de saúde pública. Vários esforços têm sido realizados ao longo dos anos, na tentativa de mitigar os problemas socioeconômicos relacionados à doença, principalmente em países mais afetados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). Neste estudo, foi realizada a vigilância entomológica e molecular de anofelinos de duas regiões com perfis de transmissão da malária e controle vetorial diferentes - Cidade da Praia (Cabo Verde) e município do Conde-PB (Brasil).

A identificação dos anofelinos em Cabo Verde resultou em 100% de *An. arabiensis* do total de espécimes analisados. É importante destacar que a coleta foi realizada em apenas dois bairros da cidade da Praia. Esse resultado corrobora estudos anteriores (ALVES et al., 2006; CAMBOURNAC; PETRARCA; COLUZZI, 1982; DA CRUZ et al., 2019; RIBEIRO et al., 1980) e, principalmente o estudo mais recente de atualização da fauna de mosquitos de Cabo Verde (Leal et al. 2021). Nesse último, os autores registraram *Anopheles arabiensis* em quatro das nove ilhas amostradas no país, confirmando que *Anopheles arabiensis* é, provavelmente, a única espécie, transmissora de *Plasmodium*, pertencente ao complexo *Anopheles gambiae* presente no arquipélago atualmente. A presença potencialmente exclusiva desta espécie em Cabo Verde pode ser explicada pelo clima árido do país, uma vez que entre os membros do complexo *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis* é o que melhor se adapta a ambientes áridos (COETZEE et al., 2013). A vigilância entomológica e consequente atualização da carta anofélica em Cabo Verde deve continuar sendo realizada, periodicamente, uma vez que o arquipélago constitui uma importante rota comercial e turística, fazendo ligações com vários países da África nos quais outros membros do complexo *Anopheles gambiae* são consideradas vetores da malária. Esta condição pode contribuir para introdução de outras espécies do complexo, principalmente de *Anopheles gambiae* s.s que, apesar de ser encontrado em áreas florestais úmidas, também se adapta a ambientes áridos (HUESTIS; LEHMANN, 2014; ONYABE; CONN, 2001).

Os resultados relacionados à coleta de mosquitos no município do Conde-PB, região situada ao sul do estado da Paraíba, Brasil, demonstram uma vasta circulação de espécies de *Anopheles* em todas as áreas de coleta. Neste estudo foram registradas nove espécies de *Anopheles* no município. Destas, sete já tinham sido reportadas anteriormente (CARLOS et al., 2019), das quais três - *Anopheles aquasalis*, *An. argyritarsis* e *An. albitarsis* s.l - são

consideradas potenciais vetores da malária no estado (PARAÍBA, 2019). As espécies *An. sawyeri* e *An. oswaldoi* estão sendo relatadas no estado da Paraíba pela primeira vez, no entanto, outros exemplares destas espécies devem ser capturados para fins de confirmação por taxonomia clássica e molecular.

De forma geral, os anofelinos foram coletados, na sua maioria, em ambientes extra e peridomiciliar, em áreas mais preservadas, com maior cobertura vegetal, um pouco distante do aglomerado urbano, evidenciando o hábito exofílico e possivelmente baixo grau de antropofilia das espécies coletadas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Além disso, as três espécies consideradas potenciais vetores da malária - *An. aquasalis*, *An. argyritaris* e *An. albitarsis* s.l – também foram encontradas em áreas urbanas, ao longo de um corredor ecológico, próximo a manguezais, ao longo dos rios locais (ver figura 29). Apesar de uma ampla cobertura espacial para coleta de anofelinos, a área A (Capadócia) foi a única na qual não foram encontradas espécies de *Anopheles*. Segundo dados já publicados por nosso grupo (GOMES et al., 2020), esta foi a área em que o primeiro caso da malária e uma recidiva foram registrados durante o surto da doença ocorrido no município em 2019. Ainda segundo os mesmos autores, a ausência de anofelinos nesta área pode estar associada à aridez da área e à distância de possíveis criadouros, sugerindo que indivíduos com malária, residentes nesta área, tenham sido infectados em outra localidade do município.

De todos os métodos de captura de mosquitos usados para a coleta no município do Conde, as armadilhas de CDC luminosa e BG-Sentinel com gelo seco tiveram o melhor desempenho. Embora a alta eficiência da armadilha BG-Sentinel já tenha sido comprovada, a CDC luminosa sem iscas (ex: CO₂, gelo seco) geralmente não mostra bons resultados quando comparada com outros métodos de coleta para captura de anofelinos adultos (CANSADO-UTRILLA et al., 2020; HIWAT et al., 2011; HIWAT; BRETAS, 2011; LIMA et al., 2014; SRIWICHAI et al., 2015; ZAIM et al., 1986). Apesar disso, neste estudo a CDC luminosa se mostrou eficiente, fazendo dela uma ferramenta extremamente útil para a captura de anofelinos na região. A coleta por busca ativa com capturador de Castro em áreas peri e extradomiciliares foi o único método capaz de coletar todas as espécies encontradas no município, demonstrando tanto a eficiência desse método de captura quanto o comportamento exofílico desses mosquitos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A baixa eficiência da armadilha de Shannon na coleta de mosquitos adultos, neste estudo, deve-se ao fato deste modelo de armadilha ter sido utilizado, apenas, duas vezes ao longo do período de coleta. Apesar disso, a alta eficiência dessa armadilha é amplamente comprovada como um método alternativo para

captura de anofelinos (JACOBINA et al., 2020; LIMA et al., 2014; MISSAWA et al., 2011; REIS et al., 2018).

Em relação a detecção de infecção natural por *Plasmodium* nos anofelinos coletados no município do Conde, os resultados apontam para a ausência do parasita, independentemente da secção (cabeça/tórax ou abdómen) do mosquito adulto analisada. Este achado pode ser explicado pela amostragem baixa e/ou baixa incidência de casos durante o surto localizado da doença. Outros estudos, de detecção de *Plasmodium* spp., também detectaram uma taxa de infecção natural baixa (variação de 0,6% a 8%) em anofelinos coletados no estado do Maranhão, outra região do Brasil (BARROS et al., 2020; FIGUEIREDO et al., 2017). Vale destacar que, além do nosso estudo, não existe nenhum estudo sobre a infecção natural por *Plasmodium* nas espécies de *Anopheles*, no estado da Paraíba.

Apesar da taxa de infectividade ser considerada zero nas amostras coletadas, os achados do nosso estudo sugerem que as espécies *An. aquasalis*, *An. argyritarsis* e *An. albitarsis* s.l são os prováveis vetores responsáveis pela situação epidemiológica registrada no município em 2019, uma vez que a maioria dos casos da malária também ocorreu ao longo do mesmo corredor ecológico no qual essas três espécies foram coletadas em altas densidades, constituindo uma área de risco para a ocorrência da doença (GOMES et al., 2020). Este ambiente pode estar diretamente associado aos hábitos exofílicos dessas potenciais espécies vetoradas encontradas no município do Conde. Conforme descrito anteriormente, *Anopheles aquasalis*, por exemplo, é uma espécie que se reproduz preferencialmente em poças de água parada e salobra que ocorrem em áreas litorâneas, principalmente no Nordeste do Brasil. Apesar da espécie apresentar comportamento zoofílico e exofílico, na ausência de animais e em alta densidade, o mosquito também se alimenta de sangue humano, apresentando assim um certo grau de antropofilia (CARLOS et al., 2019; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FIGUEIREDO et al., 2017). Possivelmente esse padrão de comportamento diversificado está ligada à ocorrência dos casos durante o surto da malária no município do Conde. Essa peculiaridade é também observada em outros anofelinos, incluindo os mosquitos do complexo *An. albitarsis*, que, além de ser encontrado em planícies e baixadas, exibe um pico de alimentação sanguínea em humanos no início da noite no peridomicílio e repousando no extradomicílio (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A análise molecular para a detecção de mutações associada a resistência a inseticidas químicos tanto na população de *Anopheles* coletada em Cabo Verde como para os três potenciais vetores da malária coletados no município do Conde revelou a ausência das mutações pontuais nos genes *ace-1* (G119S) e *GSTE2* (L119F). Esses resultados sugerem uma

não seleção desses alelos que afetam a funcionalidade da *ace-1* e *GSTE2*, respectivamente, mas não descarta a possibilidade de perda de suscetibilidade pela alteração de outros sistemas de desintoxicação, como a família da monooxigenase, esterases ou outras enzimas da família Glutathione S- Transferases (NAMOUNTOUGOU et al., 2012; OLÉ SAGBA et al., 2017; OWUOR et al., 2021; SAFI et al., 2017), principalmente em Cabo Verde onde o uso de inseticidas químicos, das classes dos organofosforados e piretróides, é histórico. No caso do município do Conde, esses resultados se justificam uma vez que o controle vetorial, a base de inseticidas químicos, é realizado de forma emergencial, apenas em situações de surtos de doenças vetoriais que ocorrem na região (PARAÍBA, 2020).

Por outro lado, duas mutações pontuais no gene *Na_v* de *An. arabiensis* coletada em Cabo Verde foram observadas neste estudo. Esses resultados demonstram, pela primeira vez, a presença do alelo 1014F (*kdr-west*) na população de *An. arabiensis*. Embora os períodos de amostragem e locais sejam diferentes daqueles no estudo de da Cruz et al. (2019), esses dados também mostram que a frequência do alelo 1014S (*kdr-east*) aumentou, de 0,073 em da Cruz et al. (2019) nas amostras coletadas em Cabo Verde em 2015, para 0,15 (presente estudo). Esse achado mostra que este alelo está sendo selecionado gradativamente. As mutações *kdr-west* e *kdr-east* têm sido encontradas em vários países do continente africano, (BADOLO et al., 2012; CHOUAÏBOU et al., 2017; DABIRÉ et al., 2014; DJÈGBÈ et al., 2018; KABULA et al., 2014; KAWADA et al., 2011b; KWIATKOWSKA et al., 2013; MATHIAS et al., 2011; OCHOMO et al., 2015; THIAW et al., 2018; VERHAEGHEN et al., 2006; YEWHALAW et al., 2010). Esta distribuição indica uma disseminação desses dois alelos em todo o continente como consequência do fluxo gênico entre as diferentes populações de *Anopheles* (NDIATH et al., 2015).

No presente estudo, ambas as mutações foram encontradas nos dois locais de coleta (AGT e Várzea) em Cabo Verde, indicando que estas mutações podem estar bem distribuídas na cidade da Praia, onde o controle de vetores através do uso de compostos químicos é mais frequente. No entanto, uma coleta mais ampla deve ser realizada em outros bairros da cidade para melhor estimar a frequência desses alelos e sua distribuição geográfica. Conforme mencionado por da Cruz et al. (2019), é possível que a alta frequência dos alelos seja associada ao uso frequente de piretróides em certos locais. Segundo a OMS, Cabo Verde foi um dos países africanos com maior cobertura por LLINs e IRS nos programas de controle da malária em 2019 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020), o que reforça a ideia de que o aumento da frequência alélica esteja associado ao uso frequente de piretróides uma vez que esses inseticidas são os mais usados nos dois métodos de controle supracitados. Mais

recentemente, a resistência ao temephos foi relatada em populações selvagens de *An. arabiensis* na cidade da Praia (PIRES et al., 2020), coletadas na mesma época e nos mesmos locais, o que sugere uma possível pressão seletiva para a resistência aos inseticidas devido ao seu maior uso. Infelizmente, em Cabo Verde, atualmente não existe nenhum dado público sobre o uso de piretróides por localidade para permitir qualquer estimativa de uma possível associação entre o uso de compostos químicos na cidade e dados de resistência relatados.

Mutações *kdr* encontradas no nosso estudo podem estar associadas a resistência à deltametrina 0,05% relatada por DePina et al. (2018b) na população de *An. arabiensis* da cidade da Praia. Essas amostras foram coletadas durante o mesmo período em que nossas amostras foram coletadas. Os resultados sugerem que o vetor está se adaptando aos inseticidas usados no programa de controle de vetores local. A presença dessas mutações representa uma ameaça ao controle do vetor em Cabo Verde, uma vez que os LLINs, medida recentemente implementada pelo Ministério da Saúde, contém deltametrina, o que pode contribuir para o aumento da resistência aos piretróides em populações de *Anopheles* selvagens. Mutações associadas a resistência à inseticidas químicos, no gene *Nav*, também foram relatadas em *Aedes aegypti*, vetor da dengue em Cabo Verde (AYRES et al., 2020), evidenciando a adaptação desses dois vetores ao controle vetorial integrado usado em Cabo Verde.

Apesar da cidade da Praia (Cabo Verde) e o município do Conde (Brasil) serem duas regiões com perfis epidemiológicos de transmissão da malária e com abordagens de controle diferentes, torna-se importante o monitoramento periódico dos genes associados a resistência nessas duas regiões uma vez que, o diagnóstico precoce da resistência pode subsidiar a tomada de decisões em programas de controle local.

Conforme mencionado anteriormente, o uso de genes mitocondriais têm constituído um importante marcador molecular em estudos evolutivos de anofelinos (BUNMEE et al., 2021). Em relação a análise dos genes *COI* e *ND5* da população de *An. arabiensis* coletada em apenas duas localidades da cidade da Praia, em Cabo Verde, foi observada uma baixa diversidade genética para o gene *COI* e ausência de polimorfismos genéticos para o gene *ND5*. Ambos os testes de neutralidade não foram significativos para o gene *COI*, sugerindo que a população esteja evoluindo de forma neutra (equilíbrio entre a ocorrência de mutações e deriva genética) (TAJIMA, 1989). Os testes de neutralidade não foram calculados para o gene *ND5* devido a ausência de polimorfismos nas sequências analisadas. No entanto, uma amostragem mais ampla, compreendendo um maior número de localidades, deve ser realizada para melhor avaliar o “*background*” genético e investigar a possível relação entre o uso de inseticidas (considerando diferentes momentos de intervenção) sob a redução da variabilidade

genética nesta espécie. Outros estudos têm demonstrado essa relação. Por exemplo, na Tailândia, a variabilidade genética das populações de *Aedes aegypti* têm sido influenciada pelo controle intenso de vetores à base de inseticidas (WEERARATNE et al., 2018). É importante destacar que este é o primeiro estudo sobre a variabilidade genética em *An. arabiensis* realizado em Cabo Verde. Apesar disso, outros estudos envolvendo outros vetores no país têm sido realizados, demonstrando também uma baixa diversidade genética das populações analisadas (CAMPOS et al., 2020; GONÇALVES, 2016; SALGUEIRO et al., 2019).

A análise global do gene *COI*, apesar da baixa diversidade genética observada em Cabo Verde, revelou moderada a alta diversidade genética para alguns países do continente africano (Zâmbia, Malawi e Etiópia) bem como também para a Arábia Saudita, país situado no médio oriente. O mesmo padrão genético foi observado na análise do gene *ND5* quando Cabo Verde foi comparado com outros países do continente africano. A baixa diversidade observada em Cabo Verde pode estar relacionada a uma coleta não representativa da cidade da Praia ou também pelo fato de haver poucas introduções de mosquitos, por ser um arquipélago. Outros fatores a serem considerados seriam: a introdução recente da população na região uma vez que frequentemente, as introduções começam com uma população com diversidade genética relativamente pequena, e a variação é adquirida ao longo do tempo por meio de mutação espontânea ou fluxo gênico (CAMPOS et al., 2021; CARTER et al., 2021); contração populacional (TAJIMA, 1989). No entanto, essa última hipótese só seria aceita caso os testes de neutralidades tivessem sido positivos e significativos. Neste estudo, de forma geral, os testes de neutralidade, realizados em ambos os genes mitocondriais, resultaram em valores positivos (para a população de *An. arabiensis* de Cabo Verde) e negativos (para as populações *An. arabiensis* dos outros países usadas nas análises), porém não significativos, sugerindo evolução neutra em todas as populações estudadas. Resultados similares foram encontrados em populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na Malásia (NAIM et al., 2020). Embora os nossos dados não sejam consistentes com a contração populacional para a população de Cabo Verde, é importante destacar que, provavelmente, o tamanho da amostra no nosso estudo não é suficiente para analisar a evolução demográfica da população de *Anopheles arabiensis* em Cabo Verde.

As análises filogenéticas e de redes de haplótipos revelaram haplótipos exclusivos de Cabo Verde para o gene *COI*, mas quando analisado o gene *ND5*, o haplótipo único encontrado em Cabo Verde também foi registrado em outros dois países no continente africano. Apesar disso, esses resultados demonstram, de forma geral, o isolamento genético

desta população de Cabo Verde das populações de *Anopheles arabiensis* dos demais países analisados nesse estudo, estando filogeneticamente mais próxima das populações da Etiópia, Malawi e Sudão. No entanto, a compreensão mais clara da relação evolutiva da população de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde com outras populações requer amostragem adicional e sequenciamento tanto de populações de *An. arabiensis* coletadas em Cabo Verde como de populações de *An. arabiensis* de países ou regiões que estão sub-representados em bancos de dados. Carter et al. (2021), no seu estudo de diversidade genética com *Anopheles stephensi* na Etiópia, baseado no gene *COI*, também levantaram essa necessidade de sequenciamento de populações em países sub representados em banco de dados para melhor entender essa relação evolutiva entre suas espécies.

A população de *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde foi diferente geneticamente, quando comparado com populações de *Anopheles arabiensis* do continente africano e do médio oriente, conforme revelado pelos altos valores de F_{st} para os genes *COI* e *ND5* respectivamente, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Este resultado é concordante com o baixo fluxo gênico, revelado através dos baixos valores de Nm , entre a população de Cabo Verde e os demais países analisados neste estudo. Por outro lado, os resultados demonstram que existe, no geral, moderado a alto fluxo gênico e baixa a moderada diferenciação genética para ambos os genes, quando os países no continente foram comparados. Cabo Verde é um arquipélago oceânico situado a aproximadamente 500 km do continente africano. Os nossos achados sugerem que essa barreira geográfica existente entre Cabo Verde e os demais países analisados seja um dos principais fatores limitantes ao fluxo gênico nesta espécie. Essa barreira física que separa Cabo Verde dos demais países pode não ser o único fator limitante ao fluxo gênico entre eles. Outros fatores climáticos, ambientais e biológicos também podem desempenhar um papel importante na limitação do fluxo gênico, como mostram outros estudos (KADDUMUKASA et al., 2020; MANIN; DRAKELEY; CHUA, 2018; MOTOKI et al., 2019; OGOLA et al., 2019; SARMA et al., 2016).

O teste de Mantel não revelou nenhuma correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações de *An. arabiensis* estudadas quando o gene *COI* foi analisado. Apesar disso, uma correlação positiva muito fraca foi observada quando o gene *ND5* foi analisado. Esses resultados diferentes de isolamento por distância, para esses dois genes, podem ser explicado pelo uso de grupos populacionais, na sua maioria, diferentes para ambos os genes. Além disso, os fragmentos de genes mitocondriais também apresentam taxas evolutivas diferentes (ZHANG; CHENG; GE, 2019). Sendo assim, para melhor elucidar as variações genéticas e as relações entre a distância genética e a distância geográfica entre essas

populações, uma análise do genoma mitocondrial completo seria necessária (CAMERON, 2014; MANIN; DRAKELEY; CHUA, 2018; HAO et al., 2017). Alguns estudos, também demonstraram a ausência de correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações de anofelinos analisadas com base no teste de Mantel (MAKHAWI et al., 2013; OGOLA et al., 2019; MANIN; DRAKELEY; CHUA, 2018; FENG et al., 2017). Por outro lado, existem estudos que mostram o contrário. Por exemplo, uma correlação fraca, mas significativa foi estabelecida entre distância genética e geográfica para a maioria das populações de *Anopheles funestus* no estudo realizado por Kaddumukasa et al. (2020) em cinco países do continente africano. Outro estudo usando o marcador *COI* e microssatélites também mostrou que a distância geográfica tem um efeito na variação da estrutura genética das populações de *An. culicifacies* de Sri Lanka (SURENDRAN et al., 2015).

A análise da variabilidade genética dos três potenciais vetores da malária (*An. aquasalis*, *An. argyritarsis* e *An. albitarsis s.l.*), coletados no município do Conde-PB, resultou em baixa diversidade genética em todas as áreas nas quais essas espécies foram coletadas, independentemente do gene mitocondrial analisado. Os resultados dos testes de neutralidades, sugerem que as espécies analisadas neste estudo estão evoluindo de forma neutra. A baixa diversidade observada pode estar relacionada ao baixo número amostral usada nas análises ou também ao tipo de nicho ecológico que essas espécies ocupam, e não por causa da pressão seletiva causada pelo uso de inseticidas químicos, uma vez que o controle vetorial é feito de forma irregular na região (DOS SANTOS et al., 2005). De forma geral, as comparações *par-a-par* (valores de *Fst*) e os valores de *Nm*, para os genes *COI* e *ND5* demonstraram que essas populações de *An. aquasalis*, *An. argyritarsis* e *An. albitarsis s.l.*, apresentam uma baixa diferenciação genética e alto fluxo gênico, resultando em baixa estruturação genética. Resultados similares foram encontrados em populações de *An. triannulatus s.l.* na Colômbia, com base na análise do gene *COI*, apesar de distâncias maiores entre os locais de coleta (ATENCIA-PINEDA et al., 2018). Outro estudo baseado na análise do gene *COI* também mostrou baixa diferenciação genética de *An. darlingi* na Amazônia Ocidental e Central do Brasil (PEDRO & SALLUM, 2009). No presente estudo, os resultados de diferenciação genética e fluxo gênico podem ser explicados pela curta distância geográfica existente entre as áreas de coleta no município do Conde (3 a 4 km). O município se caracteriza por ser uma região com uma área territorial relativamente pequena (172,744 km²) e com pouca ou nenhuma barreira geográfica entre as áreas de coleta. Portanto, se os locais de coleta estão próximos entre si, há uma probabilidade maior de ocorrência de fluxo gênico (MANTEL, 1967). O corredor ecológico, existente no município do Conde, não limitou o fluxo gênico

entre as áreas de coleta, demonstrando não ter efeito na variabilidade genética das populações de anofelinos analisados neste estudo. Weeraratne et al. (2018), no seu estudo, também relataram fluxo gênico entre as áreas de coleta de anofelinos e relacionaram esse resultado a ausência de barreiras geográficas, independente da distância geográfica, uma vez que a área territorial da região de estudo também era pequena. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado que as barreiras geográficas têm constituído o principal determinante na estrutura genética dos mosquitos em comparação com a distância geográfica (MA et al., 2011; MARKIANOS et al, 2016; OLANRATMANEE et al., 2013).

Os resultados encontrados no presente estudo fornecem dados importantes sobre os anofelinos coletados nas duas regiões de estudo (Praia – Cabo Verde e Município do Conde – Brasil). Por exemplo, é importante destacar que a presença dos dois alelos associados à resistência a inseticidas no canal de sódio de *Anopheles arabiensis* constituem um alerta para as autoridades competentes de Cabo Verde. Sendo assim, há necessidade de criar medidas para evitar a dispersão e a fixação desses alelos na população de mosquitos estudada, principalmente nas áreas alvos de maior controle vetorial a base de inseticidas químicos. Além disso, estratégias de vigilância dos potenciais vetores da malária no município do Conde devem ser levadas a cabo, a fim de reduzir as suas respectivas densidades populacionais na região. A curta distância entre os pontos de coleta no município do Conde, e conseqüentemente baixa diferenciação genética e alto fluxo gênico, sugerem que os potenciais vetores analisados neste estudo devem responder de forma semelhante às medidas de controle vetorial implementadas nessa região, apesar da irregularidade no uso de compostos químicos.

10 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que:

- A espécie *An. arabiensis* é, possivelmente, o único vetor da malária, pertencente ao complexo *Anopheles gambiae*, presente na cidade da Praia, Cabo Verde;
- Uma grande diversidade de anofelinos foi encontrada no município do Conde-PB; As espécies *An. sawyeri* e *An. oswaldoi* foram reportadas pela primeira vez no estado da Paraíba;
- *Anopheles aquasalis*, *Anopheles argyritarsis* e *Anopheles albitarsis s.l* são, possivelmente, os potenciais vetores responsáveis pelo surto da malária ocorrido no município do Conde, apesar da infecção natural não ter sido detectada em nenhuma espécie investigada naquele município;
- A ausência de mutações associadas à resistência a inseticidas nos genes *Nav*, *Ace-1* e *GSTE2* nas populações do município do Conde, sugere que o uso de inseticidas para o controle de vetores ocorre de forma descontinuada;
- A ausência de mutações nos genes *ace-1* e *GSTE2* na população de *An. arabiensis* coletada em Cabo Verde, indica que o uso de inseticidas pelos programas de controle não está exercendo uma pressão de seleção sobre os alelos associados à resistência nesses dois genes.
- O aumento na frequência do alelo *kdr* 1014S, comparado com achados anteriores, e a presença do alelo *kdr* 1014F na população de *An. arabiensis* de Cabo Verde apontam para a necessidade urgente de criar estratégias de vigilância para estabelecer novas abordagens no programa de controle vetorial no país;
- A análise de variabilidade genética revelou que *Anopheles arabiensis* de Cabo Verde é geneticamente distinta em comparação com populações dos demais países avaliados neste estudo; os valores de *Fst* e *Nm* evidenciam ausência de diferenciação genética das espécies de *Anopheles* (*An. aquasalis*, *An. argyritarsis* e *An. albitarsis s.l*) coletadas nas diferentes áreas no município do Conde-PB, devido à alta troca de migrantes.

11 RECOMENDAÇÕES

Diante dos resultados encontrados neste estudo, recomenda-se:

Coletas periódicas, a fim de atualizar a fauna anofélica das duas regiões de estudo, principalmente no município do Conde, e entender o papel das espécies de *Anopheles* identificadas na dinâmica de transmissão da malária na região. Além disso, é necessário entender a bioecologia desses mosquitos para adoção de medidas de controle adequadas e eficazes.

Apesar da baixa taxa de transmissão da malária nas duas regiões, deve-se fazer vigilância entomológica e molecular constante, com estratégias de diagnóstico de infecção por *Plasmodium spp.*

Um contínuo monitoramento dos genes associados à resistência aos inseticidas químicos, deve ser realizado em Cabo Verde onde o uso de inseticidas é mais frequente.

Realização periódica de bioensaios, recomendados pela OMS, para avaliar a suscetibilidade “*in vivo*” das populações de *Anopheles*, sabidamente transmissoras de *Plasmodium*, aos inseticidas químicos usados no controle vetorial em ambas as regiões.

Realização de estudos de diversidade genética para investigar a origem das populações de *Anopheles* analisadas neste estudo. Além disso, para obter uma melhor imagem da variação genética dessas populações, uma análise da sequência de DNA mitocondrial completa é necessária.

REFERÊNCIAS

- ABOUD, M. et al. A genotypically distinct, melanic variant of *Anopheles arabiensis* in Sudan is associated with arid environments. **Malaria Journal**, London, v. 13, n. 1, p. 492–502, 2014.
- AÏKPON, R. et al. Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, p. 568–575, 2014.
- AÏZOUN, N. et al. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 274, 2013.
- ALBUQUERQUE, L.; SANTOS, M. **História Geral de Cabo Verde: corpo documental**. 1. ed. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical - Direcção-Geral do Património Cultural de Cabo Verde, 1988.
- ALEMAYEHU, E. et al. Mapping insecticide resistance and characterization of resistance mechanisms in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Ethiopia. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 407–418, 2017.
- ALVES, J. et al. Epidemiological characterization of *Plasmodium falciparum* in the Republic of Cabo Verde: implications for potential large-scale re-emergence of malaria. **Malaria Journal**, London, v. 5, n. September, p. 32–40, 2006.
- ALVES, J. et al. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 307–312, dez. 2010.
- AREZ, A. P. et al. A clonal *Plasmodium falciparum* population in an isolated outbreak of malaria in the Republic of Cabo Verde. **Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 347–355, 1999.

ATENCIA-PINEDA, M.; TORO-CANTILLO, A.; HOYOS-LÓPEZ, R. Diversidad genética y estructura poblacional de *Anopheles triannulatus* s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región de código de barras de ADN. **Biomédica**, Bogotá, n. 38, v.1, p.117–126, 2018.

AVISE, J. C. Phylogeography: Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 3–15, 2009.

AWOLOLA, T. S. et al. Dynamics of knockdown pyrethroid insecticide resistance alleles in a field population of *Anopheles gambiae* s.s. in southwestern Nigeria. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 44, n. 3, p. 181–188, 2007.

AYRES, C. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871–875, 2002.

AYRES, C. et al. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n.5, p. e0008216, 2020.

BADOLO, A. et al. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: Resistance on the rise? **Malaria Journal**, London, v. 11, n. 1, p. 232–243, 2012.

BAFFOUR-AWUAH, S. et al. Insecticide resistance in malaria vectors in Kumasi, Ghana. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 633, 2016.

BAIA-DA-SILVA, D. C. et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 52, n. 1, p. e20180542, 2019.

BALALI-MOOD, M.; ABDOLLAHI, M. **Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds**. London: Springer-Verlag London, 2014.

BANDLET, H.-J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BARROS, E. **Plano de Ocupação de Terreno em Cabo Verde para Empreendimento Turístico**. Rio de Janeiro, 2011.

BARROS, V. et al. Study of behavioral patterns and infection analyses in anopheline species involved in the transmission of malaria in Buriticupu and São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. **EntomoBrasilis**, v.13, p. e0820, 2020.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and Their Control**. 2nd. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

BENCHIMOL, J. L.; DA SILVA, A. F. C. Railroads, disease, and tropical medicine in Brazil under the First Republic. **História, ciências, saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 719–62, 2008.

BOLETIM INFORMATIVO [MINISTÉRIO DA SAÚDE DE CABO VERDE]. Praia: Serviço de Vigilância Integrada e Resposta a Epidemias, p. 8, 2017. Disponível em: <<http://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentosite/paludismo/449-boletim-informativo-evolucao-dos-casos-do-paludismo-ate-12-de-novembro-2017/file>>. Acesso em: 28 set. 2020.

BOUWMAN, H.; VAN DEN BERG, H.; KYLIN, H. DDT and malaria prevention: Addressing the paradox. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 119, n. 6, p. 744–747, 2011.

BUNMEE, K. et al. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles minimus* in Thailand based on mitochondrial DNA markers. **Parasites & Vectors**, London, v.14, n.1, p. 496-508, 2021.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRAGINETS, O. P. et al. Population genetic structure of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* in Kenya. **The American Journal of Tropical medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, n. 3, p. 303–308, 2003.

BRASIL. **Ações de Controle da Malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica**. 1. ed. Brasília, 2006.

BRASIL. **Guia para Gestão Local do Controle da Malária**. 1. ed. Brasília, 2009.

BRASIL. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 1 ed. Brasília, 2010.

BRASIL. **Guia de Orientação para Treinamento de Técnicos de Laboratório de Entomologia**. Santa Catarina, 2015.

BRASIL. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2019a.

BRASIL. Vigilância em Saúde no Brasil 2003/2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Boletim Epidemiológico**, p. 1–154, 2019b.

BRASIL. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília. 2020.

BROWN, A. E. Mode of Action of Insecticides and Related Pest Control Chemicals for Production Agriculture , Ornamentals, and Turf. **Pesticide Information Leaflet**, College Park, n. 43, 2006.

BRYAN, J. H. *Anopheles gambiae* and *A. melas* at Brefet, The Gambia, and their role in malaria transmission. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 77, n. 1, p. 1–12, 1983.

CABO VERDE. **Plano Estratégico De Pré – Eliminação Do Paludismo: 2009-2013**. Ministério da. Saúde de Cabo Verde, 2009.

CABO VERDE. **Plano integrado de luta contra as doenças transmitidas por vectores e problemas de saúde associados ao meio ambiente**. Praia, 2012.

CABO VERDE. Programa Integrado de Luta contra as Doenças Transmitidas por Vetores e Problemas da Saúde Associados ao Meio Ambiente: Protocolo de Tratamento Do Paludismo. p. 1–40, 2015.

CAMBOURNAC, F.; PETRARCA, V.; COLUZZI, M. *Anopheles arabiensis* in Cape Verde archipelago. v. 14, n. 2, p. 265–267, 1982.

CAMERON, S. L. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 59, p. 95–117, 2014.

CAMPOS, M. et al. Surveillance of *Aedes aegypti* populations in the city of Praia, Cape Verde: Zika virus infection, insecticide resistance and genetic diversity. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 481–492, 2020.

CAMPOS, M. et al. The origin of island populations of the African malaria mosquito, *Anopheles coluzzii*. **Communications Biology**, v.4, n.1, p. 630-639, 2021.

CANSADO-UTRILLA, C. et al. An assessment of adult mosquito collection techniques for studying species abundance and diversity in Maferinyah, Guinea. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 150–166, 2020.

CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.

CARRASCO-ESCOBAR, G. et al. High-accuracy detection of malaria vector larval habitats using drone-based multispectral imagery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. e0007105, 2019.

CARTER, T. E. et al. Genetic diversity of *Anopheles stephensi* in Ethiopia provides insight into patterns of spread. **Parasites & Vectors**, London, v. 14, n. 1, p. 602–614, 2021.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Malaria's Impact Worldwide**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html>. Acesso em: 11 jan. 2020.

CHAREONVIRIYAPHAP, T. et al. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasites and Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 280–308, 2013.

CHOOCHOTE, W.; SAEUNG, A. Systematic Techniques for the Recognition of *Anopheles* Species Complexes. In: **Anopheles Mosquitoes - New Anopheles insights into malaria mosquitoes - New vectors**. Rijeka: InTech, 2013. p. 58–80.

CHOUAÏBOU, M. et al. First report of the East African *kdr* mutation in an *Anopheles gambiae* mosquito in Côte d'Ivoire. **Wellcome Open Research**, v. 2, p. 8, 2017.

COETZEE, M. Distribution of the African malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 2, p. 103–104, 2004.

COETZEE, M. et al. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. **Zootaxa**, v. 3619, n. 3, p. 246–274, 28 fev. 2013.

COLUZZI, M. et al. Chromosomal differentiation and adaptation to human the *Anopheles gambiae* complex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 73, n. 5, p. 483–497, 1979.

COLUZZI, M. Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 62, n. SUPPL., p. 107–113, 1984.

COLUZZI, M. et al. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. **Science**, New York, v. 298, n. 5597, p. 1415–1418, 2002.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed, p. 215, 1994.

CUAMBA, N.; MENDIS, C. The role of *Anopheles merus* in malaria transmission in an area of southern Mozambique. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 46, n. 2, p. 157–159,

2009.

DA CRUZ, D. L. et al. Detection of alleles associated with resistance to chemical insecticide in the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Santiago, Cabo Verde. **Malaria Journal**, London, v. 18, p. 120–131, 2019.

DABIRÉ, R. K. et al. Distribution and frequency of kdr mutations within *Anopheles gambiae* s.l. populations and first report of the Ace.1G119S mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e101484, 2014.

DADZIE, S. et al. Species composition and insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) (Culicidae) in Kome, southern Chad and the implications for malaria control. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 465, 2016.

DAS, S. K. Mode of action of pesticides and the novel trends – A critical review. **International Research Journal of Agriculture and Soil Science**, v. 3, n. 12, p. 393–401, 2013.

DAVID, J.-P. et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 368, n. 1612, p. 2–12, 2013.

DAVIES, T. G. E. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, London, v. 59, n. 3, p. 151–162, 2007.

DELLA TORRE, A. et al. Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. **Science**, New York, v. 298, n. 5591, p. 115–117, 2002.

DEPINA, A. J. et al. Achievement of malaria pre-elimination in Cape Verde according to the data collected from 2010 to 2016. **Malaria Journal**, London, v. 17, n. 1, p. 236, 2018a.

DEPINA, A. J. et al. *Anopheles gambiae* sensu lato Susceptibility to the Insecticides in Praia, Cape Verde: A Country in the Pre-Elimination of Malaria. **Vector Biology Journal Research**, v. 3, n. 2, p. 5, 2018b.

- DEPINA, A. J. et al. Spatiotemporal characterisation and risk factor analysis of malaria outbreak in Cabo Verde in 2017. **Tropical Medicine and Health**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 1–13, 2019.
- DING, Y. et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. **BMC genomics**, London, v. 4, n. 1, p. 16, 2003.
- DING, Y. et al. Complete mitogenome of *Anopheles sinensis* and mitochondrial insertion segments in the nuclear genomes of 19 mosquito species. **PLoS ONE**, San Francisco, v.13, n.9, p. e0204667, 2018.
- DOS SANTOS, J. M. et al. Variability and genetic differentiation among *Anopheles* (Ano.) *intermedius* Chagas, 1908 and *Anopheles* (Ano.) *matto grossensis* Lutz & Neiva, 1911 (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n. 6, p. 531-537, 2005.
- DJÈGBÈ, I. et al. Molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 409–418, 2014.
- DJÈGBÈ, I. et al. First report of the presence of L1014S Knockdown-resistance mutation in *Anopheles gambiae* s.s and *Anopheles coluzzii* from Togo, West Africa. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 30–44, 2018.
- DJOGBÉNOU, L et al. Evidence of introgression of the *ace-1R* mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. **PLoS ONE**, San Francisco, v.3, n.5, p. e2172, 2008.
- EDI, A. V. C. et al. First detection of N1575Y mutation in pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Southern Côte d’Ivoire. **Wellcome Open Research**, v. 2, n. 71, p. 1–10, 2017.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FANELLO, C.; SANTOLAMAZZA, F.; DELA TORRE, A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.16, n. 4, p. 461 – 464, 2002.

FENG, X. et al. Genetic diversity and population structure of the primary malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in China inferred by *cox1* gene. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 75, p. 1 - 9, 2017.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética** Embrapa-Cenargen, 1998.

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

FIGUEIREDO, M. A. P. et al. Molecular identification of *Plasmodium* spp. and blood meal sources of anophelines in environmental reserves on São Luís Island, state of Maranhão, Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 209–212, 2017.

FORATTINI, O. P. Exophilic behavior of *Anopheles darlingi* Root in a southern region of Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 21, n. 4, p. 291–304, 1987.

FOURNIER, D. et al. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 20, p. 14270–14274, 1992.

FU, Y & LI, W. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, Austin, v. 133, p. 693-709, 1993.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 149–169, 2006.

GALARDO, A. K. R. et al. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 765–769, 2015.

GARI, T.; LINDTJØRN, B. Reshaping the vector control strategy for malaria elimination in Ethiopia in the context of current evidence and new tools: Opportunities and challenges.

Malaria Journal, London, v. 17, n. 1, p. 454–462, 2018.

GARROS, C. et al. Gut Content Identification of Larvae of the *Anopheles gambiae* Complex in Western Kenya Using a Barcoding Approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 3, p. 512–518, 2008.

GOMES, E. et al. Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles*. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 621–32, 2020.

GONÇALVES, A. **Caracterização genética da GSTe2 e da COI em populações de *Culex pipiens sensu lato* (Diptera: Culicidae), da cidade da Praia, Cabo Verde**. Universidade Jean Piaget de Cabo Verde, 2016.

GRAVES, P.; GELBAND, H. Vaccines for preventing malaria (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 2, p. CD000129, 2000.

GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 701–718, 2015.

GUINDON, S. et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, Basingstoke, v. 59, n. 3, p. 307–21, 2010.

GUPTA, R. C. Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In: GUPTA, R.G. (ed). **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**. Hopkinsvill: Elsevier, 2006, p. 5–24.

GUTIÉRREZ, L. A. et al. A new mtDNA COI gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the *Albitarsis* complex in the Caribbean region of Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1019–1025, 2010.

HAKIZIMANA, E. et al. Susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides used for malaria vector control in Rwanda. **Malaria Journal**, London, v. 15, n. 1, p. 582–593, 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAO, Y. J. et al. Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

HARBACH, R. E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 94, n. 6, p. 537–553, 2004.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, n. 1668, p. 591–638, 2007.

HARDY, A. et al. Using low-cost drones to map malaria vector habitats. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 29–42, 2017.

HAY, S. I. et al. Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e1000209, 2010.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 653–665, 2004.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 371–91, 2000.

HIWAT, H. et al. Carbon dioxide baited trap catches do not correlate with human landing collections of *Anopheles aquasalis* in Suriname. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 360–364, 2011.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: A review. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 1, p. 177–190, 2011.

HLAING, T. et al. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: Implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**, London, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2009.

HUESTIS, D. L.; LEHMANN, T. Ecophysiology of *Anopheles gambiae* s.l.: Persistence in the Sahel. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 28, p. 648–661, 2014.

HUNT, R. H.; COETZEE, M.; FETTENE, M. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 92, n. 1998, p. 231–235, 1998.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pb/conde/panorama>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

IBRAHIM, S. S. et al. High frequency of kdr L1014F is associated with pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii* in Sudan savannah of northern Nigeria. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, n. 1, p. 441, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA DE CABO VERDE. APRESENTAÇÃO DE DADOS PRELIMINARES DO IV^o RGPB 2010 Gabinete do Censo 2010. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA DE CABO VERDE. Projeções Demográficas de Cabo Verde 2010-2030. **Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde**, p. 163, 2013.

JACOBINA, A. C. M. et al. Entomological profile and new registers of the genera *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in a Brazilian rural community of the District of Coxipó do Ouro, Cuiabá, Mato Grosso. **EntomoBrasilis**, v. 13, p. e0848, 2020.

JONES, C. M. et al. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 17, p. 6614–

6619, 2012.

KABULA, B. et al. Co-occurrence and distribution of East (L1014S) and West (L1014F) African knock-down resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato population of Tanzania. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 331–341, 2014.

KADDUMUKASA, M. A. et al. Genetic differentiation and population structure of *Anopheles funestus* from Uganda and the southern African countries of Malawi, Mozambique, Zambia and Zimbabwe. **Parasites & Vectors**, London, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2020.

KAWADA, H. et al. Multimodal Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s. in Western Kenya. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e22574, 11 ago. 2011a.

KAWADA, H. et al. Distribution of a Knockdown Resistance Mutation (L1014S) in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in Western and Southern Kenya. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e24323, 9 set. 2011b.

KISZEWSKI, A. et al. A global index representing the stability of malaria transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 5, p. 486–498, 2004.

KOSTAROPOULOS, I. et al. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, n. 4–5, p. 313–319, 2001.

KOUTSOS, A. C. et al. Life cycle transcriptome of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* and comparison with the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 27, p. 11304–9, 2007.

KUDYBA, H. M. et al. Field evaluation of malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. **Malaria Journal**, London, v. 18, n. 1, p. 98–105, 2019.

KWIATKOWSKA, R. M. et al. Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallée du Kou, Burkina Faso. **Gene**, Amsterdam, v. 519, n. 1, p. 98–106, 2013.

LACARIN, C.; REED, B. **Emergency Vector Control Using Chemicals**. Leicester, 1999.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, London, v. 47, n. W1, p. 256–259, 2019.

LEAL, S. V. et al. Update on the mosquito fauna (Diptera: Culicidae) distribution in Cabo Verde: occurrence of the species complexes *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* (*pipiens*, *quinquefasciatus* and their hybrids). **bioRxiv preprint**, 2021.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LIMA, J. B. P. et al. Is there an efficient trap or collection method for sampling *Anopheles darlingi* and other malaria vectors that can describe the essential parameters affecting transmission dynamics as effectively as human landing catches? - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, p. 685–705, 2014.

LISKA, D. A. J. The detoxification enzyme systems. **Alternative Medicine Review**, Saindpoint, v. 3, n. 3, p. 187–198, 1998.

LOAIZA, J. R. et al. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2012.

LOIOLA, C. C. P.; MANGABEIRA DA SILVA, C. J.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 11, n. 4, p. 235–244, 2002.

LOUNIBOS, L. P.; CONN, J. E. Malaria vector heterogeneity in South America. **American Entomologist**, v. 46, n. 4, p. 238–249, 2000.

LOUREIRO, A. C. **DIVERSIDADE EM GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E RITMOS BIOLÓGICOS EM *Anopheles darlingi* ROOT 1926**. Tese (Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, 2018.

LOW, W. Y. et al. Molecular Evolution of Glutathione S -Transferases in the Genus *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 177, n. 3, p. 1363–1375, 2007.

LUC, D. S. et al. Indirect evidence that agricultural pesticides select for insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 41, n. 1, p. 34–40, 2016.

LUMJUAN, N. et al. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* White star. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 861–871, 2005.

LYND, A. et al. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from the northern Democratic Republic of Congo, with extreme knockdown resistance (kdr) mutation frequencies revealed by a new diagnostic assay. **Malaria Journal**, London, v. 17, n. 1, p. 412–420, 2018.

MA, Y. et al. Population structure of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in China: Two gene pools inferred by microsatellites. **PloS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e22219, 2011.

MACÁRIO REBÊLO, J. M. et al. Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 12, p. 2959–2971, 2007.

MAIA, R. **Análise in silico e polimorfismo genético das glutathione s-transferases da classe epsilon de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos**. Recife: Tese (doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MAKHAWI, A. M. et al. Genetic variations of ND5 gene of mtDNA in populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) malaria vector in China. **Parasites & Vectors**,

London, v. 6, n. 1, p. 290–301, 2013.

MANIN, B. O.; DRAKELEY, C. J.; CHUA, T. H. Mitochondrial variation in subpopulations of *Anopheles balabacensis* baisas in Sabah, Malaysia (Diptera: Culicidae). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 8, p. e0202905, 2018.

MANTEL, N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. **Cancer research**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 209–220, 1967.

MARINOTTI, O. et al. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. 15, p. 7387–7400, 2013.

MARTIN-REINA, J. et al. Insecticide Reproductive Toxicity Profile: Organophosphate, Carbamate and Pyrethroids. **Journal of Toxins**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.

MARTINEZ-TORRES, D. et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 179–184, 1998.

MARTINS, A.J. & Valle, D. The pyrethroid knockdown resistance. In: Soloneski, S. and Larramendy, M. **Insecticides - basic and other applications**. InTech. 2012.

MARKIANOS, K. et al. Genetic structure of a local population of the *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso. **PloS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0145308, 2016.

MATHIAS, D. K. et al. Spatial and temporal variation in the kdr allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. **Malaria Journal**, London, v. 10, p. 10, 2011.

MICHEL, A. P. et al. Rangewide population genetic structure of the African malaria vector *Anopheles funestus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 14, p. 4235–4248, 2005.

MIGUEL-OTEO, M. et al. Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. **Asian Pacific Journal of Tropical**

Medicine, v. 10, n. 3, p. 299–304, 2017.

MILLAR, S. B.; COX-SINGH, J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*-zoonotic malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 640–648, 2015.

MISSAWA, N. A. et al. Comparação de métodos de captura para o diagnóstico da população de anofelinos adultos do estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 555–560, 2011.

MONTADA DORTA, D.; VASUKI, V.; RAJAVEL, A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 391–397, 1993.

MONTEIRO, S. et al. Crescimento urbano espontâneo e riscos naturais na cidade da Praia (Cabo Verde). In: **Cadernos de Geografia**. Coimbra: Faculdade de Letras da Universidade de Coimbra, Departamento de Geografia, 2011.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 437–449, 2012.

MONTOYA-LERMA, J. et al. Malaria vector species in Colombia: A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. SUPPL. 1, p. 223–238, 2011.

MORONI, R. B. et al. Genetic variability among *Anopheles* species belonging to the *Nyssorhynchus* and *Anopheles* subgenera in the Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 409–415, 2010.

MOTOKI, M. T. et al. Population genetics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in its native range in Lao People's Democratic Republic. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 477–489, 2019.

MREMA, E. J. et al. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. **Toxicology**, v. 307, p. 74–88, 2013.

- MUKHTAR, A. Y. A.; MUNYAKAZI, J. B.; OUIFKI, R. Assessing the role of human mobility on malaria transmission. **Mathematical Biosciences**, New York, v. 320, p. 108304, 2020.
- MULLEN, G. R.; DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2019.
- MUTURI, E. J. et al. Population Genetic Structure of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Rice Growing Area of Central Kenya. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 47, n. 2, p. 144–151, 2010.
- NAIM, D.; KAMAL, N.; MAHBOOB, S. Population structure and genetic diversity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang as revealed by mitochondrial DNA cytochrome oxidase I. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v.27, n. 3, p. 953-967, 2020.
- NAMOUNTOUGOU, M. et al. Multiple Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. Populations from Burkina Faso, West Africa. **PloS ONE**. San Francisco, n. 7, v.11, p. e48412, 2012.
- NDIATH, M. O. et al. Emerging knock-down resistance in *Anopheles arabiensis* populations of Dakar, Senegal: First evidence of a high prevalence of kdr-e mutation in West African urban area. **Malaria Journal**, London, v. 14, n. 1, p. 364–373, 2015.
- NDO, C. et al. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles nili* in sub-Saharan Africa. **Malaria Journal**, London, v. 9, n. 1, p. 61–74, 2010.
- NG'ANG'A, P. N.; ADUOGO, P.; MUTERO, C. M. Long lasting insecticidal mosquito nets (LLINs) ownership, use and coverage following mass distribution campaign in Lake Victoria basin, Western Kenya. **BMC Public Health**, London, v. 21, n. 1, p. 1046–59, 2021.
- NORRIS, D. E. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 32, n. 13, p. 1607–1615, 2002.

OCHOMO, E. et al. Presence of the knockdown resistance mutation, Vgsc-1014F in *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* in western Kenya. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 616, 1 dez. 2015.

OGOLA, E. O. et al. Population genetics of *Anopheles funestus*, the African malaria vector, Kenya. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, n. 1, p. 15–24, 2019.

OLANRATMANEE, P et al. Population Genetic Structure of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) at a Micro-Spatial Scale in Thailand: Implications for a Dengue Suppression Strategy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1913, 2013.

OLÉ SANGBA, M. L. et al. Evidence of multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* populations in Bangui, Central African Republic. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 23-33, 2017.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, London, v. 9, n. 1, p. 115–130, 2010.

ONYABE, D. Y.; CONN, J. E. The Distribution of Two Major Malaria Vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*, in Nigeria. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 8, p. 1081–1084, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The Africa Malaria Report 2003. Geneva, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Malaria Control and Elimination: report of a technical review. Geneva, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **GLOBAL INSECTICIDE USE FOR VECTOR-BORNE DISEASE CONTROL**. 4. ed. Geneva, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2011**. Geneva, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WORLD MALARIA REPORT 2012**. Geneva, 2012a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Eliminating Malaria: Moving towards sustainable elimination in Cape Verde. 2012b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors.** Geneva, 2012c.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Handbook for integrated vector management.** Geneva, 2012d.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2014.** Geneva, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2015.** Geneva, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2016.** Geneva, 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.** 2. ed. Geneva: Springer Berlin Heidelberg, 2016b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2017.** Geneva, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2018.** Geneva, 2018a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016.** Geneva, 2018b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2019.** Geneva, 2019a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for Malaria Vector Control.** Geneva, 2019b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2020:20 years of global progress and challenges.** Geneva, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cabo Verde attains zero local malaria transmission.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs348/en/>>. Acesso em: 2 out. 2021.

ORTELLI, F. et al. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. **The Biochemical journal**, v. 373, n. Pt 3, p. 957–963, 2003.

OTERO, M.; SCHWEIGMANN, N.; SOLARI, H. G. A stochastic spatial dynamical model for *Aedes aegypti*. **Bulletin of Mathematical Biology**, New York, v. 70, n. 5, p. 1297–1325, 2008.

OWUOR, K. et al. Insecticide resistance status of indoor and outdoor resting malaria vectors in a highland and lowland site in Western Kenya. **PloS ONE**, San Francisco, v.17, n. 3, p. e0240771, 2021.

PAIVA, M. H. S. A. et al. An unsettling explanation for the failure of skatole-baited ovitraps to capture *Culex* mosquitoes. **Insect Science**, p. 1–8, 2018.

PARAÍBA. **Casos autóctones inéditos de Malária por P.Vivax no município de Conde na Paraíba: Nota Técnica nº 02/2019.** Governo da Paraíba. Gerência Operacional de Vigilância Epidemiológica, 2019.

PARAÍBA. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO N.º 36/2020 SOBRE A MALÁRIA NO MUNICÍPIO DE CONDE. **Secretaria Municipal de Saúde/Coordenação de Promoção à Saúde/ Departamento de Vigilância em Saúde**, 2020.

PEDRO, P.; SALLUM, M. Spatial expansion and population structure of the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 97, n. 4, p. 854-866, 2009.

PINTO, J. et al. ASSESSMENT OF MALARIA TRANSMISSION IN AN AREA WITH VERY LOW MOSQUITO DENSITY. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 59, n. 12, p. 23–26, 1999.

- PIRES, S. et al. Susceptibility of mosquito vectors of the city of Praia, Cabo Verde, to Temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 6, p. e0234242, 2020.
- PONTES, F. J. S. et al. The Role of the Conformational Dynamics of Glutathione S-Transferase Epsilon Class on Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 27, n. 9, p. 1602–1615, 2016.
- PÓVOA, M. M. et al. The importance of *Anopheles albitarsis* e and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. 163–168, 2006.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
- RAGHAVENDRA, K. et al. Malaria vector control: From past to future. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 4, p. 757–779, 2011.
- RANSON, H. et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 491–497, 2000.
- RANSON, H. et al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Biochemical Journal**, London v. 304, p. 295–304, 2001.
- RANSON, H. et al. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. **Science**, New York, v. 298, n. 5591, p. 179–181, 2002.
- RANSON, H. et al. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: What are the implications for malaria control? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 91–98, 2011.
- RANSON, H.; LISSENDEN, N. Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. **Trends in**

Parasitology, Oxford, v. 32, n. 3, p. 187–196, 2016.

REID, M. C.; MCKENZIE, F. E. The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. **Malaria journal**, London, v. 15, n. 1, p. 107, 2016.

REIS, I. C. et al. Diversity of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) in an Amazonian Urban Area. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 47, n. 3, p. 412–417, 2018.

RIBEIRO, H. et al. **Os mosquitos de Cabo Verde (Diptera: Culicidae) – sistemática, distribuição, bioecologia e importância médica**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980.

RIVERON, J. M. et al. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 2, p. R27, 2014.

RIVERON, J. M. et al. Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale. In: **Towards Malaria Elimination - A Leap Forward**. InTech, 2018. p. 149–176.

RODRIGUEZ, J. M. et al. Moving to malaria elimination in Cape Verde. **Malaria Journal**, London, v. 11, n. Suppl 1, p. 9, 2012.

SALGUEIRO, P. et al. Phylogeography and invasion history of *Aedes aegypti*, the Dengue and Zika mosquito vector in Cape Verde islands (West Africa). **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 9, p. 1797–1811, 2019.

SAFI, N. et al. Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan. **Malaria Journal**, London, v. 16, n. 1, p. 100-110. 2017.

SARMA, N. P. et al. Mitochondrial DNA-based genetic diversity of *Anopheles nivipes* in North East India. **Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis**, v. 27, n. 6, p. 4236–4239, 2016.

SCOTT, J. A.; BROGDON, W. G.; COLLINS, F. H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 4, p. 520–529, 1993.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, London, v. 360, n. Pt 1, p. 1–16, 2001.

SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F. et al. Molecular Confirmation of the Specific Status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and Evidence of a New Cryptic Species within *An. triannulatus* in Central Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 3, p. 455–459, 2006.

SILVA, A. P. B.; SANTOS, J. M. M.; MARTINS, A. J. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids - a review. **Parasites & vectors**, London, v. 7, p. 450, 2014.

SILVA, A. P. B. DA. **Variabilidade do domínio IIS6 do gene do canal de sódio, associada à resistência aos inseticidas piretróides, em populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* da Amazônia brasileira**. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, 2014.

SILVA, G. L. DA et al. The impact of insecticides management linked with resistance expression in *Anopheles* spp. populations. **Ciência & Saúde Coletiva (Impr.)**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 7, p. 2179–2188, 2015.

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

SINKA, M. E. et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & Vectors**, London, v. 3, n. 1, p. 117–151, 2010a.

SINKA, M. E. et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasites & Vectors**, London, v. 3, n. 1, p. 72–98, 2010b.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, n. 1, p. 69–80, 2012.

SLATKIN, M. Rare Alleles As Indicators of Gene Flow. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 53–65, 1985.

SNOUNOU, G. et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, n. 2, p. 315–320, 1993.

SNOUNOU, G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. In: **Methods in Molecular Biology**. 1996. v. 50, p. 263–291.

SNOW, R. W. et al. The Changing Limits and Incidence of Malaria in Africa. 1939-2009. In: ROLLINSON, S. I (ed). **Advances in Parasitology**. London: Elsevier, v. 78, 2012, p. 169-262.

SRIWICHAI, P. et al. Evaluation of CDC light traps for mosquito surveillance in a malaria endemic area on the Thai-Myanmar border. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 636–646, 2015.

SURENDRAN, S. N. et al. Karyotypic assignment of Sri Lankan *Anopheles culicifacies* species B and e does not correlate with cytochrome oxidase subunit i and microsatellite genotypes. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 327–333, 2015.

SWALE, D. R. et al. Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, p. 156–161, 2013.

TADEI, W. P. et al. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 2, p.

325–335, 1998.

TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, Austin, v. 123, n. 3, 585-595, 1989.

TAUIL, P. L. et al. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 71–111, 1985.

THIAW, O. et al. Investigating insecticide resistance and knock-down resistance (kdr) mutation in Dielmo, Senegal, an area under long lasting insecticidal-treated nets universal coverage for 10 years. **Malaria Journal**, London, v. 17, n. 1, p. 123–132, 2018.

TIRADOS et al. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 425–437, 2006.

TWERDOCHLIB, A. L. et al. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 249–256, 2012.

VAN DEN BERG, M. et al. RTS,S malaria vaccine pilot studies: Addressing the human realities in large-scale clinical trials. **Trials**, London, v. 20, n. 1, p. 316–320, 2019.

VERHAEGHEN, K. et al. Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. **Malaria Journal**, London, v. 5, p. 16, 2006.

VITTOR, A. Y. et al. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 74, n. 1, p. 3–11, 2006.

VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal**, London, v. 357, n. 1, p. 65–72, 2001.

WALKER, K.; LYNCH, M. Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: Review of achievements and potential. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 2–21, 2007.

WALTER J. CRINNION. Environmental Medicine, Part 4: Pesticides-Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins. **Alternative Medicine Review**, Saindpoint, v. 5, n. 5, p. 432–447, 2000.

WANG, G. et al. An evaluation of the suitability of COI and COII gene variation for reconstructing the phylogeny of, and identifying cryptic species in, anopheline mosquitoes (Diptera Culicidae). **Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis**, v. 28, n. 5, p. 769–777, 2016.

WEERARATNE, T. C. et al. Genetic diversity and population structure of malaria vector mosquitoes *Anopheles subpictus*, *Anopheles peditaeniatus*, and *Anopheles vagus* in five districts of Sri Lanka. **Malaria Journal**, London, v. 17, n. 1, p. 271–279, 2018.

WEILL, M. et al. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 1–7, fev. 2004.

WERMELINGER, E. D.; FERREIRA, A. P. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 3, p. 49–54, 2013.

WHITE, G. B. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 68, n. 4, p. 278–298, 1974.

WIEBE, A. et al. Geographical distributions of African malaria vector sibling species and evidence for insecticide resistance. **Malaria Journal**, London, v. 16, n. 1, p. 85–95, 2017.

WILDING, C. S. et al. High, clustered, nucleotide diversity in the genome of *Anopheles gambiae* revealed through pooled-template sequencing: Implications for high-throughput genotyping protocols. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 320–331, 2009.

YAHOUÉDO, G. A. et al. Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 385, 2016.

YANG, M.; MA, Y.; WU, J. Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesteri* from China (Diptera: Culicidae). **Malaria Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 216–225, 2011.

YEWHALAW, D. et al. First evidence of high knockdown resistance frequency in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 83, n. 1, p. 122–125, 2010.

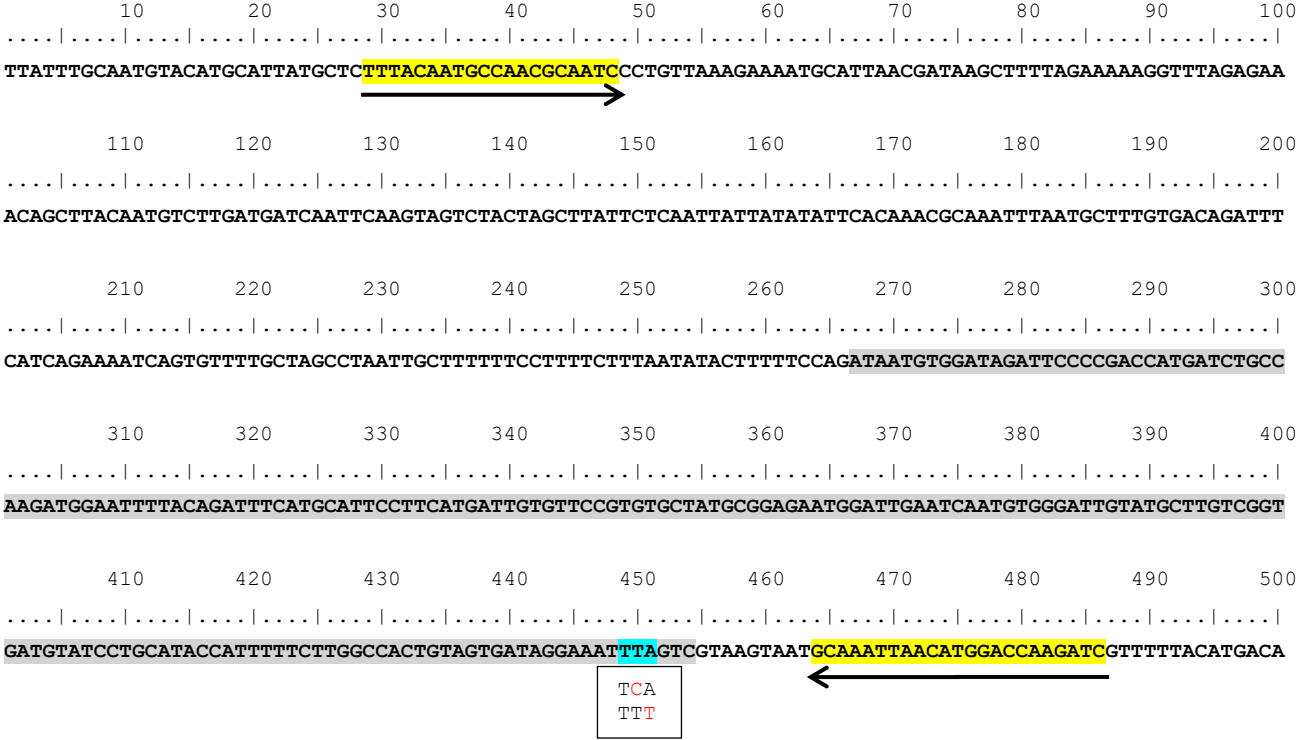
YU, S. J. Detoxification Mechanisms in Insects. In: **Encyclopedia of Entomology**. 2008. p. 1252–1254.

ZAIM, M. et al. The use of CDC light traps and other procedures for sampling malaria vectors in southern Iran. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 2, n. 4, p. 511–515, 1986.

ZHANG, Z.; CHENG, Q.; GE, Y. The complete mitochondrial genome of *Rhynchocypris oxycephalus* (Teleostei: Cyprinidae) and its phylogenetic implications. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 13, p. 7819–7837, 2019.

ZINK, R. M.; BARROWCLOUGH, G. F. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 2107–2121, 2008.

APÊNDICE A - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS AMPLIFICADA DO GENE *NA_v* DE *Anopheles arabiensis* (GENBANK: KR867649.1).



TT

Fonte: O autor.

Legenda: em cinza – Sequência codante (exon 20); em azul – codon onde ocorre as mutações L1014S (TTA/TCA) e L1014F (TTA/TTT); Setas – região de anelamento dos primers

APÊNDICE B - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DO GENE *ACE-1* DE *Anopheles arabiensis* E A RESPECTIVA PROTEÍNA RESULTANTE (VECTOR BASE: AGAP001356).

```
      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGGAGATCCGAGGGCTGCTGATGGGTAGACTACGGTTAGGACGGCGGATGGTTCGCTGGGTCTGCTCGGCCGTGACCGCGCTGCTACTAATCCTGCCAC
M E I R G L L M G R L R L G R R M V P L G L L G V T A L L L I L P

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTTCGCGCTGGTGCAGGGCCGGCACCACGAGCTCAACAATGGTGCCGCATCGGATCGCATCAGCTGTGCGGTGCCGCCGGTGTGGCCTTGCTCCCA
P F A L V Q G R H H E L N N G A A I G S H Q L S A A A G V G L A S Q

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTCGCCCAGTCCGGATCGCTCGCATCCGGTGTGATGTCATCCGTTCTGCTGCCGGAGCGTCACTCCTCCTCGTCGTCGCTGTGTCATCGTCAGCC
S A Q S G S L A S G V M S S V P A A G A S S S S S S S L L S S S A

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGACGACGTGGCGGCATTACTCTCAGCAAGGACGCAACCGCATTGTTTACACCATATATAGGTCACGGTGAGTCCGTACGAATTATAGATGCCGAGT
E D D V A R I T L S K D A A D A F F T P Y I G H G E S V R I I D A E
      |
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGGCACGCTCGAGCATGTCCACAGTGGAGCAACGCCGGCGGACGGCCCTGACGAGGCGCGAGTCAAACCTCGAACGCGAACGACAACGATCCGCTGGT
L G T L E H V H S G A T P R R R G L T R R E S N S S D A N D N D P L V
      |
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTCAACACGGATAAGGGGCGCATCCGCGGCATTACGGTCGATGCGCCCAGCGGCAAGAAGGTGGACGTGTGGCTCGGCATTCCCTACGCCAGCCGCCG
V N T D K G R I R G I T V D A P S G K K V D V W L G I P Y A Q P P
                                     Primer F
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTCGGCCGCTACGGTTCGGTTCATCCGCGGCCGCCGAAAAGTGGACCGCGTCTGAACACGACCACCCGCCAACAGCTGCGTGCAGATCGTGGACA
V G P L R F R H P R P A E K W T G V L N T T T P P N S C V Q I V D
```


710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCGTGTTCCGCGACTTCCCGGGCGGACCATGTGGAACCGAACACGCCCTGTCCGAGGACTGTCTGTACATTAACGTGGTGGCACCGCGACCCCGGCC
T V F G D F P G A T M W N P N T P L S E D C L Y I N V V A P R P R P

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAAGAATGCGGCCGTCATGCTGTGGATCTTCGGCGGC**GGC**TTCTACTCCGGCACCGCCACCCTGGACGTGTACGACCACCGGGCGCTTTCGCTCGGAGGAG
K N A A V M L W I F G G G F Y S G T A T L D V Y D H R A L A S E E

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACGTGATCGTGGTGTGCTGCAGTACCGCGTGGCCAGTCTGGGCTTCTGTTTCTCGGCACCCCGGAAGCGCGGGCAATGCGGGACTGTTTCGATCAGA
N V I V V S L Q Y R V A S L G F L F L G T P E A P G N A G L F D Q

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCTTCGCTACCGCTGGGTGCGGGACAACATTACCCGGTTCGGTGGCGATCCGTTCGGTGTGACACTGTTCGGCGAGAGTGCCGGTGCCGCTCTCGGTGTC
N L A L R W V R D N I H R F G G D P S R V T L F G E S A G A V S V S

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTGCATCTGCTGTCCGCCCTTCCCGCGAT**CTGTTCCAGCGGGCCATCCT**GCAGAGCGGCTCGCCGACGGCACCGTGGGCATTTGGTATCGCGCGAGGAA
L H L L S A L S R D L F Q R A I L Q S G S P T A P W A L V S R E E

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCACACTA**AG**GAGCACTGCGGTGGCCGAGGGCGGTCGGCTGCCCGCACGAACCGAGCAAGCTGAGCGATGCGGTGCGAGTGCCGCGGCAAGGACCCGC
A T L R A L R L A E A V G C P H E P S K L S D A V E C L R G K D P

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACGTGCTGGTCAACAACGAGTGGGGCAGGCTCGGCATTTCCGAGTTCCCGTTCGTGCCGGTGGTTCGACGCTGCGTTCCCTGGACGAGACCCCGACGGTTC
H V L V N N E W G T L G I C E F P F V P V V D G A F L D E T P Q R S

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTGCCAGGGGGCTTCAAGAAGACGGAGATCCTCACGGCAGCAACACGGAGGAGGGCTACTACTTCATCATCTACTACCTGACCGAGCTGCTGCCG
L A S G R F K K T E I L T G S N T E E G Y Y F I I Y Y L T E L L R

```

1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAGGAGGAGGGCGTGACCGTGACGCGCGAGGAGTTCCTGCAGGCGGTGCGCGAGCTCAACCCGTACGTGAACGGGGCGGCCCGGCAGGCGATCGTGTTCG
K E E G V T V T R E E F L Q A V R E L N P Y V N G A A R Q A I V F

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGTACACCGACTGGACCGAGCCGGACAACCCGAACAGCAACCCGGGACGCGCTGGACAAGATGGTGGGCGACTATCACTTCACCTGCAACGTGAACGAGTT
E Y T D W T E P D N P N S N R D A L D K M V G D Y H F T C N V N E F

1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGCGCAGCGGTACGCCGAGGAGGGCAACACGCTACATGTATCTGTACACGCACCGCAGCAAAGGCAACCCGTGGCCGCGCTGGACGGGCGTGATGCAC
A Q R Y A E E G N N V Y M Y L Y T H R S K G N P W P R W T G V M H

1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGACGAGATCAACTACGTGTTTCGGCGAACCGCTCAACCCACCCCTCGGCTACACCGAGGACGAGAAAGACTTTAGCCGGAAGATCATGCGTACTGTT
G D E I N Y V F G E P L N P T L G Y T E D E K D F S R K I M R Y W

1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCAACTTTGCCAAACCGCAATCCAAATCCCAACACGGCCAGCAGCGAATTCGCCGAGTGGCCCAAGCACACCCGCCCGGACGGCACTATCTGGAGCT
S N F A K T G N P N P N T A S S E F P E W P K H T A H G R H Y L E L
      ↑

2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGCCTCAACACGTCCTTCGTGCGTGGGGCCACGGTTGAGGAGTGTGCCTTCTGGAAGAAGTACCTTCCCCAGCTAGTTGCAGCTACCTCGAACCTA
G L N T S F V G R G P R L R Q C A F W K K Y L P Q L V A A T S N L
      ↑

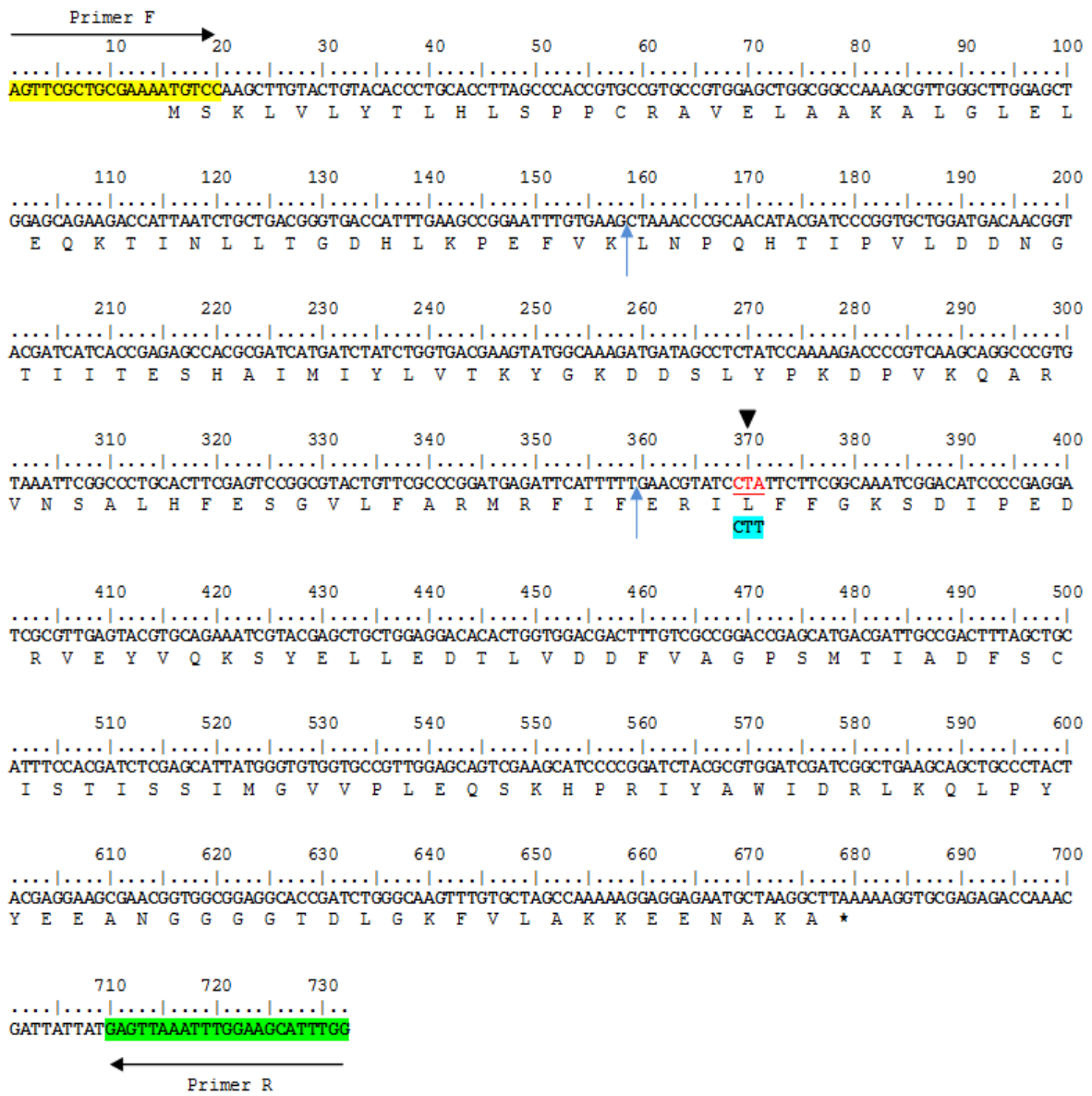
2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCAGGGCCAGCACCGCCTAGTGAACCGTGGCAAAGCAGCGCATTTTTTACCGACCTGATCTGATCGTGTGCTGGTGTGCTGCTTACGGCGACCGTCA
P G P A P P S E P C E S S A F F Y R P D L I V L L V S L L T A T V

2210
.....|.....|.....
GATTCATACAATAA
R F I Q *

```

Fonte: O autor. Legenda: Setas verticais – indicam a posição de cada intron; Setas pretas – indicam as posições de anelamento dos *primers*. Elipse - codon onde pode ocorrer a mutação G119S; triângulo – posição onde ocorre a substituição de nucleotídeos.

APÊNDICE C - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DO GENE *GSTE2* DE *Anopheles arabiensis* AMPLIFICADO E A PROTEÍNA RESULTANTE (VECTOR BASE: AARA008732).



Fonte: O autor.
Legenda: Setas verticais – primeiro (74 pb) e segundo (89 pb) íntrons; triângulo – codon onde ocorre a mutação L119F; Setas horizontais – indicam as posições de anelamento dos *primers*.
 * - Codon de parada

APÊNDICE D - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS AMPLIFICADA DO GENE *GSTE2* DE *Anopheles darlingi* (VECTOR BASE: ADAC008205).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ATGCCG AAGCTT GTTC TGCAC ACCCTT CACCTTAGC CCACCG TGCCGT GCCGTAGA AACTGAC GCGCAAGG CACTCG GATTGG AGCTCG AGCAGA AGGAGA

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
TTAATCTG CTCACCG CGAGCAC CTGAAG CCGGAG TTTCTGA AGGtattac ggtgtata cggtgagg gagagtc aatccag taacac ctctcgc cggtta
      Primer F
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
aacagCTCAATCCACAACATACGATCCC GG TGCTGGATGATGATGGAACGATCATCACC GAAAGCCATGCCATCATGATCTATCTGGTGACGAAGTACGG

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
TAAGGACGATTTCGCTCTATCCGAAGGATGCGGTCAAGCAGGCACGCGTTAATGTGCCCTTCAATTCGAATCCGGTGTGATCTTCGCGGGATGCGCTTC

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
ATCTTCgtaagtaacgcgaacgatcgagcagcataactactttgtcactactactctttctctcggaactctttctagGAGCGTATTCTC TTCTATGGTCA
      CTC
      CTT
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
TACCGACATTCCCTGAGGATCGGGCCGATTACGTACGGAAGGCATACCAGTTGCTGGAGGATACTCTGATCGATGATTACGTTGCGGGTAGTCAGTTAAG

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
GTGGCTGATTT CAGCTGCATCTCATCGACCGCTTCGATAATGGGGTTGTCCCCTGGATGCGGCCACCTTTCCGAAGATCCATGCCTGGATCAACCGGC

      710      720      730      740      750      760      770      780
...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
TGAAGCAGCTGCCGTACTACGAGGAGGCCAACGGTGGTGGGGCAGCCGAGCTGGGCAAGATTGTGATGTGCAAGGTAACAGCCTAA
      Primer R

```

Fonte: O autor.

Legenda: em cinza - primeiro (61 pb) e segundo (71 pb) íntrons; triângulo - codon onde ocorre a mutação L119F (CTC/CTT);

Setas – indicam as posições de anelamento dos *primers*.

APÊNDICE E - CÓDIGO DE ACESSO DAS 31 SEQUÊNCIAS DO GENE *COI* DE *An. arabiensis* OBTIDAS NO GENBANK.

País	Código de acesso no GenBank
Quênia	KJ522830.1
Quênia	MW555794.1
Quênia	KY670610.1
Arabia Saudita	MZ220455.1
Arabia Saudita	KM068068.1
Arabia Saudita	KM068069.1
Arabia Saudita	KM079153.1
Uganda	AF252877.1
Sudão	KM079153.1
Yemem	KR152334.1
Zambia	KR014850.1
Zambia	LC473598.1
Zambia	MK776730.1
Zambia	KM068069.1
Etiópia	MK628499.1
Etiópia	MK628480.1
Etiópia	MK628481.1
Etiópia	MK628482.1
Etiópia	MK628483.1
Etiópia	MK628484.1
Etiópia	MK628487.1
Etiópia	MK628497.1
Etiópia	MK628496.1
Etiópia	MK628490.1
Etiópia	MK628489.1
Etiópia	MK628488.1
Etiópia	MK628491.1
Etiópia	MK628486.1
Malawi	LC473597.1
Malawi	LC473598.1
Malawi	LC473596.1

APÊNDICE F - HAPLÓTIPOS DO GENE *COI* E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS.

Haplótipos	Posições nucleotídicas													fh	
	4	76	82	115	127	154	223	250	280	319	325	373	427		436
H01	C	G	T	A	G	T	A	A	G	T	G	A	T	A	11
H02	A	4
H03	T	1
H04	A	.	A	.	.	.	1
H05	C	.	3
H06	A	C	.	1
H07	.	.	.	G	1
H08	A	.	.	.	A	1
H09	A	.	.	G	.	.	1
H10	G	1
H11	C	2
H12	A	.	.	.	1
H13	C	.	1
H14	.	.	C	.	.	.	T	1
H15	C	1
H16	T	.	.	.	A	.	.	.	A	39
H17	T	A	.	.	A	.	.	.	A	7

Legenda: fh, frequência haplotípica.

Destaque em cinza – “parsimony informative sites”

APÊNDICE G - CÓDIGO DE ACESSO DAS 49 SEQUÊNCIAS DO GENE ND5 DE *An. arabiensis* OBTIDAS NO GENBANK.

País	Código de acesso no GenBank
Sudão	KC610615.1
Sudão	KC610578.1
Sudão	KC610580.1
Sudão	KC610630.1
Sudão	KC610624.1
Sudão	KC610619.1
Sudão	KC610607.1
Sudão	KC610567.1
Sudão	KC610658.1
Sudão	KC610605.1
Malawi	AY009990.1
Malawi	AY009991.1
Malawi	AY010004.1
Malawi	AY009997.1
Malawi	AY010002.1
Malawi	AY009998.1
Malawi	AY009989.1
Malawi	AY010003.1
Malawi	AY009965.1
Malawi	AY009969.1
Etiópia	AY009967.1
Etiópia	AY009973.1
Etiópia	AY009958.1
Etiópia	AY009971.1
Etiópia	AY009988.1
Etiópia	AY009957.1
Etiópia	AY010006.1
Senegal	AF020997.1
Senegal	AF021001.1
Senegal	AF020969.1
Senegal	AF020975.1
Senegal	AF021000.1
Senegal	AF020983.1
Senegal	AF020982.1
Senegal	AF020978.1
Senegal	AF020977.1
Senegal	AF020974.1
África do Sul	AF020996.1
África do Sul	AF020994.1

(continuação)

País	Código de acesso no GenBank
África do Sul	AF020995.1
Quênia	AF021009.1
Quênia	AF021009.1
Quênia	AF021007.1
Quênia	AF021005.1
Quênia	AF021006.1
Quênia	AF021004.1
Quênia	AF021010.1
Quênia	AF021008.1
Quênia	AF020987.1

(continuação)

Haplótipos	Posições nucleotídicas																				fh			
	27	68	75	76	111	129	138	165	201	204	229	243	247	279	306	321	330	423	441	463		516	534	579
H25	A	A	1
H26	T	.	.	1
H27	A	C	1
H28	.	.	A	A	C	1
H29	A	C	.	.	.	C	1
H30	A	G	.	C	1

Legenda: fh, frequência haplotípica.

APÊNDICE I - HAPLÓTIPOS DO GENE *COI* DE *Anopheles argyristarsis* E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS.

Haplótipos	Posições nucleotídicas																fh	
	19	21	22	23	24	29	39	81	147	183	276	294	526	573	624	630		638
H01	G	A	G	C	A	A	C	A	C	A	A	C	A	A	A	C	A	8
H02	C	3
H03	T	.	T	T	.	T	T	T	.	.	T	T	.	1
H04	A	G	A	G	.	G	G	.	.	.	C	1
H05	G	.	.	.	1
H06	T	.	1
H07	T	C	1
H08	G	.	.	C	1
H09	T	1

Legenda: fh, frequência haplotípica

APÊNDICE J - HAPLÓTIPOS DO GENE *COI* DE *Anopheles aquasalis* E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS.

Haplótipos	Posições nucleotídicas																		fh		
	10	22	23	39	47	72	73	75	91	120	237	259	273	276	288	357	406	423		435	447
H01	T	G	C	C	T	A	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	A	G	A	6
H02	G	G	.	.	10
H03	G	11
H04	.	.	.	T	1
H05	G	.	.	A	1
H06	G	G	1
H07	C	G	G	.	.	1
H08	G	1
H09	A	A	.	1
H10	T	C	G	T	.	A	.	1
H11	T	.	G	A	2
H12	G	.	A	1
H13	G	.	.	.	G	1
H14	G	C	1
H15	.	A	T	.	A	T	A	.	T	G	1

Legenda: fh, frequência haplotípica

APÊNDICE K - HAPLÓTIPOS DO GENE *COI* DE *Anopheles albiparvus* s.l E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS.

Haplótipos	Posições nucleotídicas																										fh			
	1	2	3	13	14	15	16	29	42	45	50	94	97	126	153	183	207	234	288	426	444	451	483	519	558	642		643	651	668
H01	A	A	T	C	C	T	C	C	A	C	G	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	C	C	A	G	T	A	G	G	1
H02	G	1
H03	C	C	.	.	.	4
H04	T	A	C	C	.	.	.	2
H05	G	T	C	A	C	.	A	.	1
H06	T	C	C	.	A	.	3
H07	.	.	.	T	C	C	.	.	.	1
H08	T	.	.	G	.	.	C	.	.	.	G	.	C	.	.	.	1
H09	G	.	A	G	T	C	C	C	.	A	A	1
H10	G	.	A	C	A	.	1
H11	G	.	A	T	A	C	1
H12	G	G	A	G	1
H13	G	G	A	C	C	.	A	.	1
H14	T	C	C	C	.	.	.	1
H15	.	.	T	A	A	C	.	.	.	T	C	C	T	C	1
H16	G	.	A	T	C	C	.	A	.	1
H17	C	C	.	A	.	1
H18	G	.	A	C	.	.	.	G	.	C	.	.	.	1
H19	C	C	C	.	.	.	1
H20	T	C	.	.	.	G	.	C	.	.	.	1
H21	T	.	.	A	G	1
H22	T	A	C	1
H23	G	.	T	.	T	.	.	T	C	.	T	T	G	1
H24	G	.	A	T	.	.	.	C	C	.	.	.	1

Legenda: fh, frequência haplotípica

APÊNDICE L - HAPLÓTIPOS DO GENE *ND5* DE *Anopheles albitarsis* s.l E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES ONDE OCORREM AS ALTERAÇÕES NUCLEOTÍDICAS

Posições nucleotídicas						
Haplótipos	69	105	135	225	229	fh
H01	A	A	G	T	A	23
H02	G	1
H03	.	.	.	A	.	4
H04	.	G	A	.	G	1
H05	.	.	A	.	G	1

Legenda: fh, frequência haplotípica

APÊNDICE M - ARTIGOS, LIGADOS AO PROJETO, PUBLICADOS

Artigo 1

da Cruz et al. *Parasites & Vectors* (2021) 14:582
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-05088-4>

Parasites & Vectors

SHORT REPORT

Open Access



First report of the L1014F *kdr* mutation in wild populations of *Anopheles arabiensis* in Cabo Verde, West Africa

Derciliano Lopes da Cruz¹, Marcelo Henrique Santos Paiva^{1,2*} , Duschinka Ribeiro Duarte Guedes¹, Elaine Christine de Souza Gomes³, Sílvia Gonçalves Pires⁴, Lara Ferrero Gomez⁴ and Constância Flávia Junqueira Ayres¹

Abstract

Background: Due to the lack of vaccines, malaria control mainly involves the control of anopheline vectors (*Anopheles* spp.) using chemical insecticides. However, the prolonged and indiscriminate use of these compounds has led to the emergence of resistance in *Anopheles* populations in Africa. Insecticide resistance surveillance programs are less frequent in Cabo Verde than in other African countries. This study aimed to investigate the circulation of the L1014F and L1014S alleles in natural populations of *Anopheles arabiensis* collected from two sampling sites in the city of Praia, Cabo Verde.

Methods: *Anopheles* larvae were collected from the two sampling sites and reared in the laboratory until the adult stage. Mosquitoes were first morphologically identified by classical taxonomy and then by molecular species identification using molecular markers. All *Anopheles arabiensis* were subjected to PCR analysis to screen for mutations associated to resistance in the *Na_v* gene.

Results: A total of 105 mosquitoes, all belonging to the *Anopheles gambiae* complex, were identified by classical taxonomy as well as by molecular taxonomy. Molecular identification showed that 100% of the *An. gambiae* sensu lato specimens analyzed corresponded to *An. arabiensis*. Analysis of the *Na_v* gene revealed the presence of L1014S and L1014F alleles with frequencies of 0.10 and 0.19, respectively.

Conclusions: Our data demonstrated, for the first time, the presence of the L1014F allele in the *An. arabiensis* population from Cabo Verde, as well as an increase in the frequency of the *kdr* L1014S allele reported in a previous study. The results of this study demonstrate the need to establish new approaches in vector control programs in Cabo Verde.

Keywords: Malaria, *Anopheles arabiensis*, Knockdown resistance, *Kdr* mutation

*Correspondence: marcelo.paiva@ufpe.br

² Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Rodovia BR-104, km 59—Nova Caruaru, Caruaru, PE 55002-970, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Artigo 2

Gomes et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:621
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04502-7>

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles*

Elainne Christine de Souza Gomes^{1*} , Derciliano Lopes da Cruz², Maria Alice Varjal Melo Santos², Renata Maria Costa Souza³, Cláudia Maria Fontes de Oliveira², Constância Flávia Junqueira Ayres², Renata Martins Domingos⁴, Maria das Graça da Silva Pedro⁴, Marcelo Henrique Santos Paiva^{2,5} and LÍlian Maria Lapa Montenegro Pimentel³

Abstract

Background: Brazil has the fourth highest prevalence of malaria of all countries in the Americas, with an estimated 42 million people at risk of contracting this disease. Although most cases occur in the Amazon region, cases of an autochthonous nature have also been registered in the extra-Amazonian region where *Anopheles aquasalis* and *An. albitarsis* are the mosquito species of greatest epidemiological interest. In 2019, the municipality of Conde (state of Paraíba) experienced an epidemic of autochthonous cases of malaria. Here we present preliminary results of an entomological and case epidemiology investigation, in an attempt to correlate the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles* with the autochthonous cases of this outbreak of malaria.

Methods: Case data were collected using case report forms made available by the Conde Municipal Health Department. The entomological survey was carried out from July to November 2019. The various methods of capture included the use of battery-powered aspirators, mouth aspirators, Shannon traps, BG-Sentinel traps (with and without dry ice) and CDC light traps. Captured mosquitoes were separated, packaged and sent to the laboratory for sexing and molecular identification of the various species of anophelines. The data were tabulated and analyzed using Microsoft Excel. Spatial analysis of the data was performed using ArcGIS 10 software.

Results: In 2019, 20 autochthonous cases and one imported case of malaria caused by *Plasmodium vivax* were diagnosed, with three cases of relapses. A total of 3713 mosquitoes were collected, of which 3390 were culicines and 323 were anophelines. Nine species of genus *Anopheles* were identified, with the most abundant being *An. aquasalis* (38.9%), followed by *An. minor* (18.2%) and *An. albitarsis* (9.0%). Spatial analysis of the data showed that the area could be considered to be at risk of malaria cases and that there was a high prevalence of *Anopheles*.

Conclusions: The results presented indicate that this extra-Amazonian region has an environment conducive to maintenance of the malaria transmission cycle owing to the wide diversity of *Anopheles* species. This environment in

*Correspondence: elainne.gomes@cpqam.fiocruz.br

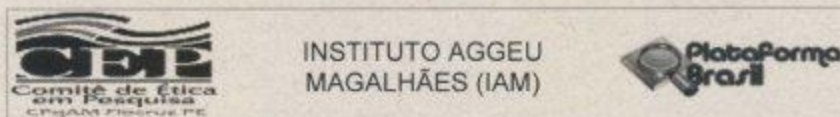
¹ Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, Ministry of Health, Brazil, Av. Professor Moraes Rego, s/n Cidade Universitária, Recife, PE 50740-465, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

ANEXO - PARECER ÉTICO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação dos casos de malária registrados no município do Conde, estado da Paraíba, em 2019, com base em inquérito epidemiológico, clínico, laboratorial e entomológico.

Pesquisador: Lillian Maria Lapa Montenegro Pimentel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15891619.1.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.494.568

Apresentação do Projeto:

Será conduzido um estudo amplo, envolvendo análises clínicas, epidemiológicas e imunológicas de indivíduos residentes do município do Conde, região metropolitana da Paraíba, como também a captura e identificação dos transmissores de malária na região. O município brasileiro do Conde, localizado na Região Metropolitana de João Pessoa, Estado da Paraíba, não é uma área considerada endêmica para a malária. No entanto, em 2019 já foram diagnosticados e notificados 10 casos de malária por *Plasmodium vivax*, considerados autóctones. Essa região é coberta por Mata Atlântica, muito conhecida por receber turista de todo país, e alberga quatro possíveis espécies de vetores da malária.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Investigar os casos de malária registrados no município do Conde - PB em 2019, com base em inquérito epidemiológico, clínico, laboratorial e entomológico.

Objetivo Secundário:

a) Realizar análise epidemiológica e clínico-laboratorial dos casos de malária por *P. vivax* no município do Conde na Paraíba; b) Estimar a prevalência de infecção por *Plasmodium* na vizinhança dos casos já identificados, através de inquérito sorológico e molecular; c) Realizar levantamento das espécies de *Anopheles* que ocorrem na localidade, através de coleta e

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n°
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br

