

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região  
Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax***

**por**

**CLAUDIA MARÍA RÍOS VELÁSQUEZ**

**Belo Horizonte**

**Janeiro/2014**

**TESE DBCM-CPqRR**

**C.M. RÍOS-VELÁSQUEZ**

**2014**

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax***

**por**

**CLAUDIA MARIA RÍOS VELÁSQUEZ**

**Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.**

**Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta**

**Belo Horizonte**  
**Janeiro/2014**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R586s	<b>Ríos-Velásquez, Claudia María.</b>
2014	<p>Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos <i>Anopheles</i> (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por <i>Plasmodium vivax</i> / Claudia María Ríos Velásquez. – Belo Horizonte, 2014.</p> <p>XX, 90 f: il.: 210 x 297 mm.</p> <p>Bibliografia: 93 – 110</p> <p>Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.</p> <p><b>1. Malária/Prevenção &amp; Controle 2. <i>Plasmodium vivax</i> patogenicidade 3. <i>Anopheles</i>/parasitologia 4. Interações Hospedeiro-Parasita/imunologia I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação)</b></p> <p>CDD – 22. ed. – 616.936 2</p>

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região  
Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax***

**por**

**CLAUDIA MARÍA RÍOS VELÁSQUEZ**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (Presidente)**

**Dr. Luciano Andrade Moreira**

**Dra. Luzia Helena Carvalho**

**Prof. Dr. Breno de Mello Silva**

**Prof. Dr. Gustavo Ferreira Matins**

**Suplente: Dra. Giselle de Almeida Oliveira**

**Tese defendida e aprovada em: 22/ 04 / 2014**

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Pimenta, pelo apoio, orientação, ensinamentos, amizade, e por ter me apresentado um assunto científico muito importante e pouco estudado no Brasil.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

Ao Dr. Roberto Sena Rocha, pelo incentivo e apoio constantes.

Ao Dr. Sérgio Luz pelo apoio e por ter aberto portas para que eu pudesse vir trabalhar na Amazônia.

Ao Dr. Wanderly Pedro Tadei por ter disponibilizado seu laboratório e equipe técnica para o desenvolvimento de parte do projeto, e, especialmente, pela amizade, carinho e incentivo para realizar aventuras na Amazônia. Também à equipe de apoio do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: Edineuza dos Santos, Carlos Praia, Gervilane Ribeiro e João Bosco pelo valioso apoio na coleta e identificação dos mosquitos.

Ao Dr. Marcus Lacerda pela colaboração ativa, auxílio para localização de pacientes com malária e estímulo acadêmico e à equipe de diagnóstico e microscopia da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado.

À MSc Keillen Campos e Dr Wuelton Monteiro pela colaboração com parte dos dados de infecção experimental de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium vivax*.

À Dra. Yara Traub-Csekö por ter me recebido no seu laboratório e oferecido toda sua estrutura para treinamento em técnicas de biologia molecular. Também à MSc Marina Kubota pela ajuda quando eu estava no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores.

À Dra. Nágila Secundino pelo acolhimento na sua casa e no laboratório, e pelas críticas e disposição para ajudar a resolver os problemas durante a execução do projeto.

À Dra. Ana Bahia por ter me ensinado as técnicas básicas de biologia molecular necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Giselle de Almeida Oliveira pela valiosa ajuda no desenho dos experimentos de expressão gênica, análise e discussão dos resultados, e revisão da tese.

Ao Dr. José Bento Lima pelo carinho e amizade, e pela colaboração no estabelecimento da colônia de *An. aquasalis* em Manaus, sempre ajudando a solucionar os problemas de forma simples, sincera e alegre.

À MSc. Rejane de Castro Simões, minha amiga e companheira na bancada e nas aventuras de campo.

Ao Dr Thiago Izzo, pelo auxílio na análise, interpretação e discussão dos resultados sobre infecção experimental de mosquitos Amazônicos.

Aos técnicos do ILMD: Patrícia Mello, Ricardo Mota e Diego Leite, pelo apoio no campo e no cuidado das colônias.

À Giovaninha e Perpétua, da gerência do laboratório, pelo apoio e solução de problemas em momentos cruciais do trabalho.

Aos motoristas Ricardo *in memorian*, Alex e Sileno pelo apoio no trabalho de campo.

Ao Joab Nascimento e toda a equipe do Posto de Diagnóstico de Malária do Ramal do Brasileirinho.

À Dra. Edileuza e toda a equipe do Posto de Diagnóstico de Malária de Cacau Pirera.

Ao Gelsony Paez Procópio, Edmar de Oliveira Valente e toda a equipe do Posto de Diagnóstico de Malária do Ramal do Puraquequara.

Ao João Divino e a equipe do laboratório de Diagnóstico de Malária do Hospital João Lúcio.

Ao Aldo Rodrigues, Betty, Iris, Rejane, Wellington, Raimundinha, Vanessa, e toda a equipe do laboratório de Diagnóstico de Malária da FMT HVD.

Ao Dr. Oswaldo Marinotti pelas seqüências de DNA de *An. darlingi*, e pela discussão dos resultados.

Ao pessoal do LEM: Ana Anhe, Andrezza, Helena, Bruno Guedes, Vanessa Freitas, Rafael, Marcele, Mayra, Carolina Cunha, Alessandra Orfano, Caroline Macedo, Luiz Villegas, Juliana, Luciana, Bruno de Mello (se esqueci alguém, por favor me perdoem) pela receptividade e amizade.

À Fabiana e Cris, minhas amigas de curso, pela amizade, carinho, e por todos os momentos que compartilhamos em BH, Foz de Iguaçu e Porto de Galinhas.

Aos alunos, colegas e amigos do laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA): Wilber, Emanuelle, Juciane, Antônio, Arley, Walkyria, Eric, Jéssica, Jeane, Maria, Jordan, Patrícia, Juracy, Geyza, Davi, Val, Leka, George, Vitor, Tati e Elvira pelos momentos de descontração, e por fazer do laboratório um ambiente de amizade e harmonia onde gostamos de trabalhar e compartilhar um pedaço das nossas vidas.

À Salete pelos momentos de descontração, cheios de histórias para ser contadas!!!

Aos meus amigos Felipe Naveca e Rafaela pelo carinho e apoio, mesmo nos domingos de aniversário.

Ao Marcílio, Isabela e Miguel, pela amizade, carinho e os momentos de descontração.

Aos meus amigos da Colômbia: Manuel, Maclau, Mariluz, Lisardo, Walter Yola, Winston, Nelsy, Alba, Aleja, porque, a pesar do tempo e a distância, sempre terão um lugar no meu coração. A base da nossa amizade é mais forte que o tempo e a distância.

À minha amada família, Antonio, Edith, Oscar, Javier, Margarita, Patricia, Dani, Estiven, Camilo, David, Cami, Nanito, Alejo, Jorge e Trini, pelo apoio, incentivo, paciência e amor de cada dia. Vocês são os pilares da minha vida, e o estímulo para continuar adiante.

À Marta, minha querida irmã, por ter sido um exemplo de luta incansável, companheirismo e amor. Todos sentimos muito sua falta, todos os dias das nossas vidas.

À família do Felipe (Sara, Osires, Junior, Edilene, Cavi, Robertinha, Adriano, Ilana, Anna Gabriella, Caio, Lucas, Rebeca, Ruth, Simone, Haiti, tio Chico....), pelo carinho, sinceridade e apoio em todos esses anos.

Ao Felipe Pessoa por ter me acompanhado com muito amor e paciência durante todos esses anos, por estar presente sempre, me apoiando e amando. A vida é melhor quando estamos juntos!!!

## INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Este projeto de tese foi parcialmente financiado pelos seguintes projetos:

1 Mutations in immune signaling genes in natural populations of *Anopheles darlingi* and their relationship to susceptibility to *Plasmodium* infection - **Programa Especial de Cooperação Internacional Ciências sem Fronteiras, processo número 4024756-2012-3.**

2 Avaliação do desenvolvimento do *Plasmodium vivax* e do *Plasmodium falciparum* no *Anopheles aquasalis*: A cronologia de invasão do epitélio, o papel da microbiota e aspectos da resposta imune. **Encomenda PAPES/FIOCRUZ/CNPq, processo número 40768/2012-6.**

3 Insetos vetores: Estudos avançados do processo de interação com patógenos causadores de doenças em humanos. **CNPq Produtividade em Pesquisa - 307745/2011-2.**

4 Resposta imune de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae), vetor de malária na região amazônica, à infecção com *Plasmodium vivax*. **FAPEAM / Edital Universal, processo número 062.00336/2013.**

5 A **FAPEAM** concedeu bolsa de estudos no período de Março/2010 a Fevereiro/2013.

6 **Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz AM) e o Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/ Fiocruz MG):** financiaram parcialmente o projeto.

## **DEDICATÓRIA**

**À minha família e ao Felipe, os pilares da minha vida.**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	
<b>Erro! Indicador não definido.</b>	
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Malária	22
1.2 Os parasitos	25
1.3 Os vetores	27
1.4 Ciclo de transmissão do <i>Plasmodium</i>	32
1.5 Competência vetorial	35
1.6 Infecção experimental	35
1.7 Modelos de infecção para estudos de interação entre parasitos e hospedeiros	37
1.8 Resposta imune do mosquito à infecção com o <i>Plasmodium</i>	38
1.8.1 Via de sinalização Toll	41
1.8.2 Via de sinalização Imd	42
1.8.3 Via de sinalização JAK/STAT	42
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivos gerais	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 MÉTODOLOGIA	50
4.1 Suscetibilidade ao <i>Plasmodium vivax</i> em espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica Brasileira	51
4.1.1 Coleta de sangue e aspectos éticos	51
4.1.2 Determinação da parasitemia do paciente e contagem dos gametócitos	51
4.1.3 Obtenção e cuidado dos mosquitos	51
4.1.4 Alimentação/infecção experimental dos mosquitos usando membrana artificial	53
4.1.5 Confirmação da infecção	54
4.1.6 Análise dos dados	54
4.2 Resposta imune JAK/STAT em <i>An. aquasalis</i> e <i>An. darlingi</i> (Diptera: Culicidae) infectados por <i>P. vivax</i>	55
	X

4.2.1 Alimentação/infecção experimental dos mosquitos usando membrana artificial	55
4.2.2 Confirmação da infecção por presença de oocistos	56
4.2.3 Isolamento do RNA total	56
4.2.4 Síntese do cDNA	56
4.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	57
4.2.6 PCR em tempo real (qPCR)	57
4.2.7 Análise dos dados	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Suscetibilidade ao <i>Plasmodium vivax</i> em espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica Brasileira	60
5.2 Resposta imune JAK/STAT em <i>An. aquasalis</i> e <i>An. darlingi</i> (Diptera: Culicidae) infectados por <i>P. vivax</i>	66
5.2.1 Ativação da via de resposta imune JAK/STAT durante a fase tardia d infecção de <i>An. aquasalis</i> com <i>P. vivax</i>	67
5.2.2 Via JAK/STAT na fase inicial da infecção de <i>An. darlingi</i> com <i>P. vivax</i>	68
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Suscetibilidade ao <i>Plasmodium vivax</i> em espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica Brasileira	71
6.2 Ativação da via de resposta imune JAK/STAT durante a fase tardia d infecção de <i>An. aquasalis</i> com <i>P. vivax</i>	74
6.3 Ativação da via JAK/STAT durante a fase inicial da infecção de <i>An. darlingi</i> com <i>P. vivax</i>	77
7 CONCLUSÕES	78
8 ANEXO	81
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa da porcentagem da população mundial em risco de contrair malária	22
Figura 2 Mapa mostrando as áreas com risco de transmissão de malária no Brasil	24
Figura 3 Casos de malária notificados na Região Amazônica, Brasil, no período de 2000 a 2011	24
Figura 4 Proporção de casos de malária notificados, por espécie, na Região Amazônica, Brasil, 2011	27
Figura 5 Ciclo de vida de <i>Anopheles aquasalis</i>	28
Figura 6 Mapa da distribuição de espécies de anofelinos vetoras de malária, predominantes no mundo	29
Figura 7 Mapa das Américas mostrando a distribuição de <i>An. albitarsis</i> , <i>An. aquasalis</i> , <i>An. darlingi</i> , <i>An. nuneztovari</i> e <i>An. triannulatus</i>	31
Figura 8 Ciclo de transmissão do <i>Plasmodium</i>	32
Figura 9 Ciclo de desenvolvimento do <i>Plasmodium</i> no mosquito: transformações do <i>Plasmodium</i> e tempo de duração de cada fase	34
Figura 10 Desenho do corte longitudinal de um mosquito mostrando os órgãos e tipo de células envolvidas na interação com o <i>Plasmodium</i> e as formas do <i>Plasmodium</i> durante seu ciclo sexual no vetor	40
Figura 11 Vias de sinalização imune Toll, IMD e JAK/STAT	41
Figura 12 Coleta de larvas de mosquitos em campo e criação no laboratório	52
Figura 13 Sistema de alimentação experimental	54
Figura 14 Intestino médio de espécies de <i>Anopheles</i> com oocistos desenvolvidos após infecção experimental	61
Figurae 15 Comparação da suscetibilidade ao <i>P. vivax</i> em espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica infectadas com sangue total (WB)	62
Figure 16 Comparação da mediana de oocistos de <i>Plasmodium vivax</i> de espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica infectadas com sangue total (EB) ou soro inativado (ISB)	63

Figura 17 Porcentagem de mosquitos da Região Amazônica infectados com WB com diferentes densidades de oocistos de <i>P. vivax</i>	64
Figura 18 Comparação das taxas de infecção por <i>Plasmodium vivax</i> em espécies de <i>Anopheles</i> da região Amazônica Brasileira, infectadas com sangue total (WB) e soro inativado (IBS)	65
Figura 19 Expressão de STAT, NOS e PIAS em <i>An. aquasalis</i> infectados com <i>P. vivax</i>	67
Figura 20 Expressão de STAT, NOS e PIAS em <i>An. darlingi</i> infectados com <i>P. vivax</i>	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Taxa de infecção e número médio de oocistos produzidos em espécies de *Anopheles* da Amazônia Brasileira infectados com sangue total (WB) ou soro inativado (IBS) 60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**AM:** Amazonas.

**AMG:** Anterior midgut, ou intestino médio anterior.

**AMPs:** Antimicrobial peptides, ou peptídeos Antimicrobianos.

**BF:** Blood feed, ou alimentação sanguínea.

**BRP:** bacteria responsive protein, ou proteína responsiva a bactérias.

**cDNA:** Complementary deoxyribonucleic acid, ou ácido desoxirribonucléico complementar.

**CONEP:** Comitê Nacional de Ética em Pesquisa.

**DNA:** Deoxyribonucleic acid, ou ácido desoxirribonucléico.

**FMT HVD:** Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

**FREPs:** Fibrinogen-related proteins ou proteínas do tipo fibrinogênio.

**GC:** Gametocyte, ou gametócito.

**GMAP:** Global Malaria Action Plan, ou Plano de Ação Global sobre Malária.

**GNBP:** Gram-negative bacterial-binding proteins, ou Proteínas que se ligam a bactérias Gram negativas

**GOI:** Gen of interest, ou gene de interesse.

**HKG:** House keeping gen, ou gene constitutivo.

**HSD/CD:** Technical Area for Health Surveillance and Disease Prevention and Control of the Pan American Health Organization/ Communicable Diseases, ou Área Técnica da Organização Pan Americana da Saúde para Vigilância da Saúde e Prevenção e Controle das Doenças / Doenças Notificáveis.

**IBS:** Inactivated blood serum, ou soro inativado do sangue

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma.

**IKK:** Quinase do inibidor de NF-kB

**ILMD:** Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz AM.

**Ihd:** Immune deficiency, ou deficiência imunológica.

**INPA:** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

**JAK/STAT:** Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription; ou Janus Kinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição.

**JNK:** Jun-Kinase.

**LRIM:** Leucine-rich repeat immune protein, ou protein de imunidade com repetições ricas em Leucina.

**MAPK:** Mitogen activated protein kinase.

**MG:** Minas Gerais.

**mRNA:** Messenger ribonucleic acid, ou ácido ribonucleico mensageiro.

**MS:** Ministério da Saúde.

**NOS:** Nitric oxide synthase ou Óxido nítrico sintase.

**OC:** Oocyst, ou oocisto.

**OK:** Ookinete, ou oocineto.

**OMS:** Organização Mundial da Saúde.

**PAHO:** Pan American Health Organization.

**PAMPs:** Pathogens associated molecular patterns, ou padrões moleculares associados aos patógenos.

**PCR:** Polymerase chain reaction, ou reação em cadeia da polimerase.

**PGRP:** Peptidoglycan recognition proteins ou Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos.

**PBS:** Phosphate buffered saline, ou tampão fosfato.

**PI:** Post-infection, ou após a infecção.

**PIAS:** Protein inhibitor of activated STAT, ou inibidor de STAT ativado.

**PMG:** Posterior midgut, ou intestino médio posterior.

**PNCM:** Programa Nacional de Controle da Malária

**PRRs:** Pattern recognition receptors, ou receptores de reconhecimento padrões.

**qPCR:** Quantitative real time polymerase chain reaction, ou reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

**Rel:** Relish.

**rER:** Expressão relativa dos genes.

**RH:** Relative humidity, ou umidade relativa.

**RNA:** ribonucleic acid ou ácido ribonucleico.

**ROS:** Reactive oxygen species, ou espécies reativas de oxigênio.

**RP49:** Ribosomal Protein 49, ou proteína ribossomal 49.

**S:** Sporozoite, ou esporozoíto.

**SG:** Salivary gland, ou glândula salivar.

**SIM:** Sistema de Informação sobre Mortalidade.

**Sinan:** Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

**Sivep:** Sistema de informação de Vigilância Epidemiológica.

**SOCS:** Suppressor of cytokine signaling, ou supressor da sinalização por citocinas.

**SOD:** Superoxide dismutase, ou superóxido dismutase.

**SOI:** Sample of interest, ou amostra de interesse.

**SOR:** Sample of reference, ou amostra de referência.

**STAT:**

**SVS:** Secretaria de Vigilância em Saúde.

**TEP:** Thioester-containing protein, ou proteína rica em thio-ester.

**Upd:** Unpaired.

**WB:** Whole blood, ou sangue total.

**WHO:** World Health Organization.

## RESUMO

A malária é um problema de saúde pública. O Brasil é o país sul-americano que mais casos aporta todo ano, a maioria deles ocorridos na região Amazônica. Até o presente não há nenhuma vacina eficaz contra a malária. O controle dessa doença baseia-se principalmente no combate vetorial. Um dos desafios atuais é encontrar novas moléculas úteis para bloquear a transmissão da malária no vetor, sendo necessário para isso conhecer a biologia da interação entre os parasitos e seus hospedeiros. A maioria dos grupos de pesquisa utiliza como modelos de laboratórios combinações não naturais de *Anopheles* – *Plasmodium*. Neste trabalho foi avaliada a suscetibilidade ao *P. vivax* em espécies Amazônicas de *Anopheles*, fêmeas de *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l. e *An. triannulatus* s.l. e *An. aquasalis* foram infectadas com *P. vivax* utilizando um sistema de infecção experimental por membrana artificial. Todas as espécies de *Anopheles* estudadas foram suscetíveis à infecção por *P. vivax*, porém a taxa de infecção e o número de oocistos variaram significativamente entre elas. *An. aquasalis* (Spearman rho = 0.255, n = 386, p < 0.01) e *An. darlingi* (rho = 0.518; n = 54, p < 0.01) mostraram uma correlação positiva entre o número de gametócitos e o número de oocistos formados. Também foi avaliada a via JAK/STAT de resposta imune em *A. aquasalis*, durante a fase tardia da infecção, e em *A. darlingi*, no início da infecção. A expressão dos genes STAT, PIAS e NOS foi avaliada por q-PCR. Em *An. aquasalis* a expressão dos genes estudados foi induzida a partir de 8 dPI (PIAS e NOS) e 12 dPI (STAT), e começou a diminuir aos 14dPI, provavelmente indicando a indução transitória desses genes na fase tardia da infecção. Em *An. darlingi* não foi observada a ativação dessa via imune durante a fase inicial da infecção com *P. vivax*. Estudos futuros devem ser realizados para saber de que forma os genes regulados pela via JAK/STAT podem modular o desenvolvimento do *P. vivax* em *An. aquasalis*, e outras vias de sinalização devem ser estudadas na resposta de *An. darlingi* à infecção pelo *Plasmodium*.

## ABSTRACT

Malaria is a public health concern. Brasil is the Latin American country with the higher number of cases registered, the most in the Amazon Region. Actually, there is not an effective vaccine against malaria and the disease control is based on vector control. New challenges include finding new molecules to block malaria transmission, making necessary to know the mechanisms involved in the *Plasmodium* – *Anopheles* interactions. The most studies have used laboratory parasite – vector pairs which does not resemble natural parasite – hst interactions. The goals of this work were 1) to compare the susceptibility of five Amazonian *Anopheles* mosquito species to *Plasmodium vivax*, and 2) to evaluate JAK/STAT immune pathway during the late-phase of *A. aquasalis* infection and the early phase of *A. darlingi*. To evaluate the *P. vivax* mosquito susceptibility we fed by membrane feeding assays field populations of *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l. and *An. triannulatus* adult females and, *An. aquasalis* from colony. All the *Anopheles* species were susceptible to *P. vivax* infection, although the infection rate and oocyst numbers were significantly different among them. There was a positive correlation between the density of gametocytes and the infection rate in *An. aquasalis* (Spearman rho = 0.255, n = 386, p < 0.01) and *An. darlingi* (rho = 0.518; n = 54, p < 0.01). *Anopheles aquasalis* had high infection intensity, showing that the *An. aquasalis* - *P. vivax* pair is a feasible laboratory model. To evaluate the expression of STAT, PIAS and NOS in *An. aquasalis* and *An. darlingi* was used qPCR method. In *An. aquasalis* the studied genes were induzed since 8 dPI (STAT) and 12 dPI (both PIAS and NOS), and was diminishing at 14dPI, probably indicating that JAK/STAT activation in later phases of *P. vivax* infection is transient. In *An. darlingi* the genes STAT, PIAS and NOS were no expressed during the early phase of the infection with *P. vivax*. The role of JAK/STAT pathway, in later stages of *P. vivax* infection of *An. darlingi*, remains to be investigated.



## 1.1 Malária

A malária, conhecida também como “paludismo”, é uma doença infecciosa febril aguda cujos sintomas são dores de cabeça, abdominal, nas costas e no corpo, fraqueza, febre alta, calafrios, tontura, náuseas e vômitos. Normalmente, os sintomas aparecem entre 10 e 15 dias após a picada do mosquito infectado, e se a doença não for tratada a tempo, pode desencadear complicações e até causar a morte (WHO, 2013a).

Em 1880, Alphonse Laveran descobriu o parasito causador da malária e, em 1897, Ronald Ross demonstrou que o vetor era um mosquito (revisado por Sherman, 1998). Entretanto, após mais de um século desses descobrimentos, a malária continua sendo um grande problema de saúde pública. Atualmente, um terço da população mundial está em risco de contraí-la.

No mundo, há um total de 104 países endêmicos, localizados nas regiões tropicais e subtropicais da África (43), Américas (21), Leste do Mediterrâneo (10), Europa (8), Sudeste da Ásia (10) e Leste do Pacífico (10) (Figura 1). Em 2012, foram registrados aproximadamente 219 milhões de casos clínicos e 627.000 mortes. Essas cifras mostram uma redução global de casos de 25% desde o ano 2000. Entretanto, a maioria desses casos foi registada no Continente Africano, onde o controle da doença é dificultado pela falta de programas de vigilância, diagnóstico, tratamento e controle efetivos (WHO, 2013b).

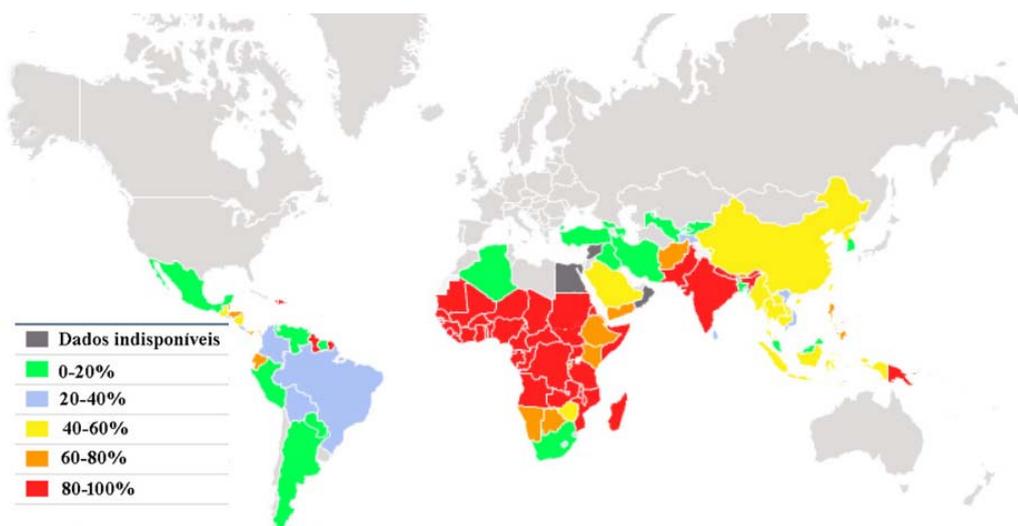


Figura 1. Mapa da porcentagem da população mundial em risco de contrair malária (fonte: WHO, 2013c).

As Américas apresentam 21 países endêmicos para malária. Em 2012 foram registrados aproximadamente 469.000 casos confirmados, a maioria deles na bacia Amazônica, que cobre quase 40% da América do Sul e envolve nove países (WHO, 2013b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) dos 104 países endêmicos, 79 estão em fase de controle da malária, 10 estão em fase de pré-eliminação e 10 em fase de eliminação. Os cinco países restantes, que não têm transmissão, estão em fase de prevenção da reintrodução da doença (WHO, 2013b). Atualmente, o Plano de Ação Mundial Contra Malária (Global Malaria Action Plan -GMAP) da OMS tem como metas reduzir, até 2015, as mortes por malária a níveis próximos de zero, diminuir o número de casos em 75% e eliminar a malária em mais 10 países (WHO, 2013b).

Segundo a OMS, o Brasil está em fase de controle da malária (WHO, 2013b), com uma média de 422.858 casos por ano, nos últimos 12 anos (MS/SVS, 2013a). Em 2011 foram registrados cerca de 267.000 casos no país, 99,7% deles na região Amazônica. Os estados de Pará, Amazonas, Amapá, Rondônia, Acre e Roraima contribuíram com aproximadamente 98% dos casos (Figuras 2 e 3). O Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde registrou 69 óbitos por malária em 2011 (MS/SVS, 2013b).

Na região Extra-Amazônica foram registrados 914 casos em 2012, principalmente, nos estados de Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (MS/SVS / Sivep malária, 2013). A maioria desses casos é importada, geralmente da região Amazônica e da África. Alguns casos têm sido considerados autóctones transmitidos e mantidos em focos pequenos, especialmente em áreas de Mata Atlântica (Rezende *et al.*, 2009; revisado por Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2013; Neves *et al.*, 2013).

No período de 2000 a 2011 foi observada uma redução de 56,7% dos casos no Brasil. Essa redução é devida, em parte, ao estabelecimento do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Esse programa visa controlar e prevenir a malária de forma permanente através do apoio à estruturação dos serviços locais de saúde, diagnóstico e tratamento precoce da doença, fortalecimento da vigilância e controle vetorial, capacitação de recursos humanos, educação em saúde, comunicação e mobilização social, pesquisa e sustentabilidade política (MS/SVS, 2003).

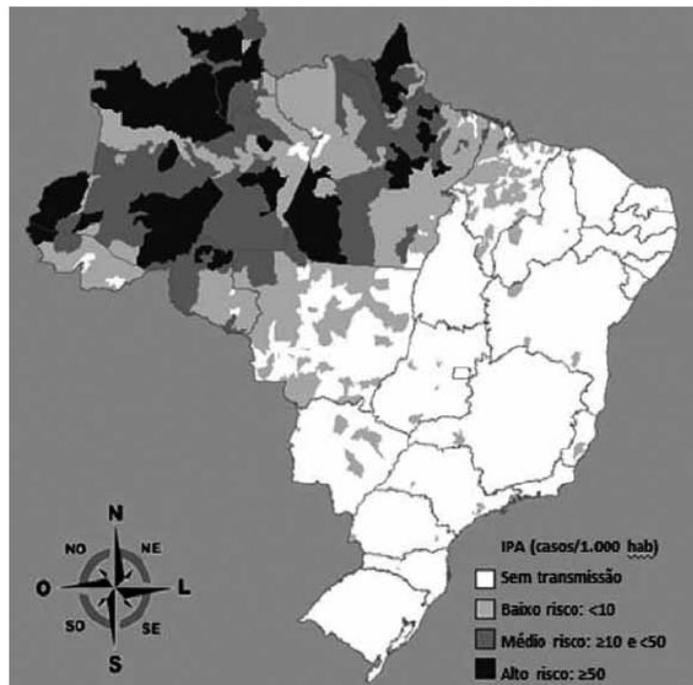


Figura 2. Mapa mostrando as áreas com risco de transmissão de malária no Brasil (modificado de MS/SVS/Sivep-Malária, 2013).

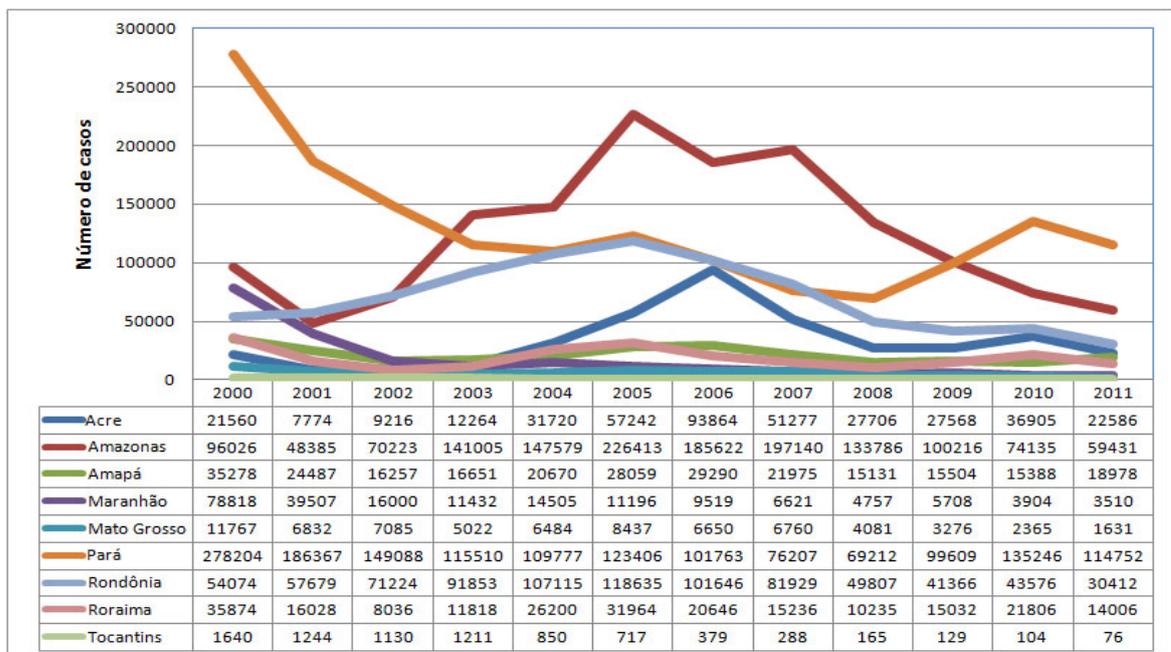


Figura 3. Casos de malária notificados na Região Amazônica, Brasil, no período de 2000 a 2011 (modificado de MS/SVS, 2013a).

Entretanto, se por um lado há uma melhoria das ações do governo para controlar a malária, por outro há uma série de fatos que contribuem para o aumento de casos da doença tais como a ocupação intensa e desordenada das periferias das cidades, o desmatamento para extração de madeira, a criação de gado, a criação de assentamentos rurais e a atividade intensificada de piscicultura (MS/SVS, 2013a).

Embora muitos esforços sejam feitos para controlar a malária, o Brasil e o mundo ainda estão longe de conseguir esse objetivo. Muitos desafios são colocados atualmente, mas, provavelmente, o desenvolvimento de uma vacina efetiva, seja a ferramenta necessária para prevenir a doença (WHO, 2013a).

## 1.2 Os parasitos

A malária é causada por protozoários classificados dentro do Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies de *Plasmodium* causadoras da doença em humanos: *Plasmodium ovale* Stephens 1922, *Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulliga 1933, *Plasmodium falciparum* Welch 1897, *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti 1890 e *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi 1889.

*Plasmodium ovale* ocorre na África Subsaariana, Índia e Indonésia (revisado por Antinori *et al.*, 2012). É uma espécie morfológicamente parecida com *P. vivax*, invade reticulócitos e forma hipnozoítos (ou formas dormentes) no fígado, que podem ser reativados semanas, meses ou anos mais tarde, causando subseqüentes infecções denominadas relapsos. Essa malária é considerada de pouca importância porque os sintomas são brandos e, somente em casos de parasitemia alta podem aparecer episódios febris (Faye *et al.*, 2002). Para *P. ovale*, a taxa de infecção é muito baixa, embora a detecção por métodos moleculares tenha mostrado uma prevalência significativamente maior em algumas regiões (revisado por: Collins e Jeffery, 2005; Mueller *et al.*, 2007; revisado por Antinori *et al.*, 2012).

*Plasmodium knowlesi* é a mais recente espécie de *Plasmodium* humano descrita. É própria de primatas e pode ser transmitida ao homem através da picada de mosquitos vetores. Durante a fase inicial do seu desenvolvimento é similar a *P. malariae*. Causa malária humana

grave no Sudeste Asiático, onde apresenta uma alta prevalência. Invade células vermelhas jovens e maduras e, se não é diagnosticada e tratada cedo, sua parasitemia pode alcançar níveis altos causando quadros graves e risco de morte (Singh *et al.*, 2004; Reyburn e Virk, 2009; Sabbatani *et al.*, 2010). Não há registros de malária por *P. ovale* e *P. knowlesi* nas Américas, onde *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são as espécies responsáveis pelos casos registrados de malária (MS/SVS, 2013a).

*Plasmodium malariae* tem uma ampla distribuição em todas as principais regiões endêmicas do mundo, sendo mais comumente encontrada na África Subsaariana e no Sudoeste do Pacífico onde alcança uma prevalência de 15 a 30% (Mueller *et al.*, 2007; WHO, 2013b). No Brasil, em 2011 essa espécie causou aproximadamente 0,05% dos casos registrados (Figura 4) (MS/SVS, 2013a). Entretanto, o método de diagnóstico por gota espessa (o mais comum) causa hemólise e posterior deformação da célula vermelha, levando a erros na identificação da espécie e, conseqüentemente, a subnotificação (Cavassini *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2007). Cavassini *et al.* (2000) encontraram esse parasito em 10% dos casos registrados em Roraima, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa espécie é conhecida por causar malária branda, no entanto pode causar infecções crônicas e, raramente, síndrome nefrótica crônica que pode levar à morte (Muller *et al.*, 2007).

*Plasmodium falciparum* é a espécie mais agressiva que causa os casos mais graves e a maioria das mortes. Ela afeta células vermelhas jovens e maduras, e está amplamente distribuída nos países endêmicos, sendo mais prevalente na África (revisado por Antinori *et al.*, 2012; WHO, 2013b). As infecções por *P. falciparum* somam aproximadamente 11,9% dos casos registrados no Brasil (Figura 4) (MS/SVS, 2013a).

A malária por *P. vivax* é menos agressiva que *P. falciparum*. *P. vivax* tem uma distribuição mais ampla e é mais prevalente na região tropical e invade preferencialmente células vermelhas jovens (revisado por Antinori *et al.*, 2012). No Brasil, esse parasito causa aproximadamente 86,8% dos casos notificados (Figura 4). Uma importante característica desse parasito é a formação de hipnozoítos, formas parasitárias que permanecem “adormecidas” nas células hepáticas e causam recidivas tardias da infecção.

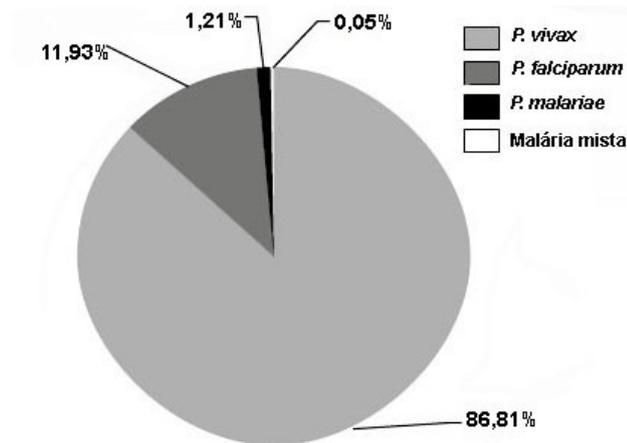


Figura 4. Proporção de casos de malária notificados, por espécie, na Região Amazônica, Brasil, 2011 (modificado de MS/SVS, 2013a).

Desde a década de 1990 têm sido observadas mudanças na epidemiologia da malária na Região Amazônica. Primeiro, uma importante redução do número de casos por *P. falciparum* (de 50% em 1988 a 11,93% em 2011), parcialmente devido à aplicação das diretrizes do PNCM que estabelece a realização do diagnóstico e tratamento no início da infecção, quando ainda não há presença de gametócitos em sangue periférico (MS/SVS, 2013a). Segundo, *P. vivax*, que tradicionalmente estava associado a quadros benignos, nos últimos anos tem causado quadros complicados com desenvolvimento de malária cerebral, disfunção hepática com icterícia severa, lesão pulmonar aguda, síndrome respiratória aguda, edema pulmonar, choque renal, ruptura de baço, trombocitopenia severa, hemorragia, anemia severa, e em alguns casos, tem levado a óbito. Entretanto, a relação da severidade dos casos com a presença do parasito ou a ocorrência de outras patologias concomitantes ainda não está clara (Alexandre *et al.*, 2010; revisão de Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2012; Raposo *et al.*, 2013).

### 1.3 Os vetores

A malária é transmitida por mosquitos vulgarmente conhecidos como carapanãs, muriçocas ou pernilongos. Taxonomicamente eles estão classificados dentro da Ordem

Diptera, Família Culicidae e Gênero *Anopheles*. Como todos os insetos da família Culicidae, os anofelinos têm uma metamorfose completa (holometábolos), ou seja, durante seu desenvolvimento passam pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 5). Os estádios de ovo, larva e pupa são aquáticos e ocupam criadouros de porte mediano a pequeno, providos de água limpa, fria e corrente, em locais sombreados, com presença de raízes e vegetação aquática. Os ovos são elípticos e apresentam expansões bilaterais do exocório formando flutuadores, são postos individualmente na superfície da água, em número de 50 a 500 por cada fêmea. As larvas passam por quatro estágios larvais que se diferenciam entre si pelo tamanho; e se diferenciam de outros gêneros de mosquitos pela ausência de sifão respiratório e por apresentarem uma posição paralela à superfície da água. As pupas têm formato de vírgula e constituem o estágio de transição para a forma adulta. Os adultos são terrestres, e, quando em repouso, ficam em posição oblíqua com a superfície. As fêmeas são hematófagas e precisam do repasto sanguíneo completo para o amadurecimento dos ovos. Fêmeas de algumas espécies de *Anopheles* são estenogâmicas, podendo copular em ambientes confinados como pequenas gaiolas, o que facilita a colonização em condições de laboratório (Forattini, 2002).

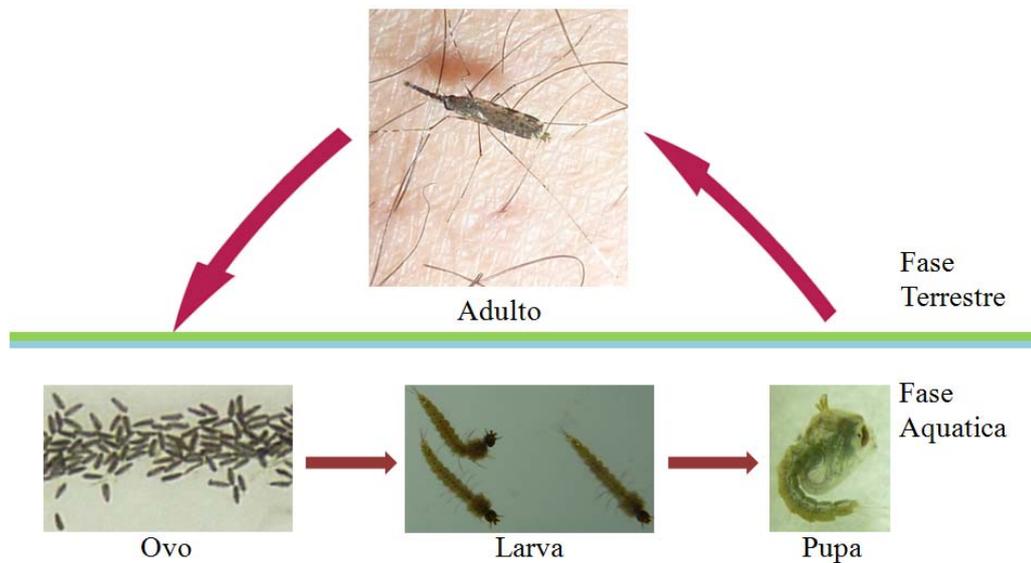


Figura 5. Ciclo de vida de *Anopheles aquasalis*

O gênero *Anopheles* é composto por cerca de 450 espécies, 41 estão envolvidas na transmissão do *Plasmodium* ao homem e, dentre elas, nove estão distribuídas nas Américas: *Anopheles albimanus*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles freeborni*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles pseudopunctipennis* e *Anopheles quadrimaculatus* (Figura 6) (Sinka *et al.*, 2010; 2012; Harbach, 2013).

Para a Região Amazônica têm sido registradas aproximadamente 33 espécies de *Anopheles*, mas *Anopheles darlingi* Root, 1926 é considerada a principal vetora (Davis, 1931; Deane *et al.*, 1948). Outras espécies, encontradas naturalmente infectadas com *Plasmodium* são consideradas vetoras secundárias ou ocasionais e, apesar de estar amplamente distribuídas na Região, sua participação na transmissão da malária é variável entre localidades.

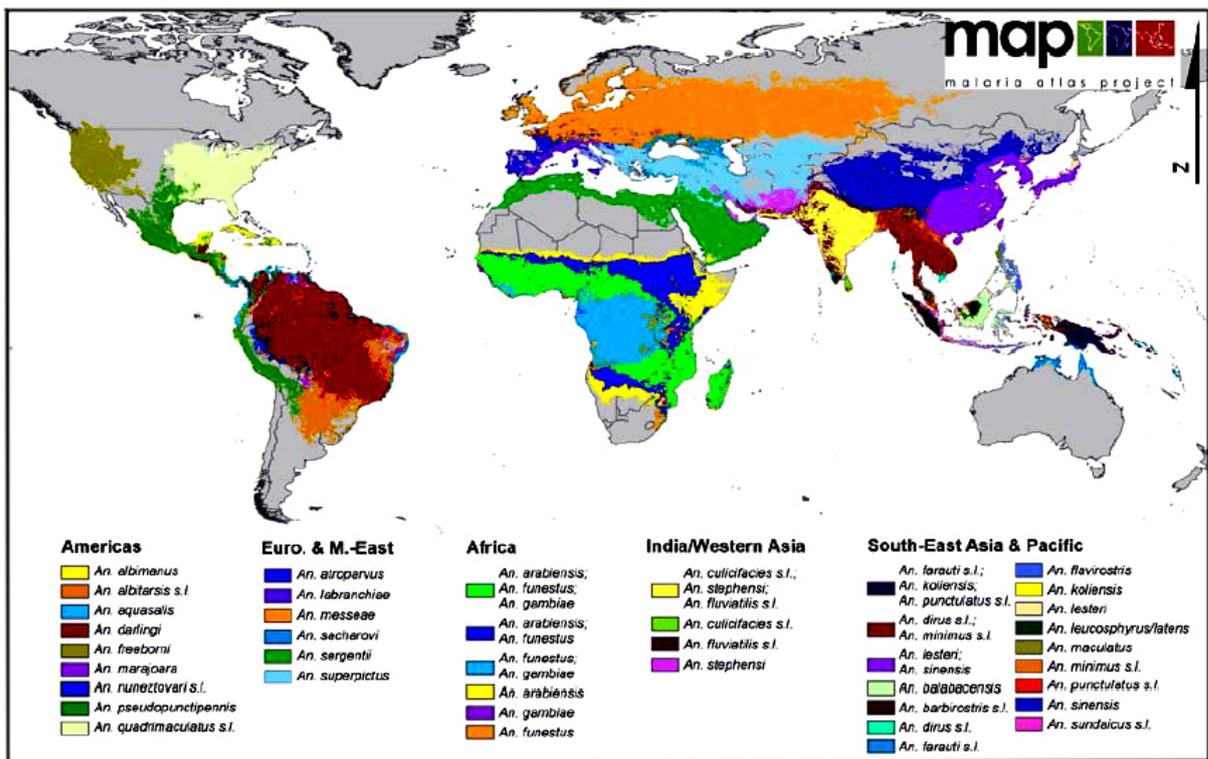


Figura 6. Mapa da distribuição de espécies de anofelinos vetoras de malária, predominantes no mundo (Fonte: Sinka *et al.*, 2012)

*An. darlingi* é encontrado desde o sul do México até a Nicarágua, na América Central; e desde a Colômbia, ao leste da Cordilheira dos Andes, até o norte da Argentina, na América do Sul (Figura 7). É uma espécie de hábito antropofílico e endofílico, com horário de picada crepuscular e noturno. É o principal e mais eficiente vetor de malária humana nas Américas. Tem sido associado a surtos de malária na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (Revisão de Hiwat e Bretas, 2011; Naranjo-Diaz *et al.*, 2013). Na Região Amazônica tem sido encontrada naturalmente infectada com *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, com taxas de infecção que variam entre 0,3 e 22% (Deane *et al.*, 1948; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1992; Tadei e Thatcher, 2000; Póvoa *et al.*, 2001; 2003; 2006; Silva *et al.*, 2006a; Galardo *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009).

*Anopheles aquasalis* Curry, 1932, está distribuído nas regiões costeiras desde a Nicarágua até o sudeste do Brasil, no oceano Atlântico, e no Equador, no oceano Pacífico (Figura 7) (Forattini, 2002; revisão de Hiwat e Bretas, 2011). A atividade hematofágica é no período crepuscular. As fêmeas são mais zoofílicas que antropofílicas e mais exofílicas que endofílicas, embora na região norte do Brasil sejam mais antropofílicas e endofílicas. É considerado principal vetor na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana Francesa, Guiana e em áreas litorâneas do norte e nordeste do Brasil (Deane *et al.*, 1948; Chadee *et al.*, 1999; Zimmerman, 1992; Rubio-Palis *et al.*, 1992). Na Região Amazônica tem sido encontrada naturalmente infectada com *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, com taxas de infecção variando entre 0,26 e 1,28% (Galvão *et al.*, 1942; Deane *et al.*, 1948; Póvoa *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006a).

*Anopheles albitarsis* Lynch Arribálzaga, 1878 faz parte do complexo Albitarsis composto pelas espécies crípticas: *An. albitarsis*, *An. marajoara*, *An. deaneorum*, e uma quarta espécie ainda não descrita. Essa espécie está distribuída desde a Nicarágua até o Norte da Argentina (Figura 7) (Forattini, 2002; revisão de Hiwat e Bretas, 2011). As fêmeas são antropofílicas, embora em algumas localidades apresentem comportamento zoofílico. A hematofagia ocorre em horário crepuscular vespertino. É considerada vetora secundária em algumas localidades da Região Amazônica, onde as taxas de infecção natural variam entre 0,82 e 5,2% (Deane *et al.*, 1948; Póvoa *et al.*, 2001; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2008).

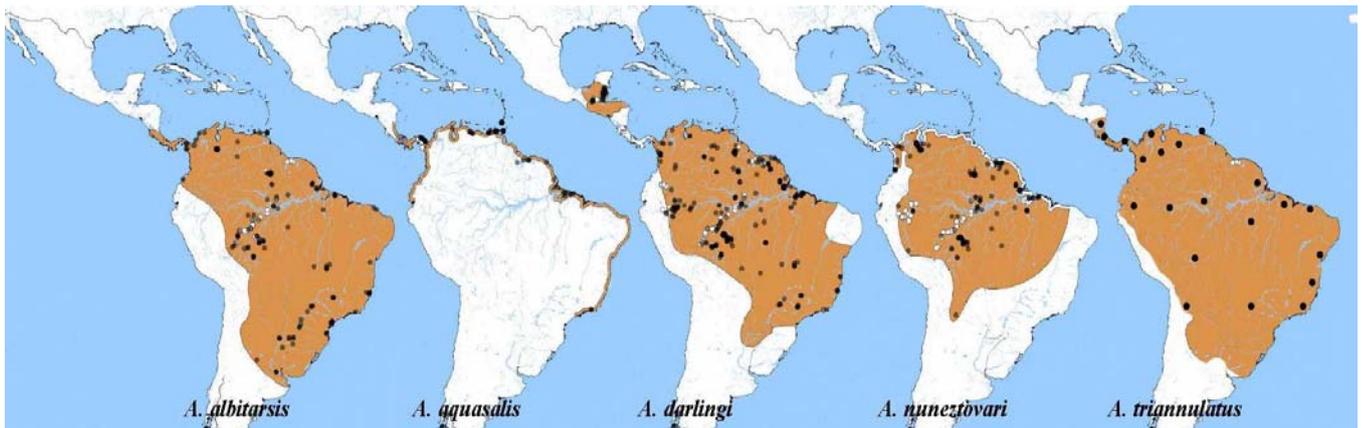


Figura 7. Mapa das Américas mostrando a distribuição de *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus* (Modificado de Hay *et al.*, 2010; Forattini, 2002).

*Anopheles nuneztovari* Gabaldon, 1940 distribui-se ao norte da América do Sul (Figura 7) (Forattini, 2002; revisão de Hiwat e Bretas, 2011). As fêmeas são exofílicas e zoofílicas e o pico de atividade hematofágica ocorre à meia noite. É considerada transmissora de *Plasmodium* na Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992), Perú (Hayes *et al.*, 1987), Guiana Francesa (Dusfour *et al.*, 2012) e Colômbia (Montoya-Lerma *et al.*, 2011; Naranjo-Diaz *et al.*, 2013; Orjuela *et al.*, 2013). Na Região Amazônica Brasileira tem sido encontrada naturalmente infectada por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, com taxas de infecção de 0,089 a 2,6% (Galvão *et al.*, 1942; Deane *et al.*, 1948; Pova *et al.*, 2001; Tadei e Thatcher, 2000; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Galardo *et al.*, 2007).

*Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) está distribuído desde a Nicarágua até o norte da Argentina (Figura 7) (Forattini, 2002; Hay *et al.*, 2010). É essencialmente zoofílico e exofílico. Devido a essas características, ele não tem sido considerado um bom vetor e só em algumas regiões é suspeito de auxiliar na transmissão quando em altas densidades. Na Região Amazônica tem apresentado taxas de infecção natural entre 0,23 e 0,56% (Pova *et al.*, 2001; Galardo *et al.*, 2007).

Na região extra-amazônica, ao sul e sudeste do Brasil, as espécies *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* Dyar & Knab, 1908 e *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* Dyar & Knab, 1906

foram incriminadas na transmissão de malária (Marreli *et al.*, 2007; Rezende *et al.*, 2009). Na região amazônica não existem registros sobre a presença dessas duas espécies.

#### 1.4 Ciclo de transmissão do *Plasmodium*

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, para completar o seu ciclo de vida precisa de dois hospedeiros diferentes: um vertebrado e outro invertebrado. As espécies de *Plasmodium* que causam malária humana durante o seu desenvolvimento passam por duas fases: uma sexual exógena nomeada de esporogônica, na qual ocorre a multiplicação do parasito em mosquitos do gênero *Anopheles*, e outra assexual endógena ou esquizogônica que ocorre no hospedeiro vertebrado.

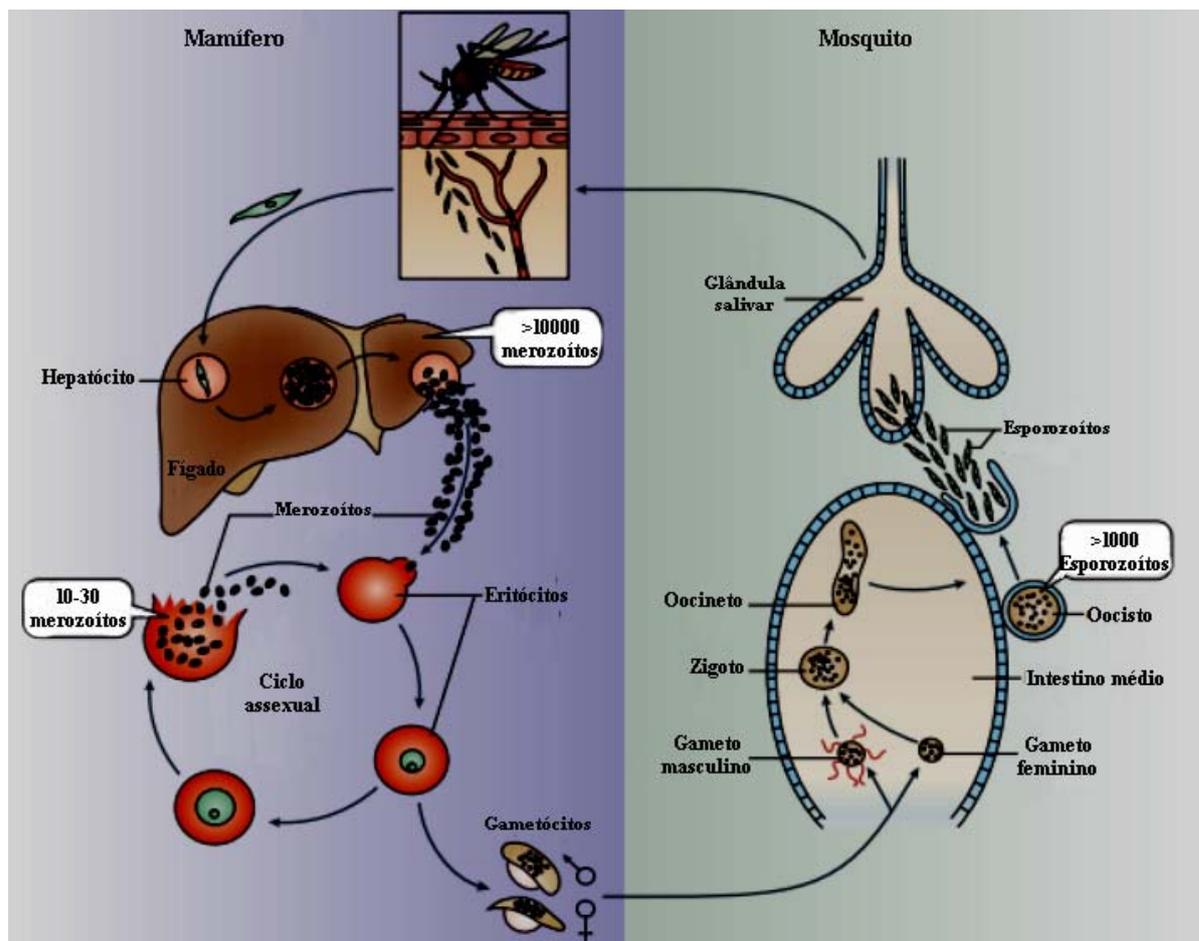


Figura 8. Ciclo de transmissão do *Plasmodium* (modificado de Ménard *et al.*, 2013).

A transmissão do *Plasmodium* começa quando um mosquito infectado inocula, durante o repasto sanguíneo, junto com a saliva, esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam os hepatócitos e se transformam em esquizontes. Esses se replicam e transformam em merozoítos que são liberados na corrente sanguínea onde invadem as células vermelhas se transformando em trofozoítos. Após algum tempo, os trofozoítos se transformam em merozoítos que são liberados novamente na corrente sanguínea. Alguns merozoítos se transformam em gametócitos e outros continuam invadindo células vermelhas e repetindo o ciclo assexuado (Figura 8).

Os mosquitos, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, adquirem gametócitos masculinos e femininos. Dentro do intestino médio, os gametócitos se transformam, por gametogênese, em microgametas (masculinos) e macrogametas (femininos). Os macrogametas saem do eritrócito para produzir um único gameto esférico. A gametogênese masculina envolve três ciclos de replicação de DNA para gerar oito microgametas num processo conhecido como exflagelação (Alano *et al.*, 2007). Duas ou três horas após o repasto infectivo ocorre a fecundação das macrogametas pelas microgametas e a subsequente formação do zigoto. Durante as seguintes 10-30 horas o zigoto se transforma em oocineto móvel, que migra até as células do epitélio do intestino médio, atravessando-as. Quando entra em contato com a lâmina basal do epitélio, no lado da hemocele, se transforma em oocisto. A formação dos oocistos começa 24–48 horas após o repasto e dura de 5 a 10 dias, dependendo da espécie de parasito e de vetor. Dentro do oocisto, por esporogonia, são formados os esporozoítos que, uma vez liberados, circulam na hemocele, migram e invadem as glândulas salivares. Nas glândulas salivares, os esporozoítos se agrupam nas cavidades secretoras e, posteriormente, 15 a 20 dias após o repasto infectante, alcançam os ductos salivares para serem inoculados em um novo hospedeiro no próximo repasto sanguíneo, reiniciando assim uma nova fase do ciclo do parasita (Figura 9) (Pimenta *et al.*, 1994; revisado por Baton e Ranford-Cartwright, 2005; revisado por Mueller *et al.*, 2009; revisado por Alano, 2007).

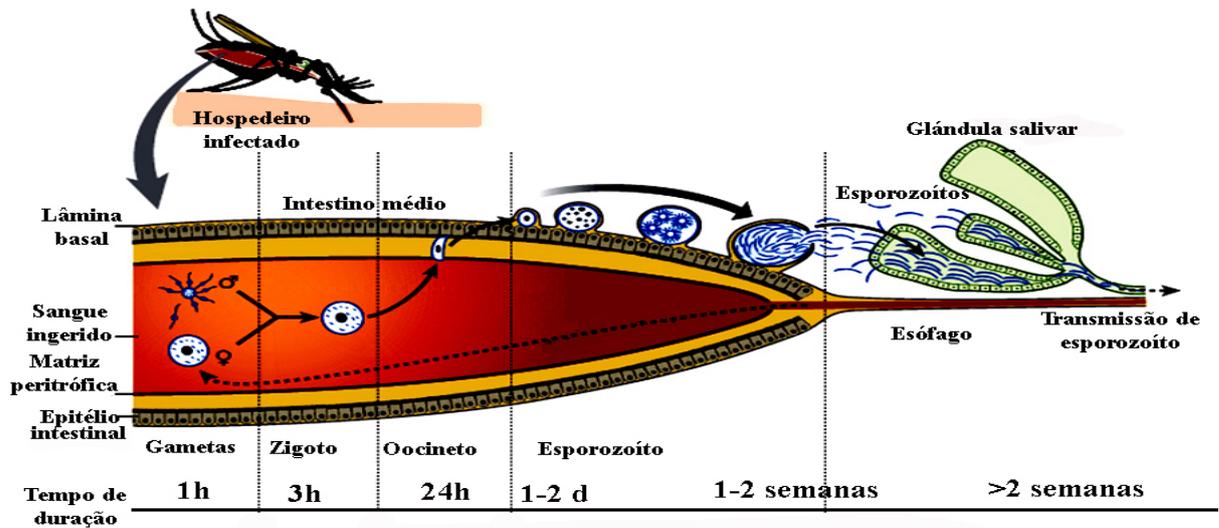


Figura 9. Ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito: transformações do *Plasmodium* e tempo de duração de cada fase (modificado de Aly *et al.*, 2009).

Durante o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito ocorrem diminuição e aumento do número de parasitos dependendo da fase de desenvolvimento. Geralmente, menos de 5% dos macrogametócitos ingeridos no repasto sanguíneo conseguem chegar até a forma de oocisto, havendo um gargalo no ciclo de vida do parasito na fase em que os oocinetos invadem o epitélio intestinal. A maioria dessas perdas pode ser devida à resposta imune do mosquito. Um grande aumento da densidade parasitária ocorre durante o processo de esporogonia, quando cada oocisto pode produzir entre  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  esporozoítos. Deles, só 25% chegará até a glândula salivar (revisado por Baton e Ranford-Cartwright, 2005).

O desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito varia entre espécies, mas em geral demora de 10 a 21 dias (Baton e Ranford-Cartwright, 2005; Angrisano *et al.*, 2012). Nesse trabalho avaliamos a ativação da via de sinalização JAKS/TAT durante as fases inicial e tardia do desenvolvimento de *P. vivax* em *An. darlingi* e *An. aquasalis*. A fase inicial do desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito é considerada como o período que compreende aproximadamente os três primeiros dias da infecção, desde o momento do repasto sanguíneo até a formação dos oocistos. A fase tardia da infecção compreende o período entre a formação completa dos oocistos e a invasão das glândulas salivares pelos esporozoítos, e demora aproximadamente duas semanas após o repasto sanguíneo infectante.

### 1.5 Competência vetorial

A transmissão do *Plasmodium* varia entre espécies e, em muitos casos, entre populações de mosquitos. Algumas espécies têm um papel decisivo na transmissão da malária em áreas endêmicas, por outro lado, outras espécies têm papel secundário com relevância local ou ocasional (Deane, 1986; Zimmerman, 1992; Sinka *et al.*, 2010; 2012).

A importância de uma espécie de mosquito na transmissão depende da sua capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial está relacionada com a intensidade da transmissão do parasito e é quantificada pela densidade dos vetores, a taxa de picada, a quantidade de parasitos por inóculo e a longevidade do mosquito. A competência vetorial é a capacidade intrínseca do mosquito que permite a replicação e transmissão do parasito (Cohuet *et al.*, 2010).

Uma espécie de mosquito é considerada vetora competente quando o *Plasmodium* consegue completar seu ciclo de desenvolvimento desde a fase de gametócito no sangue ingerido até o esporozoíto na glândula salivar. A observação de oocistos bem desenvolvidos no intestino médio do mosquito indica que o *Plasmodium* está estabelecido e que o mosquito é suscetível (Cohuet *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2013).). Esse parâmetro é usado para calcular a taxa de infecção numa população de mosquitos (proporção de indivíduos em uma população de mosquitos que expressa a incidência do *Plasmodium*) e serve para definir a competência vetorial e a dinâmica de transmissão em regiões geográficas e populações diferentes.

Parasitos e vetores tendem a garantir a sobrevivência do hospedeiro pelo tempo suficiente para que o parasito complete seu desenvolvimento e consiga ser transmitido. Entretanto, a presença de patógenos induz uma resposta imune no mosquito que pode limitar a eficiência da infecção.

### 1.6 Infecção experimental

A infecção dos mosquitos com *Plasmodium* ocorre após um repasto com sangue infectado com gametócitos do parasito. Esse repasto pode ser realizado de duas formas: direta, colocando os mosquitos em contato com a pele do portador do parasito; ou indireta,

alimentando os mosquitos com sangue extraído por venipuntura do paciente malárico utilizando um sistema artificial composto por alimentadores de vidro revestidos com uma membrana sintética ou natural. O método de alimentação direta foi desenvolvido por Muirhead-Thomson (1957) e, embora mostre a realidade epidemiológica, não tem total aceitação pelas implicações éticas, o incômodo e reações colaterais causadas pela picada do mosquito.

Para a alimentação indireta são utilizados alimentadores de vidro compostos por uma cavidade central tubular, fechada na parte inferior por uma membrana através da qual os mosquitos se alimentarão. Ao redor desse tubo encontra-se, uma câmara conectada por mangueiras a um banho maria que permite a circulação de água a 39°C para manter o sangue aquecido. Para esse tipo de alimentação, tradicionalmente têm sido utilizadas diversas membranas naturais, tais como pele de pinto, camundongo e intestino suíno (i.e.: Yoeli, 1938; Pothikasikorn *et al.*, 2007). Entretanto, devido às dificuldades de manejo e crescentes restrições ao uso de animais de experimentação, membranas artificiais, tais como celofane (Rutledge, 1964), Parafilm M® (Bemis Company, Inc., Neenah, Wisconsin, USA) (Bonnet *et al.*, 2000; Mourya *et al.*, 2000; Bharti *et al.*, 2006; Paily *et al.*, 2006) e Baudruche (Joseph Long Inc., Belleville, NJ) (Graves, 1980; Awono-Ambene *et al.*, 2001; Sattabongkot *et al.*, 2003) vêm sendo cada vez mais utilizadas na infecção experimental de mosquitos.

Experimentos realizados para comparar a eficiência de ambos os métodos (alimentação direta e por membranas) têm mostrado que ambos os métodos são adequados para avaliar diversos parâmetros da interação entre os parasitos e seus hospedeiros como: a infectividade entre indivíduos portadores de gametócitos, a suscetibilidade dos mosquitos à infecção com *Plasmodium*, taxa de infecção, formação de oocistos e atividade de bloqueio de transmissão de malária (Bonnet *et al.*, 2000; Awono-Ambene *et al.*, 2001; Bousema *et al.*, 2010; Bharti *et al.*, 2006). Os dois métodos têm se mostrado sensíveis permitindo o desenvolvimento da infecção no mosquito, mesmo com parasitemia baixa no paciente malárico doador do sangue (Bonnet *et al.*, 2000; Bousema *et al.*, 2010; Sattabongkot *et al.*, 2003).

### 1.7 Modelos de infecção para estudos de interação entre parasitos e hospedeiros

A malária continua sendo um grande problema de saúde pública no mundo. As estratégias para controlar a endemia não tem sido suficientes e as estatísticas mostram alta morbidade e mortalidade todo ano. Os novos desafios para controlar a malária incluem estratégias para a interrupção do ciclo de transmissão no mosquito, mas isso requer um melhor entendimento das interações específicas entre os plasmódios humanos e seus vetores naturais.

Para estudar a interação entre os parasitos e seus vetores são utilizados modelos de infecção experimental. A maioria desses modelos inclui os parasitos *Plasmodium berghei* (agente causador da malária murina), *Plasmodium gallinaceum* (agente causador da malária aviária) e *Plasmodium falciparum*; e as espécies de mosquitos *Anopheles gambiae* (principal vetor na África), *Anopheles stephensi* (vetor na Índia), *Anopheles albimanus* (vetor nas Américas) e *Aedes aegypti* (modelo experimental para malária aviária) (e.g. Lin *et al.*, 2004; Osta *et al.*, 2004; Barillas-Mury, 2007; Garver *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010). Todas essas espécies são cultivadas/colonizadas em condições de laboratório, facilitando o desenvolvimento das pesquisas.

Diferentes combinações de parasito – mosquito vetor induzem diferentes mecanismos de resposta imune. A produção de óxido nítrico sintase (NOS) é induzida após a invasão das células epiteliais do intestino médio de *An. stephensi* por oocinetos de *P. berghei*, mas não é induzida após a invasão por *P. gallinaceum* (Gupta *et al.*, 2005). Alavi *et al.* (2003) observaram que *An. stephensi*, *An. gambiae* e *Aedes aegypti* transmitem *P. gallinaceum*, entretanto, a formação de oocistos foi alta e eficiente em *An. gambiae* e *Aedes aegypti*, porém a perda parasitária foi alta em *An. stephensi*. Esses exemplos indicam que os mecanismos de resposta à infecção com *Plasmodium* não são universais e sim dependentes das espécies (*Plasmodium* e mosquitos) e populações (genótipos) envolvidas.

Algumas das combinações parasito – mosquito vetor, tais como *P. berghei* – *An. gambiae* (Osta *et al.*, 2004), são puramente experimentais e não ocorrem na natureza, e podem não refletir a real interação entre os parasitos e seus vetores (Böete, 2005). A probabilidade de que a infecção com o parasito cause a morte do hospedeiro é maior entre

combinações não naturais de parasito-mosquito do que entre combinações naturais, aquelas que co-evoluíram ao longo do tempo (Ferguson e Read, 2002). Provavelmente, essa co-evolução entre parasitos e mosquitos favoreceu a seleção de mecanismos para reduzir os impactos negativos sobre a sobrevivência do mosquito aumentando a probabilidade de transmissão do parasito.

*P. vivax* é a espécie de *Plasmodium* mais prevalente na região Amazônica, mas ainda não é cultivada com sucesso em laboratório. Seus principais vetores são *An. darlingi* e *An. aquasalis*, mas só essa última espécie é colonizada em condições de laboratório (Silva *et al.*, 2006b). A combinação *An. aquasalis* (proveniente de uma colônia estável mantida desde 1995 no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artropodes Vetores (Laficave) do Instituto Oswaldo Cruz) e *P. vivax*, proveniente de pacientes maláricos, vem sendo usada pelo nosso grupo como um modelo experimental de transmissão de malária humana para entender os mecanismos de resposta imune ativadas durante a fase inicial da infecção (Bahia *et al.*, 2010; 2011; 2013). O uso de modelos experimentais (e.g. *P. vivax* – *An. aquasalis*) vem fornecendo informações e ferramentas mais próximas da realidade que permitem conhecer as relações parasito-vetor, sua importância epidemiológica e sua possível contribuição para o desenvolvimento de estratégias para reduzir a competência vetorial e a incidência da malária (Bahia *et al.*, 2010; 2011; 2013; Ríos-Velásquez *et al.*, 2013).

### **1.8 Resposta imune do mosquito à infecção com o *Plasmodium***

Os mosquitos, da mesma forma que outros insetos, possuem mecanismos de defesa que os protegem contra organismos invasores. Esses mecanismos são compostos por barreiras estruturais e barreiras imunológicas inatas que podem ser de tipo celular ou humoral (Dimopoulos, 2003; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007; revisado por Leclerc e Reichhart, 2004).

Os insetos carecem de imunidade adaptativa, porém, na última década vem se falando de resposta imune tipo “priming” que é semelhante à memória imune e permite aos insetos acumular uma resposta imune mais efetiva após o segundo contato com o agente invasor. Rodrigues *et al.* (2010) mostraram um aumento na diferenciação e quantidade de hemócitos

que resultou na redução da intensidade da infecção de *An. gambiae* com *P. berghei* quando os mosquitos tinham sido pré-desafiados com bactérias, mostrando a capacidade do sistema imune dos mosquitos de se adaptar modulando a abundância e capacidade de resposta dos hemócitos.

As barreiras estruturais, que evitam a entrada dos microrganismos na hemolinfa, são compostas pelo exoesqueleto, o intestino médio, a matriz peritrófica e o revestimento quitinoso da traquéia (Figura 10) (Dimopoulos, 2003; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007). A ruptura dessas barreiras induz uma série de reações no hospedeiro como a melanização e coagulação na hemolinfa que selam a lesão e previnem a dispersão do agente patogênico (revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007).

O sistema imune inato é um sofisticado sistema de reconhecimento de patógenos ativado quando o agente invasor entra na cavidade corporal e é reconhecido como “não próprio” pelo inseto através da interação entre padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e receptores de reconhecimento padrões (PRRs) do hospedeiro. Os PAMPs podem ser componentes das membranas celulares dos patógenos como peptidoglicanos (PGN) e lipopolissacarídeos (LPS). Os PRRs são peptídeos localizados na superfície das células hospedeiras. Alguns exemplos de PRRs são as proteínas de adesão a bactérias Gram negativas (GNBP), as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP) e as proteínas do tipo fibrinogênio (FREPs) (revisado por Barillas-Mury *et al.*, 2000; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007; Dimopoulos *et al.*, 1997; 1998; 2000; 2002; Christophides *et al.*; 2002).

A interação entre os PAMPs e PRRs desencadeia a ativação de vias de sinalização que regulam: a expressão de moléculas efetoras antimicrobianas (AMPs), a ativação da resposta celular mediada pelos hemócitos que leva a fagocitose, encapsulamento do invasor e morte da célula invadida por apoptose, além da ativação de cascatas de profenoloxidasas que são responsáveis por processos de melanização (revisado por Abraham *et al.*, 2004; revisado por Agaisse e Perrimon, 2004; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007).

Os AMPs são sintetizados principalmente pelo corpo gorduroso e os hemócitos, são secretados na hemolinfa e atuam na membrana do patógeno provocando lise. Em *Drosophila*, podem ser classificados em três grupos de acordo com os organismos alvo: Drosomicinas e Metchnikowinas são ativadas contra fungos; Defensinas são ativadas contra bactérias Gram

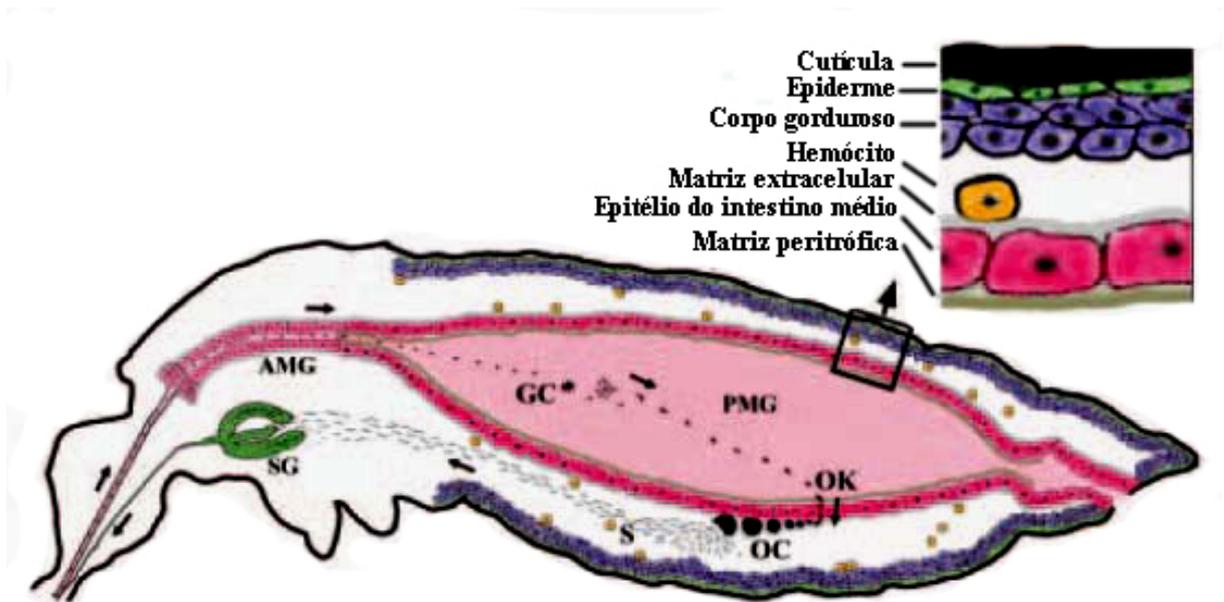


Figura 10. Desenho do corte longitudinal de um mosquito mostrando os órgãos e tipo de células envolvidas na interação com o *Plasmodium* e as formas do *Plasmodium* durante seu ciclo sexual no vetor. AMG: intestino médio anterior, PMG: intestino médio posterior, SG: glândula salivar, GC: gametócito, OK: oocineto, OC: oocisto, S: esporozoíto (modificado de Dimopoulos, 2003).

positivas; e Attacinas, Cecropinas, Dipterocinas e Drosocinas são ativadas contra bactérias Gram negativas. Em mosquitos só têm sido detectadas Defensinas, Attacinas, Gambicinas e Cecropinas (Levashina 2004; Dong *et al.*, 2006; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007; Waterhouse *et al.*, 2007).

A existência de distintas respostas contra diferentes microorganismos indica que a expressão de AMPs é regulada por diferentes vias. As vias de sinalização intracelular são bem conservadas entre animais. As mais conhecidas são Toll, Imd (immuno deficiency) e JAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription) (revisado por Leclerc e Reichhart, 2004; revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007).

**1.8.1 Via de sinalização Toll** - Essa via é ativada por fungos e bactérias Gram positivas, porém ela tem sido implicada na defesa contra vírus em *Drosophila* e contra *P. berghei* em *An. gambiae*, *An. stephensi* e *An. albimanus* (Xi *et al.*, 2008; Christophides *et al.*, 2002; Frolet *et al.*, 2006; Garver *et al.*, 2009; Revisado por Cirimotich *et al.*, 2010). Os PGRPs detectam o patógeno e estimulam uma cascata de serino proteases que ativam a proteólise do ligante extracelular Spatzle, que se liga ao receptor de membrana Toll, e desencadeia a fosforilação de Cactus e a liberação de fatores de transcrição Rel 1 (NF- kappaB-like), originalmente descritos como Gambif1 (Barillas-Mury *et al.*, 1996), ortólogos de Dorsal em *Drosophila*, que entram no núcleo e induzem a expressão de genes como TEP (thioester-containing protein), LRIM (leucine-rich repeat immune protein), entre outras (Figura 11) (revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007).

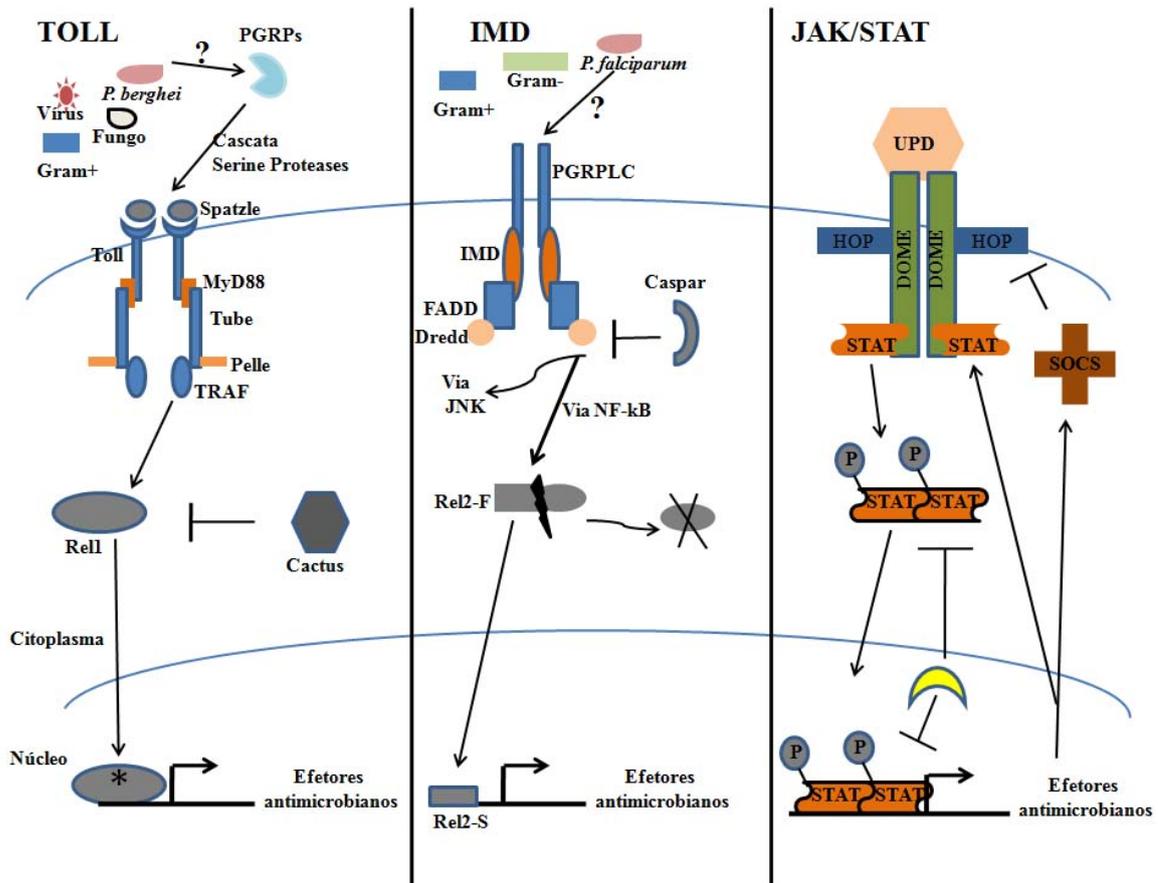


Figura 11. Vias de sinalização imune Toll, IMD e JAK/STAT. Nas vias Toll e Imd são apresentados os fatores detectados na defesa imune contra *Plasmodium* (Modificada de Cirimotich *et al.*, 2010) e na via JAK/STAT são mostrados os fatores detectados na resposta imune de *Drosophila* a agentes patogênicos (modificada de Souza - Neto *et al.*, 2009).

**1.8.2 Via de sinalização Imd** – Essa via foi inicialmente definida pela identificação de uma mutação nomeada *immune deficiency (imd)* - deficiência imune – que diminuía a expressão de vários peptídeos antibacterianos em *Drosophila*. Ocorre quando um patógeno é detectado por PGRPs de membrana. Após a detecção dos patógenos o PGRP recruta o adaptador Imd que interage com dFADD e se une à caspase Dredd. Dredd é clivado após a fosforilação de Relish pelo IKK. Essa interação de caspases e kinases leva à divisão funcional da via: uma ramificação usa JNK para ativar o fator de transcrição AP-1 e a outra ativa NF-kappaB e termina com o processamento do fator de transcrição Rel2 (Figura 11) (revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007).

A via Imd é ativada na resposta imune de *An. gambiae* contra *P. falciparum* e *P. berghei*, e é mediada pela ativação de moléculas efetoras, responsáveis pela morte do parasito (Dong *et al.*, 2006; Frolet *et al.*, 2006; Garver *et al.*, 2009; 2012; Revisado por Cirimotich *et al.*, 2010; Blumberg *et al.*, 2013). A via JNK é importante na regulação da infecção de *An. gambiae* com *P. berghei* e identificaram a indução da expressão das enzimas HPX2 e NOX5 que potencializam a nitração do epitélio intestinal em resposta à invasão por *Plasmodium* e regula a expressão dos genes efetores (TEP1 and FBN9) que participam nessa resposta (Garver *et al.* 2013).

**1.8.3 Via de sinalização JAK/STAT-** A via de resposta JAK/STAT (Janus Kinase / transdutores de sinal e ativadores de transcrição) foi identificada inicialmente pelo seu papel na segmentação embrionária em insetos. Essa via tem um papel importante na resposta antiviral em mamíferos (Dupius *et al.*, 2003; Karst *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2005), na imunidade e desenvolvimento em *D. melanogaster* (Arbouzova e Zeidler, 2006), na imunidade dos insetos após infecção com vírus, bactérias e plasmódios (Bahia *et al.*, 2010; Barillas-Mury *et al.*, 1999; Dostert *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2009; Molina-Cruz *et al.*, 2008; Souza-Netto *et al.*, 2009). A participação de STAT na imunidade de insetos foi comprovada em *Anopheles* quando observado que após um desafio imune, essa proteína acumulava-se no núcleo (Barillas-Mury *et al.*, 1999). Em *An. gambiae* foi comprovada a ativação da via JAK-STAT em resposta ao desafio com *P. berghei* e *P. falciparum* (Gupta *et al.*, 2009) e em *Ae. aegypti* a Dengue Virus 2 (Souza-Netto *et al.*, 2009).

Em *D. melanogaster* essa via é ativada por citocinas (IFN- $\gamma$ , Unpaired-3 -Upd-3), que se unem a receptores transmembrana Domeless, os quais, através do JAK kinase *Hopscotch* sinalizam a ativação de STAT (revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007; Gupta *et al.*, 2009; revisado por Agaisse e Perrimon, 2004). Em *An. gambiae* têm sido identificados dois fatores de transcrição STAT (STAT-A e STAT-B). STAT-B regula a transcrição de STAT-A. STAT-A migra para o núcleo, e desencadeia a regulação da expressão de moléculas efetoras (Figura 11) (revisado por Lemaitre e Hoffman, 2007; Cirimotich *et al.*, 2010).

STAT regula a ativação transcricional de óxido nítrico sintase (NOS). Para prevenir a toxicidade do hospedeiro essa via é regulada por supressores de sinalização de citocinas (suppressor of cytokine signaling - SOCS) e inibidores de STAT ativado (protein inhibitor of activated STAT - PIAS). Ao mesmo tempo, a transcrição de mRNA de SOCs são regulados por STAT (Figura 11) (Wormald e Hilton, 2004; Gupta *et al.*, 2009).

Outros genes detectados em *Drosophila* que são regulados pela via JAK/STAT são os Tep1 e os genes de estresse Turandot, cuja regulação transcricional é complexa tendo a participação de outras vias como a Imd e MAPK (protein kinase mitogeno-activated) (Agaisse & Perrimon, 2004)



Atualmente as medidas de controle mais usadas contra malária são: diagnóstico e tratamento precoce, uso de mosquiteiros impregnados e borrifação intradomiciliar com inseticidas químicos. O uso dessas ferramentas tem aproximado muitos países da fase de controle da doença, especialmente nas Américas. Entretanto, a falta de estruturação de programas de vigilância e controle em alguns países, e a aparição de resistência às drogas existentes e aos inseticidas podem desencadear um aumento na morbidade e mortalidade (WHO, 2013b). Portanto, é indispensável realizar esforços intensificados para desenvolver ferramentas alternativas para o controle da malária, antes que as atuais medidas de intervenção deixem de ser efetivas.

Um dos desafios atuais é encontrar novas moléculas ou drogas que possam ser utilizadas para bloquear a transmissão ou controlar a malária. O ponto chave para a interrupção da transmissão da doença é a elucidação dos mecanismos biológicos, fisiológicos e moleculares que estão envolvidos na infecção dos mosquitos com o *Plasmodium*.

Na Região Amazônica Brasileira é registrado o maior número de casos de malária e a maior diversidade de espécies de *Anopheles*, muitas das quais têm sido encontradas naturalmente infectadas com o parasito, mas só uma (*An. darlingi*) é considerada vetora principal, e duas (*An. albimanus* e *An. aquasalis*) vetoras secundárias em algumas localidades. O papel de outras espécies de *Anopheles* na transmissão de malária na Amazônia ainda não foi esclarecido. Portanto, nesse trabalho decidimos avaliar a suscetibilidade ao *P. vivax* em espécies silvestres de *Anopheles* mais frequentemente encontradas nos arredores da cidade de Manaus. Essa suscetibilidade foi comparada com a de *An. aquasalis*, vetor nas regiões litorâneas do Brasil, e facilmente colonizada em laboratório.

Um fator importante que determina a infectividade de *Plasmodium* para o mosquito é a imunidade. A maioria dos estudos para avaliar a resposta imune do mosquito ao *Plasmodium* tem utilizado modelos de laboratório compostos pelas espécies de mosquitos *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. albimanus* e *Ae. aegypti*, e os parasitos *P. berghei*, *P. gallinaceum* e *P. falciparum* (e.g. Lin *et al.*, 2004; Barillas-Mury, 2007; Garver *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010). Essas combinações de parasitos e vetores são implementadas em laboratório, facilitando os estudos sobre interação patógeno – hospedeiro. Entretanto, estudos sobre o custo no *fitness* induzido pela infecção e a expressão de genes de resposta imune têm

mostrado que os mecanismos de defesa ou as respostas à infecção não são iguais entre todos os modelos usados (Ferguson e Read, 2002; Gupta *et al.*, 2005; Cohuet *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2006; Garver *et al.*, 2009). Esses resultados enfatizam a necessidade de se trabalhar com modelos mais próximos dos naturais para esclarecer os eventos do desenvolvimento do plasmódio e as interações entre estes dois organismos. Enfim, as moléculas do inseto que participam no combate dos parasitos precisam ser melhor estudadas.

O Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz MG, vem realizando trabalhos para avaliar a resposta imune dos mosquitos à infecção com *Plasmodium*, utilizando um modelo de malária humana composto por *An. aquasalis* e *P. vivax*. *Anopheles aquasalis*, como mencionado anteriormente, é vetor na região litorânea de alguns países da América do Sul e é criado em laboratório. *Plasmodium vivax* é responsável pela maioria de casos da doença no Brasil e, embora ainda não seja cultivado em laboratório, os trabalhos com essa espécie tendem a aumentar sua importância pelo fato dela ser responsável por casos graves recentes de malária e ser capaz de formar hipnozoítos (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; revisão de Shanks e White, 2013).

Os estudos com *An. aquasalis* – *P. vivax* mostraram que alguns genes aumentam sua expressão após a formação do oocisto (36 horas pós-infecção), indicando que provavelmente há uma grande atividade imune na fase tardia da infecção, depois da formação completa do oocisto. Nós hipotetizamos que deve haver uma exacerbação da resposta imune na fase tardia da infecção, quando o oocisto está maduro e os esporozoítos estão saindo dele e migrando para as glândulas salivares. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar a expressão de genes relacionados com a imunidade na fase tardia da infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*.

Também, considerando a grande importância de *An. darlingi* na transmissão da malária na região amazônica, e a ausência de trabalhos sobre resposta imune dessa espécie de mosquito à infecção com *Plasmodium*, decidimos analisar a via de resposta imune JAK/STAT na fase inicial da infecção com *P. vivax*.

Os resultados do estudo serão de grande importância para o conhecimento das moléculas envolvidas na interação parasito – hospedeiro e dos fatores que as regulam, especialmente pelo uso de modelos de transmissão experimental. Algumas moléculas chave

poderão ser utilizadas como alvo para novas estratégias de controle ou bloqueio da transmissão da malária, por meio da produção de insetos manipulados geneticamente, potencialmente mais resistentes a patógenos; ou com deleção de moléculas importantes para invasão e colonização de tecidos pelo parasito; ou com expressão de moléculas de combate aos parasitos.



### 3.1 Objetivos gerais

3.1.1 Avaliar a suscetibilidade de espécies de *Anopheles* da Região Amazônica Brasileira ao *P. vivax*.

3.1.2 Estudar a ativação da via de resposta imune JAK/STAT em *An. aquasalis*, na fase tardia da infecção e em *An. darlingi* na fase inicial da infecção por *P. vivax*.

### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Comparar a frequência (taxa de infecção) e eficiência (desenvolvimento de oocistos) da infecção por *P. vivax* nas espécies de *Anopheles* silvestres com *An. aquasalis* colonizado em laboratório.

3.2.2 Avaliar o efeito da inativação do soro de pacientes na suscetibilidade de espécies de *Anopheles* ao *P. vivax*.

3.2.3 Avaliar a relação entre a quantidade de gametócitos encontrada nos pacientes maláricos e a suscetibilidade de *Anopheles* ao *P. vivax*.

3.2.4 Estudar a expressão de genes da via de sinalização JAK/STAT em *An. aquasalis* de colonizado durante a fase tardia da infecção quando ocorre formação dos oocistos, liberação de esporozoítos no hemocele e invasão das glândulas salivares.

3.2.5 Estudar a expressão de genes da via de sinalização JAK/STAT em *An. darlingi* durante a fase inicial da infecção desde a invasão do intestino médio por oocineto até a formação do oocisto.



## **4.1 Suscetibilidade ao *Plasmodium vivax* em espécies de *Anopheles* da região Amazônica Brasileira**

### **4.1.1 Coleta de sangue e aspectos éticos**

Para os experimentos foi utilizado sangue de pacientes maláricos, infectados com *P. vivax*, diagnosticados pelo método da gota espessa. Os pacientes foram selecionados por serem adultos (>18 anos de idade), residentes na cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas, Brasil, e seus arredores, e por aceitar participar voluntariamente no estudo. Os voluntários assinaram o termo de consentimento como doadores de sangue. Aproximadamente 3mL de sangue foram coletados na veia de cada paciente, e colocados em tubo vacutainer heparinizado. Após a coleta do sangue todos os pacientes foram tratados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT HVD) da cidade de Manaus, ou nos postos de saúde, nos arredores da cidade, onde eles foram diagnosticados, seguindo os procedimentos preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil. Esse projeto tem aprovação pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, 3726).

O sangue coletado foi transportado a temperatura ambiente em caixas de plástico, adequadas para transporte de material biológico.

### **4.1.2 Determinação da parasitemia do paciente e contagem dos gametócitos**

Lâminas com sangue dos pacientes foram preparadas por gota espessa e esfregaço, coradas pelo método de coloração de Giemsa e examinadas por microscopia ótica, em aumento de 100x, para a confirmação da presença de *P. vivax*. Foi realizada a contagem das formas sexuais (gametócitos) e assexuais por 500 leucócitos.

### **4.1.3 Obtenção e cuidado dos mosquitos**

Larvas de mosquitos silvestres foram coletadas no período de abril de 2012 a fevereiro de 2013 em diferentes criadouros, nos arredores da cidade de Manaus: Ramal do Puraquequara (Portela 03°03'16.4"S 59°53'44.0"W; Km 9 Vicinal 03°03'09.1"S

59°52'12.6''W; Carlão 03° 02' 46.33000" 59° 52' 53.90000") e Ramal do Brasileirinho (Raifram 03°02'09.5''S 59°52'15.5''W; Cristo Vive 03°01'33.1''S 59°51'07.7''W). As larvas coletadas foram transportadas para o Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), mantidas em bandejas de plástico com água e alimentadas com ração de peixe até a emergência dos adultos. Os adultos foram alimentados *ad libitum* com solução açucarada 10% (Figura 12).



Figura 12. Coleta de larvas de mosquitos em campo e criação no laboratório. **A e B**: coleta de larvas nos criadouros; **C**: manutenção das larvas no laboratório; **D**: emergência de adultos.

Os adultos emergidos foram identificados como: *An. darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l. e *An. triannulatus* s.l. (Faran *et al.*, 1981; Gorham *et al.*, 1967). Após a identificação, cada espécie foi separada em uma gaiola apropriada. Os adultos de *An. aquasalis*, provenientes de colônia estabelecida desde 1995, foram criados em condições de laboratório desde o estágio de ovo até o adulto.

Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de açúcar 10% e mantidos em condições de laboratório a 26-28°C e 70-80% de umidade relativa. Fêmeas adultas de três a cinco dias de idade foram utilizadas para todos os experimentos. Exemplares de todas as espécies foram montados em alfinete e depositados na Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz, Amazonas).

#### **4.1.4 Alimentação/infecção experimental dos mosquitos usando membrana artificial**

A alimentação/infecção experimental foi feita utilizando alimentadores de vidro cobertos por uma membrana de Parafilm<sup>®</sup> (Bemis Company, Inc., Neenah, Wisconsin, USA) através da qual os mosquitos se alimentaram. Os alimentadores foram conectados a um sistema de mangueiras acopladas a um banho maria através das quais circulava água a 39°C para manter o sangue aquecido (Figura 13). Todas as fêmeas adultas foram privadas de açúcar 12 horas antes da alimentação/infecção. Indivíduos de cada uma das cinco espécies foram separados em dois grupos. Um grupo foi alimentado com sangue total (WB) de pacientes infectados com *P. vivax*. O segundo grupo foi alimentado com o soro inativado do sangue (IBS). O soro foi separado das hemácias por centrifugação a 2.000g por 15 minutos, retirado em microtubo limpo, inativado a 56°C por 60 minutos e finalmente adicionado ao tubo que continha as hemácias e os parasitos.

Após a infecção, os mosquitos completamente ingurgitados foram transferidos para gaiolas e mantidos com solução de açúcar 10% no insetário para o desenvolvimento do parasito.

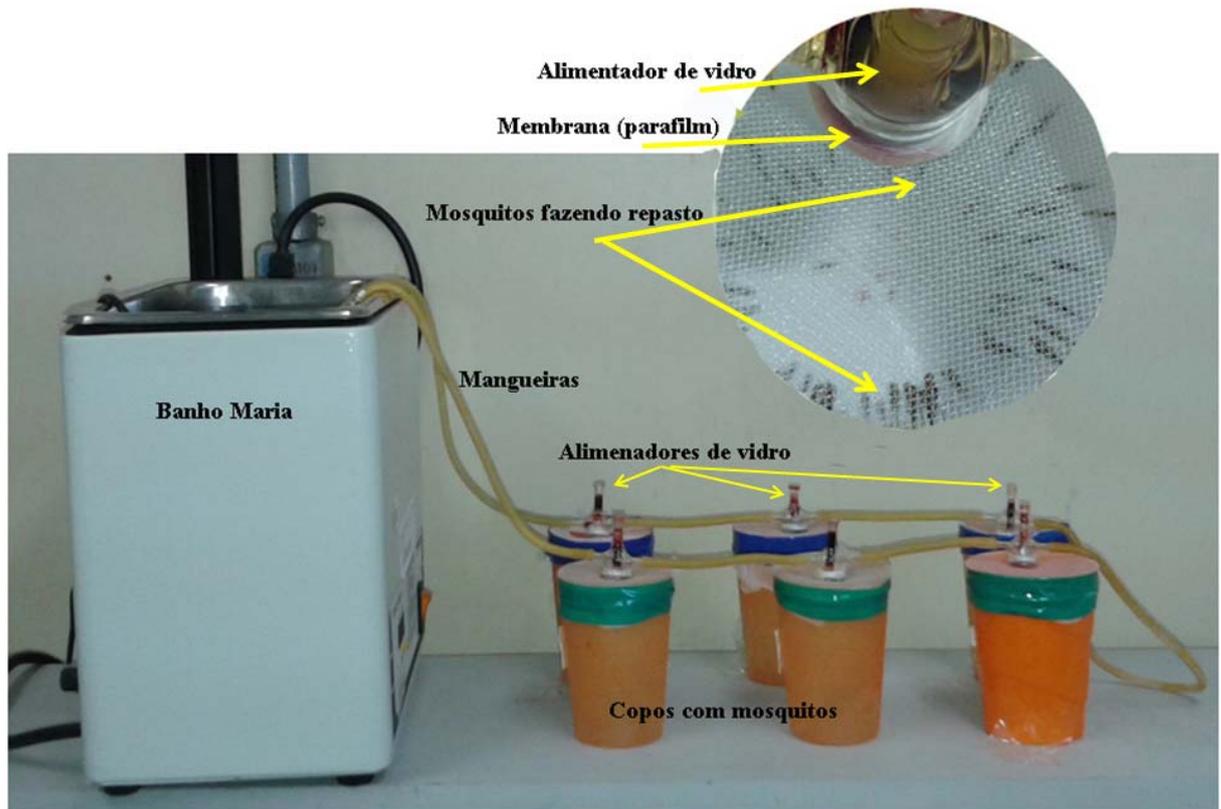


Figura 13. Sistema de alimentação experimental. Detalhe mostrando mosquitos se alimentando através de membrana de Parafilm<sup>®</sup> que cobre o alimentador de vidro.

#### 4.1.5 Confirmação da infecção

Entre cinco e oito dias após a infecção experimental, o intestino médio dos mosquitos foi dissecado em solução salina de fosfato, corado com solução de mercúrio cromo comercial 2% (Merbromin), montado entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio ótico para verificar a presença de oocistos. O número de oocistos foi registrado para cada intestino dissecado.

#### 4.1.6 Análise dos dados

Para esse estudo foi calculada a taxa de alimentação sanguínea como a proporção de fêmeas completamente ingurgitadas após o repasto sanguíneo. A suscetibilidade do *Anopheles*

ao *P. vivax* foi avaliada pela presença e número de oocistos no intestino médio do mosquito. As taxas de infecção foram calculadas dividindo o número de mosquitos infectados (os que possuíam pelo menos um ou mais oocistos) pelo número de mosquitos dissecados. O teste G foi utilizado para comparar a frequência da infecção entre as espécies estudadas conjuntamente e par a par. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças no número de oocistos entre as espécies de mosquitos infectadas, utilizando somente os mosquitos que desenvolveram oocistos. O teste Conover-Inman foi utilizado para comparar o número de oocistos entre todas as espécies de mosquitos estudadas. Foi utilizada Regressão Logística para avaliar se, para cada espécie, a probabilidade de um mosquito se infectar está relacionada com o número de gametócitos no sangue. A Correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar o número de gametócitos no sangue circulante com o número de oocistos.

Testes G foram utilizados para comparar o número de oocistos por mosquito infectado com os gametócitos presentes no sangue infectivo. Os mesmos testes também foram usados para avaliar se fatores sanguíneos afetam a probabilidade de infecção do mosquito ao se comparar a taxa de infecção dos mosquitos alimentados com WB ou ISB. Para todas as análises foi utilizado  $\alpha = 0,05$ . Para as análises foi utilizado o programa R-Project version 2.13.1 (R Core Team).

#### **4.2 Resposta imune JAK/STAT em *An. aquasalis* e *An. darlingi* (Diptera: Culicidae) infectados por *P. vivax*.**

Os procedimentos para coleta de sangue, determinação da parasitemia do paciente, contagem dos gametócitos e obtenção e cuidado dos mosquitos foram descritos nos itens 4.1.1 a 4.1.3.

##### **4.2.1 Alimentação/infecção experimental dos mosquitos usando membrana artificial**

Todas as fêmeas adultas foram privadas de açúcar 12 horas antes da alimentação/infecção experimental. Indivíduos de cada espécie foram separados em dois grupos. Um grupo foi alimentado com sangue de pacientes infectados com *P. vivax* (grupo infectado). O segundo grupo foi alimentado com sangue de voluntário não infectado (grupo

controle). Após a alimentação/infecção os mosquitos completamente ingurgitados foram transferidos para gaiolas, mantidos em condições de laboratório, e alimentados com solução açucarada. Para a normalização dos dados obtidos por PCR em Tempo Real foram usadas fêmeas de dois dias de idade alimentadas somente com solução açucarada.

#### **4.2.2 Confirmação da infecção por presença de oocistos**

Cinco dias após o repasto com sangue infectado, de cada gaiola foi retirado um número de indivíduos correspondente ao 10% do total de fêmeas ingurgitadas. O intestino das fêmeas foi dissecado em solução salina, corado e observado como no item 3.1.2.

#### **4.2.3 Isolamento do RNA total**

Grupos de cinco mosquitos de cada tratamento (infectados, não infectados e alimentados com açúcar) foram colocados em microtubos com 1 mL de Trizol e macerados com pistilo. O RNA total de cada *pool* foi extraído pelo método do Trizol, tratado com kit RQ1 RNase-free DNase (Promega) e purificado com cloreto de lítio, seguindo as instruções dos fabricantes.

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e pela medição da proporção de absorvância OD260/OD280 (o valor de referencia é uma proporção >1,95).

#### **4.2.4 Síntese do cDNA**

O RNA total purificado foi quantificado em Nanodrop. Foram retirados 5µg de RNA total para a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScriptIII RT PCR e oligo (dT)20 50µM, seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a integridade do cDNA, utilizando um iniciador do gene constitutivo de *An. aquasalis* RP49 (Fwd 5'-AGG GAC AGT ACC TGA TGC CCA ACA T-3', Rev 5'-CGC ACG TTG TGG ACG AGG AAC TTC T-3').

Para verificar se as amostras estavam realmente infectadas, foi realizada uma PCR com iniciadores específicos para a detecção de *P. vivax* Pv18S (Fwd 5'-ACA TGG CTA TGA CGG GTA ACG-3', Rev 5'-TGC CTT CCT TAG ATG TGG TAG CTA-3').

Para todas as PCRs foi utilizado o kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os ciclos da PCR foram: 10 minutos a 95°C / 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C / 1 ciclo  $\alpha$  a 16°C. O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio.

#### 4.2.6 PCR em tempo real (qPCR)

Foi realizada qPCR em tempo real, utilizando para as reações a sonda de fluorescência SyberGreen (Power SybrGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems). Para o qPCR foi utilizada uma máquina StepOnePlus (Applied Biosystems). Os ciclos usados na PCR foram: 2 minutos a 50°C / 10 minutos a 95°C / 35 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 63°C. Para a normalização dos genes foi utilizado o gene constitutivo RP49.

Para os experimentos com os genes STAT, PIAS e NOS foram utilizadas 2-3 replicatas biológicas e 2-3 replicatas técnicas/experimentais (vindas de um mesmo *pool*) para os diferentes tempos testados após alimentação/infecção (pós-infecção = PI, pós-alimentação com sangue não infectado = BF). Todos os iniciadores dos genes avaliados para *An. aquasalis* foram desenhados por Bahia *et al.* (2010).

**STAT** Fwd 5'-ctggcggaggcgttgagtatgaaat-3' Rev 5'-cggataaggaaggctcgtttgaat-3'

**PIAS** Fwd 51-tagcagctcacagtatagcctcgat-3' Rev 5'-tccattccaaccaacaacca-3'

**NOS** Fwd 5'-aggatctggcctcaaggaagccga-3' Rev 5'-atcgtcacatgccgcacacgtaca-3'

As sequencias dos iniciadores de *An. darlingi* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Oswaldo Marinotti (University of California Irvine, Irvine, CA):

RP49 Fwd 5'-ACCCGTCATATGCTGCCGTG-3',

RP49 Rev 5'-ACGATGGCCTTGCGCTTCTT-3',

STAT Fwd 5'-CGTCAGAGGTACGCGCAGTT-3',

STAT Rev 5'-CCGCTCGAAGGAGTGTCACG-3',

PIAS Fwd 5'-ACGCTAAGTGATTCGGAAGATGATGG-3',

PIAS Rev 5'-CAGCTGAAGGGTGGCCAATA-3',

NOS Fwd 5'-CGCCACTCATCCTACGCGAG-3',

NOS Rev 5'-ACTTCTCCATCTCGGTTTCGGT-3'.

#### 4.2.7 Análise dos dados

A análise da expressão relativa dos genes amplificados por qPCR, foi feita pelo método de diferença de CT (cycle threshold ou  $\Delta\Delta CT$ ), baseada nas medições de fluorescência na fase logarítmica de crescimento exponencial dos produtos da PCR, quando é esperado um aumento de 2x nos produtos da PCR em cada ciclo (Schefe *et al.* 2006). Todos os dados foram normalizados usando o gene constitutivo RP49.

Para análise dos dados foi utilizado o test ANOVA com múltiplas comparações de Turkey ou o teste Kruskal-Wallis com múltiplas comparações de Dunns. Quando necessário, foram feitas correções de Bonferroni. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0.05$ ). Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.

## **5 RESULTADOS**

---

### 5.1 Suscetibilidade ao *Plasmodium vivax* em espécies de *Anopheles* da região Amazônica Brasileira

No total, 2.449 fêmeas de *Anopheles* e 62 isolados de *P. vivax* de pacientes maláricos foram utilizados para os diferentes experimentos. Somente as fêmeas completamente ingurgitadas foram incluídas nos experimentos (Tabela 1).

O tempo gastado pelas fêmeas para realizar o repasto sanguíneo completo variou entre as espécies. Aproximadamente 64% das fêmeas de *Anopheles aquasalis*, *An. darlingi* e *An. triannulatus* s.l. completaram o repasto em 40 minutos, por enquanto 72% das fêmeas de *Anopheles albitarsis* s.l. e 64% de *An. nuneztovari* s.l. demoraram entre 60 e 80 minutos.

Tabela 1. Taxa de infecção e número médio de oocistos produzidos em espécies de *Anopheles* da Amazônia Brasileira infectados com sangue total (WB) ou soro inativado (IBS).

<b>Mosquitos infectados com sangue total (WB)</b>				
<i>Anopheles</i> <b>Species</b>	Número de amostras gametocitêmicas	Número de intestinos dissecados	Taxa de infecção (%)	Média de oocistos (Min –Max)
<i>An. aquasalis</i>	29	861	44,8	29,4 (1-260)
<i>An. albitarsis</i> s.l.	12	76	44,7	13,3 (1-50)
<i>An. darlingi</i>	17	530	18,3	15,9 (1-150)
<i>An. nuneztovari</i> s.l.	17	106	24,5	7,3 (1-34)
<i>An. triannulatus</i> s.l.	20	260	8,8	3,4 (1-22)
<b>Mosquitos infectados com soro inativado (IBS)</b>				
<i>An. aquasalis</i>	10	201	40,8	22,5 (1-200)
<i>An. albitarsis</i> s.l.	9	40	20,0	5,5 (1-17)
<i>An. darlingi</i>	9	217	28,1	11,9 (1-124)
<i>An. nuneztovari</i> s.l.	9	43	30,2	11,5 (1-80)
<i>An. triannulatus</i> s.l.	10	115	16,5	5,4 (1-29)

Ooc = oocistos, Min = número mínimo de oocistos, Max = número máximo de oocistos.

Mosquitos das cinco espécies estudadas se infectaram com *P. vivax* (Figura 14). A proporção de mosquitos infectados após o repasto sanguíneo foi significativamente diferente entre as espécies estudadas ( $G = 199.1$ ,  $GL = 4$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 15). *An. aquasalis* e *An. albitarsis* s.l. tiveram taxas de infecção muito similares ( $G < 0.01$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.98$ ). *An. aquasalis* mostrou a maior taxa de infecção (44.8%, comparações com as outras espécie,  $G > 18$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.001$ ) seguido por *An. albitarsis* s.l. (44.7%), que foi diferente de todas as outras espécies de mosquitos ( $G > 8.14$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.01$ ). *An. nuneztovari* s.l. teve a terceira maior taxa de infecção (24.5%), e não foi significativamente diferente de *An. darlingi*, cuja taxa de infecção foi de 18.3% ( $G = 2.1$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.148$ ), mas foi diferente de *An. triannulatus* s.l., com 8.8% das fêmeas infectadas ( $G = 14.6$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.001$ ). A taxa de infecção de *An. darlingi* foi significativamente maior que a de *An. triannulatus* s.l. ( $G = 13.1$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.001$ ) (Figura 15).

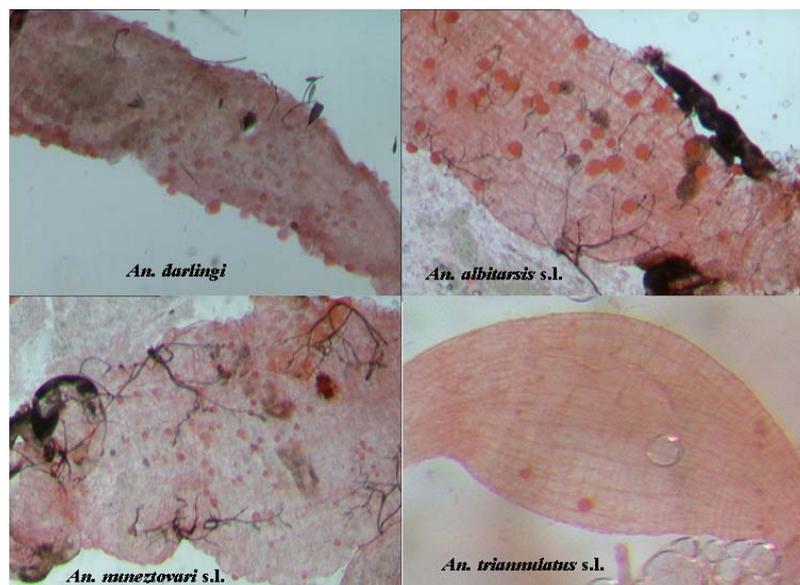


Figura 14. Intestino médio de espécies de *Anopheles* com oocistos desenvolvidos após infecção experimental.

A intensidade da infecção, medida pelo número de oocistos por mosquito infectado, alimentado com WB ou ISB, variou significativamente entre as espécies estudadas ( $K = 48.9$ ,  $GL = 4$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 16). O maior número de oocistos foi contado em *An. aquasalis* (media =  $29.4 \pm 41.7$  S.D, mediana = 12) e foi significativamente diferente das outras espécies analisadas aqui. *An. darlingi* (media =  $15.9 \pm 24.3$  SD, mediana = 7) foi seguida por *An. albitarsis* s.l. (media =  $13.3 \pm 14.8$  SD, median = 6) e por *An. nuneztovari* s.l. (media =  $7.3 \pm 8$  SD, mediana = 5). Não houve diferença significativa no número de oocistos entre *An. darlingi*, *An. albitarsis* s.l. e *An. nuneztovari* s.l. Porém, *An. triannulatus* s.l. teve menos oocistos que todas as espécies estudadas (media =  $3.4 \pm 4.7$  S.D., mediana = 1).

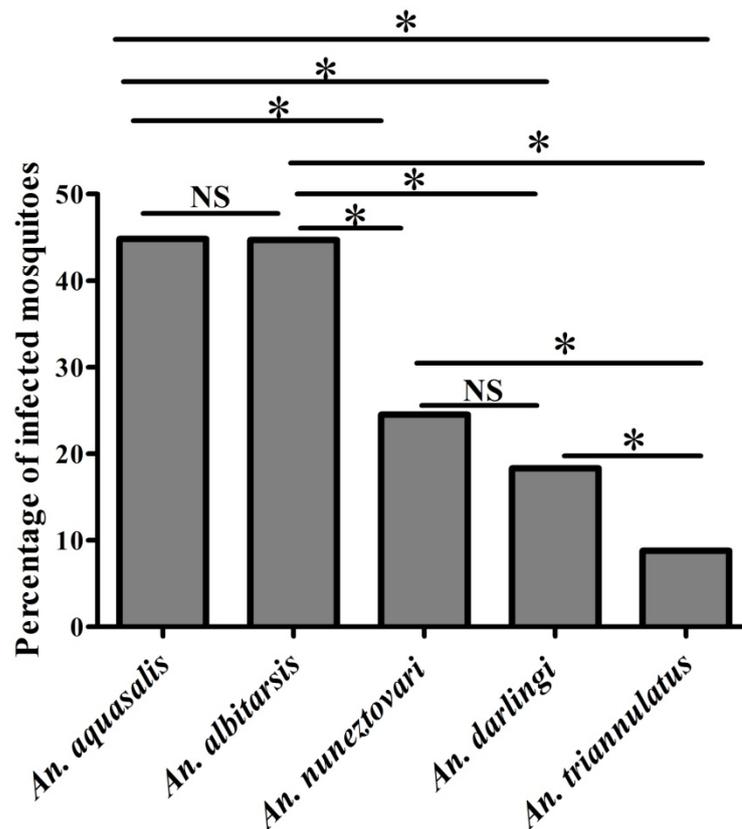


Figura 15. Comparação da suscetibilidade ao *P. vivax* em espécies de *Anopheles* da região Amazônica infectadas com sangue total (WB) (Barras com asterisco indicam diferença significativa entre as espécies analisadas por comparações pareadas, \* =  $p < 0.01$ , NS = no significativo).

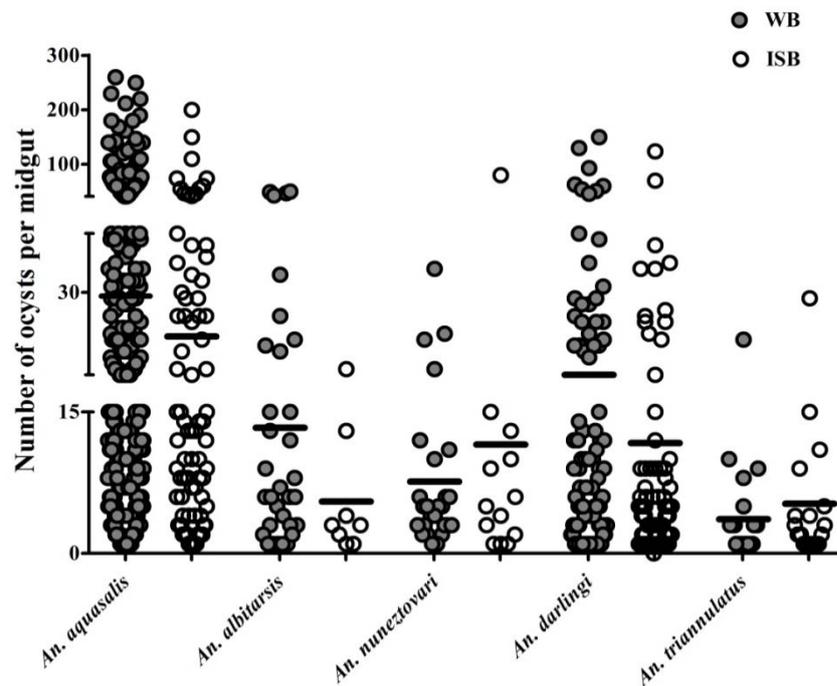


Figura 16. Comparação da mediana de ocistos de *Plasmodium vivax* de espécies de *Anopheles* da região Amazônica infectadas com sangue total (EB) ou soro inativado (ISB).

Para mostrar a distribuição das intensidades da infecção entre os mosquitos infectados com WB, organizamos o número de oocistos em quatro grupos, da seguinte forma: 1–10, 11–50, 51–100 e mais de 100. A comparação da distribuição desses quatro grupos entre os indivíduos de cada espécie é ilustrada na Figura 17. Não foram desenvolvidos oocistos em 69% dos mosquitos e a proporção de indivíduos com zero oocistos foi maior em *An. triannulatus* s.l., seguida por *An. darlingi*, *An. nuneztovari* s.l., *An. aquasalis* e *An. albitarsis* s.l. Aproximadamente 16% dos indivíduos das cinco espécies apresentou de 1 a 10 oocistos e somente 10% foi infectado com 11 a 50 oocistos, sendo *An. triannulatus* s.l. a espécie com a menor proporção observada (0.4%) e *An. albitarsis* s.l. com a maior proporção (21.3%). Somente *An. darlingi* e *An. aquasalis* desenvolveram mais de 50 oocistos, com 1.3 e 7.6% dos indivíduos, respectivamente.

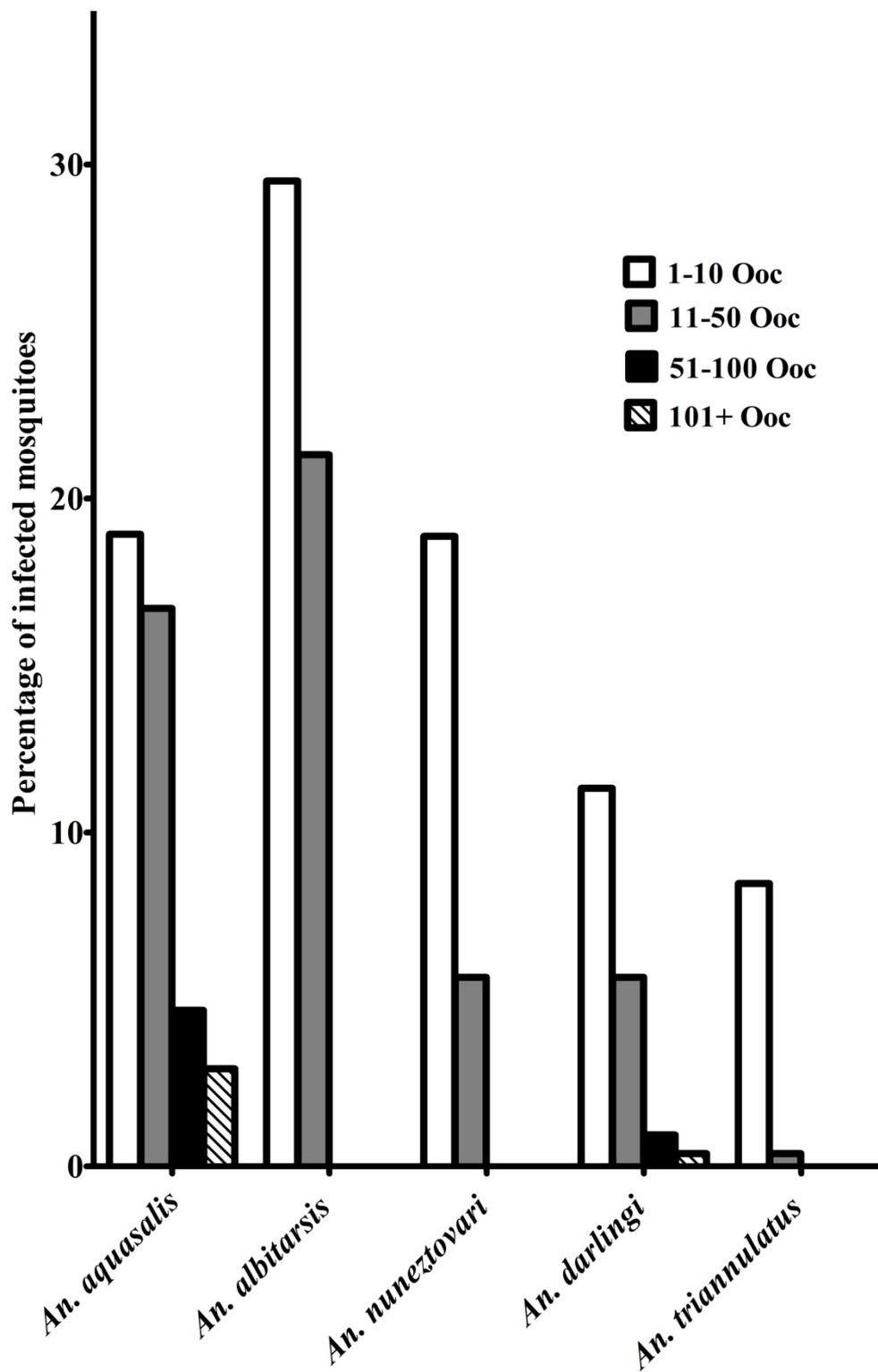


Figura 17. Porcentagem de mosquitos da Região Amazônica infectados com WB com diferentes densidades de oocistos de *P. vivax* (Ooc = número de oocistos).

Quando analisadas todas as espécies estudadas como um grupo único, a inativação de fatores do complemento presentes no soro do sangue não teve efeito na taxa de infecção ( $G = 0.2899$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.585$ ). Porém, quando analisadas as espécies separadamente, a taxa de infecção foi diferente quando utilizado IBS. A inativação do soro não afetou a taxa de infecção de *An. aquasalis* ( $G = 1.08$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.298$ ) nem de *An. nuneztovari* s.l. ( $G = 0.5$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.47$ ), mas aumentou em 53% a taxa de infecção de *An. darlingi* ( $G = 8.55$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.003$ ) e em 87% a de *An. triannulatus* s.l. ( $G = 4.4$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.035$ ). O efeito oposto foi observado em *An. albitarsis* s.l. cuja taxa de infecção diminuiu em 55% após a inativação do soro ( $G = 7.32$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.007$ ) (Tabela 1, Figura 18).

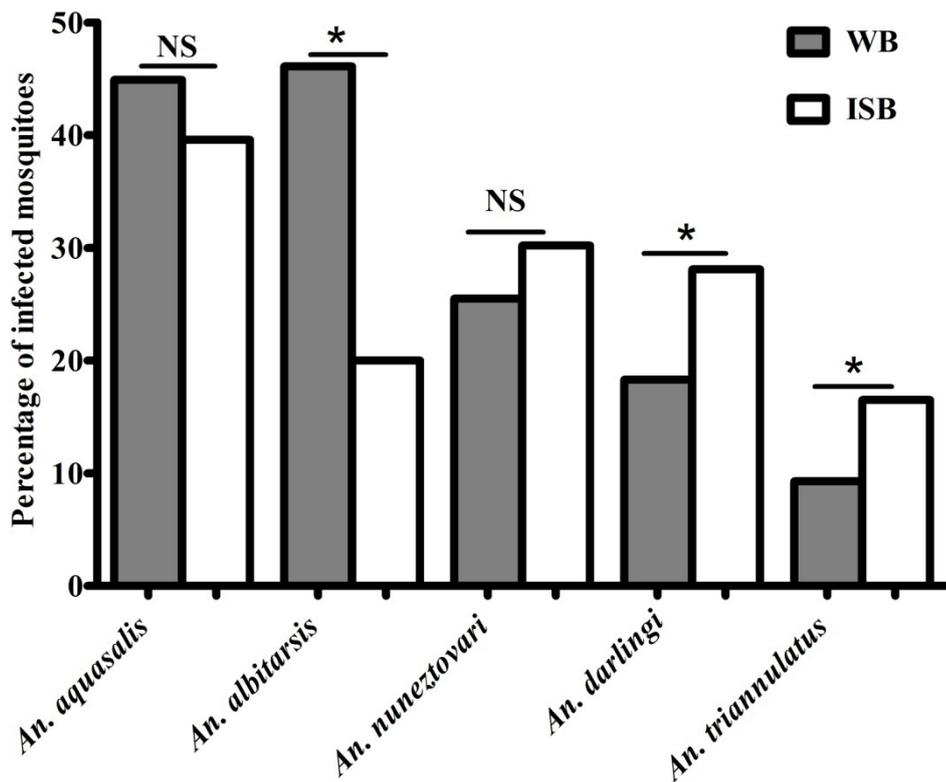


Figura 18. Comparação das taxas de infecção por *Plasmodium vivax* em espécies de *Anopheles* da região Amazônica Brasileira, infectadas com sangue total (WB) e soro inativado (IBS) (\* = Significativo, NS = Não significativo).

Em geral, a intensidade da infecção, representada pelo número de oocistos, variou entre as espécies quando foi utilizado soro inativado para infectar os mosquitos. Não foi observada diferença significativa no número de oocistos formados em *An. aquasalis* ( $U = 1.3$ ,  $p = 2.44$ ) e *An. nuneztovari* s.l. (Mann–Whitney  $U = 0.466$   $p = 0.495$ ), houve um aumento leve no número de oocistos formados em *An. triannulatus* s.l. ( $U = 7.7$ ,  $p = 0.006$ ) e uma diminuição em *An. darlingi* ( $U = 5.01$ ,  $p = 0.024$ ) e *An. albitarsis* s.l. ( $U = 8.27$ ;  $p = 0.004$ ) (Figura 16).

Um total de 17 isolados de *P. vivax* de pacientes maláricos foi utilizado para a infecção experimental de *An. darlingi*, 13 para *An. albitarsis* s.l., 17 para *An. nuneztovari* s.l., 20 para *An. triannulatus* s.l. e 29 para *An. aquasalis* (Tabela 1). Em geral, a relação entre o número de gametócitos / 500 leucócitos e a taxa de infecção dos mosquitos foi observada ( $Z = -8.37$ ,  $p < 0.001$ ). Porém, a relação variou entre as espécies.

Para *An. darlingi* ( $Z = -2.9$ ,  $p < 0.01$ ) e *An. aquasalis* ( $Z = -4.66$ ,  $p < 0.001$ ) a taxa de infecção aumentou quando aumentou o número de gametócitos. Para *An. nuneztovari* s.l., *An. triannulatus* s.l. e *An. albitarsis* s.l. ( $Z < 1.02$ ,  $p > 0.3$  em todos os casos) não houve correlação entre essas duas variáveis. Quando analisados só os indivíduos infectados de cada espécie, *An. aquasalis* (Spearman  $\rho = 0.255$ ,  $n = 386$ ,  $p < 0.01$ ) e *An. darlingi* ( $\rho = 0.518$ ;  $n = 54$ ,  $p < 0.01$ ) mostraram uma correlação positiva entre o número de gametócitos e o número de oocistos formados, mas não houve correlação em nenhuma das outras espécies estudadas ( $p > 0.05$ ).

## **5.2 Resposta imune JAK/STAT em *An. aquasalis* e *An. darlingi* (Diptera: Culicidae) infectados por *P. vivax*.**

No total, a taxa de infecção obtida para *An. aquasalis* infectados com *P. vivax* 5-6 dias após a infecção foi de 44,8%. A média de oocistos por fêmea infectada foi de 13.3. Para *An. darlingi* a taxa de infecção foi de 18,3% e a intensidade da infecção foi de 15,9 oocistos/intestino médio.

### 5.2.1 Ativação da via de resposta immune JAK/STAT durante a fase tardia d infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*

Os dados mostram que a expressão de STAT e PIAS foi induzida 24h depois da infecção com *P. vivax* em *An. aquasalis* (Figura 19A-C) e diminuída 48 hours pós-infecção (hpi). A expressão do gene NOS exibiu uma leve tendência à indução 24 hpi, porém os níveis de expressão foram inferiores a os observados nos mosquitos controle alimentados com açúcar (Figura 19B).

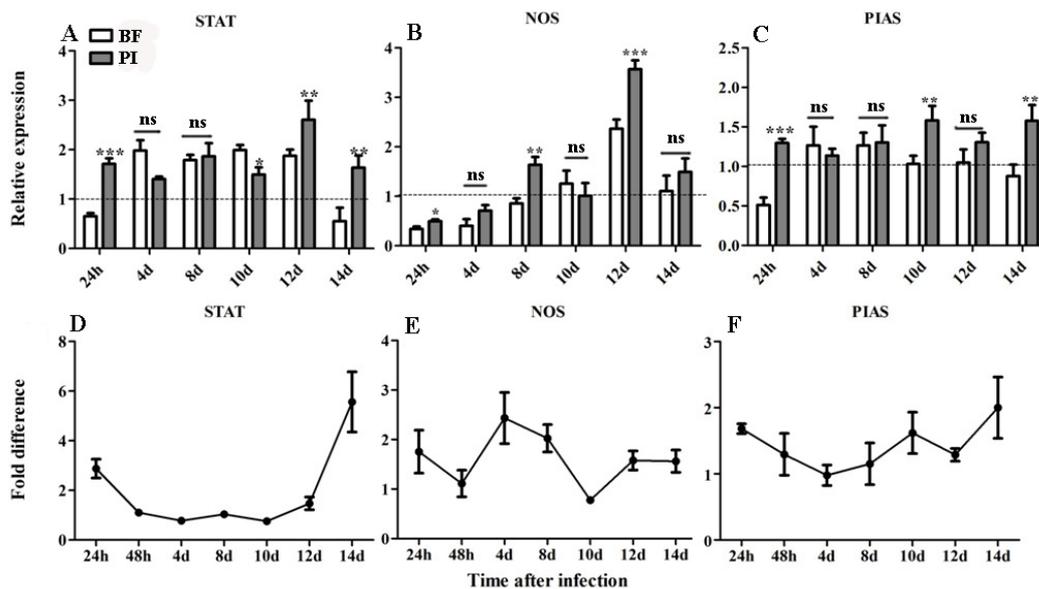


Figura 19. Expressão de STAT, NOS e PIAS em *An. aquasalis* infectados com *P. vivax*. **A-C**: Expressão relativa de STAT, NOS e PIAS em *An. aquasalis* alimentados com sangue não infectado (BF) e sangue infectado com *P. vivax* (PI) em diferentes tempos após a infecção. **D-F**: Porcentagem da diferença na expressão de STAT, NOS e PIAS em amostras infectadas (PI) comparadas com não infectadas (BF). Linha pontuada = níveis de mRNA em mosquitos controle alimentados com açúcar (linha basal = 1), h = horas, d = dias, asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre BF e PI para um tempo dado (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), ns= diferença estatisticamente não significativa.

Após da indução inicial da expressão de STAT, a expressão desse gene foi fortemente diminuída entre os dias 4 e 10 pós-infecção (dpi), e foi re-induzida em 12 dpi. A infecção por *P. vivax* apresentou um forte aumento de mais de seis vezes nos níveis de mRNA de STAT no dia 14 dpi, e quase duas vezes em 12 dpi comparado com amostras não infectadas (Figura 19D). Da mesma forma, os níveis de mRNA do gene regulador PIAS foram também induzidos na fase tardia da infecção (Figura 19C). A expressão do gene PIAS foi aumentada aproximadamente duas vezes entre os 10 e 14 dpi (Figura 19F).

A expressão do gene NOS foi observada entre 8 e 14 dpi, com um pico de indução em 12 dpi (Figura 19B). Um aumento de duas vezes na expressão desse gene foi observado em 8, 12 e 14 dpi comparado com controles não infectados (Figura 19E).

### **5.2.2 Via JAK/STAT na fase inicial da infecção de *An. darlingi* com *P. vivax***

Não foi observada indução da expressão dos genes STAT e PIAS durante a fase inicial da infecção de *An. darlingi* com *P. vivax* (Figuras 20A - F). Comparando os valores de expressão de STAT em 24 hpi, parece que a expressão desse gene é induzida 36 hpi tanto em mosquitos infectados quanto em não infectados, mas os níveis de expressão não são significativamente diferentes.

Os níveis de mRNA de NOS foram fortemente reduzidos 24hpi comparados com os mosquitos não infectados (Figura 20B). Após esse tempo, os níveis de NOS foram observados abaixo da linha basal, embora houve um aumento de duas vezes nos mosquitos infectados em 3 dpi (Figura 20E).

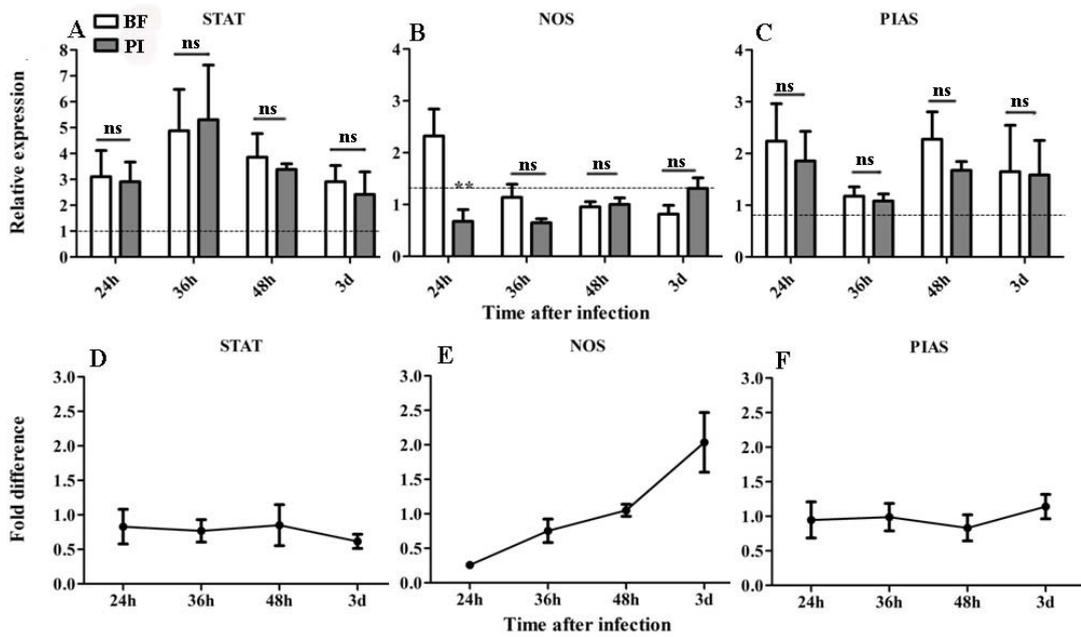


Figura 20. Expressão de STAT, NOS e PIAS em *An. darlingi* infectados com *P. vivax*. **A-C**: Expressão relativa de STAT, NOS e PIAS em *An. darlingi* alimentados com sangue não infectado (BF) e com sangue infectado com *P. vivax* (PI) em diferentes tempos após a infecção. **D -F**: Porcentagem da diferença na expressão de STAT, NOS e PIAS em amostras infectadas (PI) e não infectadas (BF). Linha pontuada = níveis de mRNA em indivíduos controle alimentados com açúcar (linha basal = 1), h = horas, d = dias, asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre BF and PI para um tempo dado (\*\*  $p < 0.01$ ), ns = diferença estatisticamente não significativa.



### 6.1 Suscetibilidade ao *Plasmodium vivax* em espécies de *Anopheles* da região Amazônica Brasileira

O número de espécimes de cada espécie silvete disponíveis para infecção experimental foi limitado devido à sazonalidade das espécies e aos picos de transmissão de malária na região Amazônica, perto da cidade de Manaus.

A infecção experimental dos mosquitos vetores pode ser realizada diretamente, na pele dos pacientes infectados, ou oferecendo um repasto sanguíneo através de um sistema de alimentação por membrana. Por motivos éticos, a tendência é preferir alimentação por membrana para minimizar as reações aos efeitos da picada do mosquito, tais como inchaço, prurido, e possíveis reações alérgicas mais acentuadas.

A maioria dos experimentos realizados com *Anopheles* amazônicos coletados em campo têm utilizado alimentação direta sobre a pele de pacientes gametocitêmicos (Klein *et al.* 1991a; b). A taxa de infecção (18,3%) e a carga de oocistos (média 15,9; min = 1, max = 150) observadas em *An. darlingi* estão de acordo com os publicados por outros autores (Alves *et al.*, 2005; Bharti *et al.*, 2006) que mostram que a alimentação direta ou por membrana com sangue de pacientes gametocitêmicos resulta em taxas de infecção entre 22 e 23% e uma carga média de oocistos de 11.5, variando de 1 a 175. Klein *et al.* (1991a), utilizando alimentação diretamente na pele de pacientes maláricos em Costa Marques, RO, observaram taxas de infecção maiores de 73% para *An. darlingi*, de 52% para *An. albitarsis* e de 60% para *An. triannulatus*. Nesse mesmo trabalho, o número médio de oocistos observado nessas espécies foi similar ao encontrado por nós em populações dessas espécies de mosquitos nos arredores de Manaus.

No nosso trabalho *An. aquasalis* e *An. albitarsis* s.l. tiveram taxas de infecção significativamente maiores que *An. darlingi*, que é considerado o principal vetor de *Plasmodium* na Amazônia Brasileira e essas três espécies mostraram quantidades altas de oocistos, com o maior número observado em *An. aquasalis*. Nossos resultados confirmam que a alimentação por membrana é um eficiente método para estudar a infecção por *Plasmodium* em mosquitos vetores.

*An. darlingi* é mais abundante na região Amazônica durante o final da estação chuvosa e durante o início do período seco, e as outras espécies estudadas são mais abundantes no início do período seco (Klein *et al.*, 1990; 1992). Da mesma forma, na região de Manaus, quando *An. darlingi* apresenta abundância alta, *An. albitarsis* s.l. e *An. nuneztovari* s.l. são pouco abundantes (observação pessoal). Quando a abundância de *An. darlingi* estava baixa, as populações de *An. albitarsis* s.l. e *An. nuneztovari* s.l. aumentavam. Essa dinâmica de sucessão de espécies é um ponto muito importante para a manutenção da transmissão da malária e pode representar dificuldades para o controle da doença nesta região devido à suscetibilidade ao *P. vivax* observada em todas as espécies estudadas (Deane *et al.*, 1988).

Nesse trabalho é mostrado que populações de campo de *An. darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l., e *An. triannulatus* s.l., e *An. aquasalis* colonizados em laboratório, são suscetíveis ao *P. vivax* em condições de laboratório. Todas as espécies estudadas aqui poderiam ser esporadicamente vetores competentes na natureza, embora tenha sido observada uma alta proporção de fêmeas não infectadas. Além disso, as taxas de infecção observadas nesse trabalho foram maiores que as registradas na natureza para as cinco espécies estudadas. A utilização de técnicas de Elisa, baseadas no uso de anticorpos antiesporozoíto espécie – específicos, tem demonstrado que populações de mosquitos Amazônicos apresentam taxas de infecção por *P. vivax* diferentes: em *An. darlingi* variaram de 0.3 to 9.3%; em *An. albitarsis* s.l. de 0.4 a 5.2%; em *An. nuneztovari* s.l. de 0.3 to 1.1%; em *An. triannulatus* s.l. foram de 0.2% e em *An. aquasalis* de 0.3 a 1.3% (Arruda *et al.*, 1986; Tadei e Thatcher, 2000; Póvoa *et al.*, 2003; 2006; Santos *et al.*, 2009; Galardo *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2001; Póvoa *et al.*, 2001; Martins-Campos *et al.*, 2012). Como nesse estudo foi oferecido sangue infectado com gametócitos aos mosquitos, era esperado observar taxas de infecção altas, no entanto a infectividade de uma mesma amostra gametocitemica foi variável. Essa diferença na infectividade das diferentes amostras de sangue pode ser devida à combinação de variáveis tais como maturidade dos gametócitos, proporção de gametócitos masculinos e femininos, fatores imunes no soro do paciente, mecanismos de resposta imune do hospedeiro, dentre outros (Gonzalez-Ceron *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2006; Abeles *et al.*, 2013; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2004; Souza-Neiras *et al.*, 2010).

O número de oocistos tem pouca importância epidemiológica, pois a maioria dos mosquitos encontrados infectados na natureza tem baixo número (Adak *et al.*, 2005). Provavelmente, um dos fatores mais importantes para determinar a capacidade vetorial da

espécie é o grau de antropofilia (Nanda *et al.*, 1996). Nos arredores da cidade de Manaus, de *An. darlingi* são reconhecidas como fortemente antropofílicas e endofílicas e suas populações ocorrem ao longo do ano todo. *An. albitarsis* s.l. se mostrou muito suscetível à infecção por *P. vivax*, concordando com resultados de outros trabalhos realizados em outros estados da Amazônia Brasileira, tais como Roraima, Pará, Amapá e Rondônia (Arruda *et al.*, 1986; Oliveira-Ferreira, *et al.*, 1990; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002; Póvoa *et al.*, 2000). Entretanto, Klein *et al.* (1992) consideraram *An. albitarsis* s.l. um vetor duvidoso devido ao baixo número de oocistos observados, o comportamento zoofílico e a distribuição sazonal. Da mesma forma que *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l., *An. aquasalis* mostrou uma alta suscetibilidade ao *P. vivax*, indicando que essa espécie é uma ferramenta valiosa para realizar estudos sobre interação parasito – hospedeiro em vetores do Novo Mundo. Diferente de *An. darlingi*, *An. aquasalis* está bem adaptada às condições de colonização em laboratório.

*An. nuneztovari* s.l. também mostrou uma alta taxa de infecção, que não foi significativamente diferente da taxa de infecção de *An. darlingi*, mas sim de *An. albitarsis* s.l. O número de oocistos em *An. nuneztovari* s.l. foi menor que o observado em *An. darlingi* e *An. albitarsis* s.l., porém não foi diferente entre essas duas últimas espécies. *An. nuneztovari* s.l. é considerada importante vetora de malária em alguns países da América do Sul como Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992) e Peru (Hayes *et al.*, 1987), porém, em outros países, como o Brasil, essa espécie não é considerada vetora porque raramente é encontrada naturalmente infectada com *Plasmodium*, e quando infectada, a taxa de infecção é muito baixa (Tadei e Tatcher, 2000; Galardo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). Os resultados apresentados aqui sugerem, claramente, *An. nuneztovari* s.l. possui um alto potencial como vetor de malária, e poderia oferecer risco dependendo da sua alta densidade em algumas áreas. Nos arredores de Manaus, por exemplo, *An. nuneztovari* s.l. pode ser uma espécie importante para a transmissão de malária por causa das suas altas taxas de alimentação e de infecção observadas em condições de laboratório. A população dessa espécie foi encontrada em altas densidades em localidades nos arredores de Manaus, onde *An. darlingi* é também abundante (Tadei e Tatcher, 2000). Por outro lado, embora *An. triannulatus* s.l. chegue a se infectar com *P. vivax* nos experimentos descritos aqui, essa espécie apresenta taxas de infecção e número de oocistos significativamente baixos comparados com os das outras espécies estudadas. Essas observações reforçam a conclusão de que *An. triannulatus* s.l. não é um importante vetor de

malária na região Amazônica (Arruda *et al.*, 1986; Deane *et al.*, 1988; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1992).

Exceto para *An. albitarsis* s.l. e *An. aquasalis*, as taxas de infecção aumentaram em todas as espécies após a inativação do soro. Fatores do soro têm se mostrado importantes por influenciar a capacidade dos gametócitos de *P. vivax* para infectar mosquitos em experimentos em que o plasma do paciente foi substituído por plasma ou soro livre de *P. vivax* (Bharti *et al.*, 2006; Bousema *et al.*, 2012;). A infecção nessas duas espécies de mosquitos não parece estar fortemente relacionada com fatores imunes do hospedeiro. A resistência à infecção por *Plasmodium* em *An. albitarsis* s.l. e *An. aquasalis* pode estar mais associada a fatores intrínsecos relacionados com o sistema imune do próprio mosquito, que efetivamente, responde destruindo o *Plasmodium*. Estudos futuros devem incluir a avaliação da variabilidade de cepas de *P. vivax* na suscetibilidade do mosquito e a variação intra e interespecífica na resposta imune dos mosquitos à infecção por *Plasmodium*.

Os resultados também mostram que o número de gametócitos está positivamente correlacionado com a taxa de infecção e o número de oocistos formados, porém, quando os resultados foram analisados separadamente para cada espécie, somente *An. darlingi* e *An. aquasalis* mostraram correlação positiva entre a quantidade de gametócitos e as outras duas variáveis. Entretanto, de acordo com Klein *et al.* (1991) não houve correlação entre o número de gametócitos de *P. falciparum* e o número médio de oocistos formados em *An. darlingi*, embora, em geral, o número baixo de gametócitos circulantes no sangue resultou em poucos mosquitos infectados. Resultados diferentes poderiam estar relacionados com os métodos utilizados para a contagem de gametócitos, como determinado por microscopia de luz, que não predizem a transmissão de *P. vivax* aos mosquitos (Sattabongkot *et al.*, 1991).

## **6.2 Ativação da via de resposta imune JAK/STAT durante a fase tardia d infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax***

Bahia *et al.* (2011) caracterizaram um membro da família STAT em *An. aquasalis*, chamado AqSTAT, que é filogeneticamente mais próximo do gene STAT-A do que do gene

STAT-B de *An. gambiae*, previamente registrados por Barillas-Mury *et al.* (1999). AgSTAT-B regula a expressão de AgSTAT-A, que mais tarde media a ativação transcricional dos genes NOS e SOCS em resposta à infecção por *P. falciparum* em *An. gambiae* (Gupta *et al.*, 2009).

Bahia *et al.* (2011) encontraram que o gene AqSTAT é expressado em todos os estágios de desenvolvimento de *An. aquasalis* (ovo, larva, pupa e machos e fêmeas adultos), e durante a fase inicial da infecção com *P. vivax*. No nosso trabalho observamos indução dos genes STAT e PIAS 24hpi, concordando com resultados prévios que mostraram a ativação dessa via de sinalização durante a fase inicial da infecção.

Bahia *et al.* (2011) não observaram aumento na expressão de NOS em 12 and 24 hpi, mas observaram um pico de indução desse gene em 36 hpi. Nossos dados mostraram uma leve indução da expressão de NOS em 24hpi, confirmando a idéia de Bahia *et al.* (2011) de que a via JAK/STAT é ativada de forma transitória durante a fase inicial da infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*.

Nossos dados mostram que, após a indução da via JAK/STAT na fase inicial da infecção (Figura 1, Bahia *et al.*, 2011) a expressão dos genes STAT, PIAS e NOS não é aumentada nos 4dpi nos mosquitos infectados. Pode ser que, uma vez o oocinete está a ponto de atravessar o epitélio, a ativação da via não é desencadeada no intestino médio e/ou sistemicamente e, então, essa via imune chega a ser silenciosa. Nesse tempo da infecção, os oocistos estão bem estabelecidos na lamina basal e, de alguma forma, “escondidos” do sistema imune do mosquito. Em *An. gambiae* infectados com *P. berghei* foi observada uma resposta imune sistêmica na carcasa quando os oocistos estavam formados (Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos, 1998).

No nosso modelo, ainda não está claro o exato momento em que os oocistos são liberados na hemolinfa após a ruptura dos oocistos. Experimentos utilizando *An. gambiae* - *P. falciparum* (Hillyer *et al.*, 2003) e *Ae. aegypti* - *P. gallinaceum* (Hillyer *et al.*, 2007) mostraram que os esporozoítos podem circular no hemócele por mais de seis dias após a ruptura sincronizada dos oocistos no intestino médio. Porém, a invasão das glândulas salivares deve ocorrer em menos de 8 h depois da sua liberação no hemócele, de forma contrária eles serão degradados. Nós especulamos que, em *An. aquasalis* infectados com *P.*

*vivax*, a ruptura dos oocistos deve ocorrer entre 10 and 14dpi, porque esse é o período de tempo em que foi observada uma re-indução dos genes da via STAT (Figurae 1). Mais ou menos nesse tempo, o sistema immune do mosquito é capaz de detectar de novo a presença dos parasitos (esporozoítos) na hemolinfa e assim acumular uma resposta imune que inclui a ativação da via JAK/STAT para limitar o número de esporozoítos.

A alta indução da expressão do gene NOS em 12dpi pode estar relacionada com processos de fagocitose modulados pelos hemócitos (Hillyer *et al.*, 2003). O gene NOS é expressado no citoplasma das células do epitélio do intestino médio e nos hemócitos; a ativação da via STAT pode estar implicada na indução da expressão de NOS em outros tecidos, incluindo as glândulas salivares (Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos, 1998; Hillyer *et al.*, 2009). Em *Drosophila* a produção aumentada de NO é observada durante respostas de encapsulação melanótica mediada por hemócitos (Nappi *et al.*, 2000).

Nossos dados demonstram que os níveis de mRNA de STAT and NOS inducidos diminuíram em 14dpi (Figuras 1A and B). Isso pode estar indicar que a ativação da via JAK/STAT na fase tardia da infecção com *P.vivax* também é transitória. Provavelmente, os efetores imunes dessa via são necessários para limitar a sobrevivência dos esporozoítos e a invasão das glândulas salivares por um breve período de tempo. Nós observamos que a expressão de PIAS, de forma diferente de NOS, é induzida ainda em 14dpi (Figura 1C) podendo indicar e garantir que a via não permaneça ativa constatemente ao longo dos últimos dias da infecção. Assim, a ativação de JAK/STAT na fase tardia da infecção trabalha dentro de uma janela de tempo estreita quando os esporozoítos devem invadir as glândulas salivares ou ser destruídos no hemócele. A ativação transitória da via STAT foi apontada por Dimopoulos *et al.* (1998) em *An. gambiae* infectados com *P. berghei*.

Nossos dados mostram que a via de sinalização JAK/STAT é ativada de forma transitória durante as fases inicial e tardia da infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*. Agora temos interesse em saber de que forma os genes regulados por essa via podem modular o desenvolvimento do parasito no mosquito

### **6.3 Ativação da via JAK/STAT durante a fase inicial da infecção de *An. darlingi* com *P. vivax***

Foi observada uma redução nos níveis de NOS em *An. darlingi* infectados com *P. vivax*. Segundo Gupta *et al.* (2012) níveis baixos de NOS são necessários para o sucesso da invasão do intestino médio pelo oocineto e a posterior formação dos oocistos. Dessa forma, a expressão reduzida de NOS em 24hpi poderia estar indicando que outra via diferente de JAK/STAT é a que regula a invasão do epítlio. É possível que a expressão de NOS observada em 3 dpi tenha sido induzida por resposta imune celular modulada pelos hemócitos ou por outros tecidos (Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos, 1998; Hillyer *et al.*, 2003; 2009).

Nossos dados sugerem que a via imune JAK/STAT não é ativada durante a fase inicial da infecção de *An. darlingi* com *P. vivax*. Claramente, os genes STAT, PIAS e NOS não foram induzidos pelo parasito. O papel da via JAK/STAT na fase tardia da infecção de *An. darlingi* com *P. vivax* ainda deve ser investigado. Outros mecanismos de resposta imune devem ser estudados em *An. darlingi* infectados com *P. vivax* para poder entender os eventos moleculares que modulam a infecção com *Plasmodium* nesse importante vetor amazônico.



- *An. darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. triannulatus* s.l. e *An. nuneztovari* s.l. silvestres e *An. aquasalis* de colônia são suscetíveis à infecção experimental por *P. vivax*.

- *Anopheles albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l. e *An. aquasalis* apresentaram taxas de infecção maiores que *An. darlingi*. Entretanto, *An. albitarsis* s.l. e *An. darlingi* desenvolveram a maior quantidade de oocistos.

-A baixa taxa e infecção observada em *An. darlingi* indica que outras características da espécie devem ser muito importantes para que seja tida como a principal vetora na região Amazônica.

-A alta taxa de infecção e o alto número de oocistos mostrados em *An. aquasalis* indicam que a combinação *An. aquasalis* - *P. vivax* é um modelo de laboratório factível.

-A inativação do soro antes da alimetação experimental dos mosquitos pode ajudar a melhorar a taxa de infecção e favorecer a formação de oocistos em algumas espécies de mosquitos.

-A expressão dos genes da via JAK/STAT é induzida na fase tardia da infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*. Nesse par parasito-vetor a via JAK/STAT foi ativada de forma transtória durante o início da infecção, quando os oocinetos atravessam as células do epitélio intestinal, e na fase tardia, quando os esporozoítos são liberados no hemocele e invadem as glândulas salivares.

-Em *An. darlingi* infectados com *P. vivax* a via JAK/STAT não foi ativada durante a fase inicial da infecção. Outras vias devem ser estudadas para tentar entender o sistema imune dessa importante espécie vetora de *Plasmodium* na região Amazônica.

O desenvolvimento de novas estratégias para o controle da malária inclui métodos direcionados a interromper o desenvolvimento do parasito no vetor. Estudar as interações dos parasitos com seus vetores, utilizando sistemas de transmissão natural, diferente dos modelos não naturais usados atualmente, é crítico para o desenvolvimento de estratégias que possam, finalmente, ser utilizadas em campo. Esses estudos são realizados em situações difíceis, quando os mosquitos não podem ser criados em laboratório, como ocorre com muitos dos vetores da América do Sul, tais como *An. darlingi*, que ainda não é colonizado em laboratório, apesar dos diversos esforços por parte de diferentes grupos de investigação (observação

peçoal). Somente *An. aquasalis*, o principal vetor em regiões costeiras do Brasil, tem sido estabelecido e mantido em condições de laboratório.



**Artigo publicado**

**Experimental *Plasmodium vivax* infection  
of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon**

**Malaria Journal 2013, 12:460**

## RESEARCH

## Open Access

## Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon

Claudia M Rios-Velásquez<sup>1,8</sup>, Keillen M Martins-Campos<sup>5,7</sup>, Rejane C Simões<sup>3,4</sup>, Thiago Izzo<sup>6</sup>, Edineuza V dos Santos<sup>3</sup>, Felipe AC Pessoa<sup>1</sup>, José BP Lima<sup>5,2</sup>, Wuelton M Monteiro<sup>5,7</sup>, Nágila FC Secundino<sup>8</sup>, Marcus VG Lacerda<sup>5,7</sup>, Wanderli P Tadei<sup>3</sup> and Paulo FP Pimenta<sup>5,8\*</sup>

### Abstract

**Background:** *Anopheles darlingi* is the major malaria vector in countries located in the Amazon region. *Anopheles aquasalis* and *Anopheles albitarsis* s.l. are also proven vectors in this region. *Anopheles nuneztovari* s.l. and *Anopheles triannulatus* s.l. were found infected with *Plasmodium vivax*; however, their status as vectors is not yet well defined. Knowledge of susceptibility of Amazon anopheline populations to *Plasmodium* infection is necessary to better understand their vector capacity. Laboratory colonization of *An. darlingi*, the main Amazon vector, has proven to be difficult and presently *An. aquasalis* is the only available autonomous colony.

**Methods:** Larvae of *An. darlingi*, *An. albitarsis* s.l., *An. nuneztovari* s.l. and *An. triannulatus* s.l. were collected in the field and reared until adult stage. Adults of *An. aquasalis* were obtained from a well-established colony. Mosquitoes were blood-fed using a membrane-feeding device containing infected blood from malarial patients. The infection of the distinct *Anopheles* species was evaluated by the impact variance of the following parameters: (a) parasitaemia density; (b) blood serum inactivation of the infective bloodmeal; (c) influence of gametocyte number on infection rates and number of oocysts. The goal of this work was to compare the susceptibility to *P. vivax* of four field-collected *Anopheles* species with colonized *An. aquasalis*.

**Results:** All *Anopheles* species tested were susceptible to *P. vivax* infection, nevertheless the proportion of infected mosquitoes and the infection intensity measured by oocyst number varied significantly among species. Inactivation of the blood serum prior to mosquito feeding increased infection rates in *An. darlingi* and *An. triannulatus* s.l., but was diminished in *An. albitarsis* s.l. and *An. aquasalis*. There was a positive correlation between gametocyte density and the infection rate in all tests ( $Z = -8.37$ ;  $p < 0.001$ ) but varied among the mosquito species. *Anopheles albitarsis* s.l., *An. aquasalis* and *An. nuneztovari* s.l. had higher infection rates than *An. darlingi*.

**Conclusion:** All field-collected *Anopheles* species, as well as colonized *An. aquasalis* are susceptible to experimental *P. vivax* infections by membrane feeding assays. *Anopheles darlingi*, *An. albitarsis* s.l. and *An. aquasalis* are very susceptible to *P. vivax* infection. However, colonized *An. aquasalis* mosquitoes showed the higher infection intensity represented by infection rate and oocyst numbers. This study is the first to characterize experimental development of *Plasmodium* infections in Amazon *Anopheles* vectors and also to endorse that *P. vivax* infection of colonized *An. aquasalis* is a feasible laboratory model.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, *Anopheles*, Malaria, Membrane feeding assay, Infection rate, Oocysts

\* Correspondence: [pimenta@cpqrr.fiocruz.br](mailto:pimenta@cpqrr.fiocruz.br)

<sup>2</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil

<sup>6</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Minas Gerais, Av. Augusto de Lima, 1715, CEP 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Malaria is an infectious disease with major impact on global public health and economy. Currently, malaria threatens almost one third of the world population in 103 tropical countries, resulting in 207 million of clinical cases and 627,000 deaths in 2012 [1]. In the Americas, 21 countries are affected by malaria, with approximately 1.1 million cases in 2010, most of which occurred in the Amazon basin, which covers 40% of South American territory. In Brazil, the Federal Health System Surveillance registered 267,000 cases in 2011, most of them (99.8%) in the Amazon region [2].

Human malaria parasites in the genus *Plasmodium* are transmitted by anopheline mosquitoes. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are the main species-affecting humans. Actually, since the mid-1990s, *P. vivax* has become the predominant New World malaria species, as it has expanded its range throughout South America [1]. In Brazil, 84% of registered malaria cases are caused by *P. vivax* [2]. The consequences of this increase in distribution are higher exposure and increased infection, adding to difficulties in controlling the disease. Although *P. vivax* malaria is generally considered to be relatively benign, there are numerous reports of complex cases with severe clinical complications and deaths [3-10].

One keystone stage in the *Plasmodium* life cycle is the infection of mosquito vectors. Among the 33 *Anopheles* mosquito species described from the Brazilian Amazon region, *Anopheles darlingi* is considered to be the main malaria vector. Other anopheline species can be considered secondary or occasional malaria vectors because of their population density, anthropophilic behavior and natural infectivity across their geographic distributions [11-14]. *Anopheles albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.* and *An. triannulatus s.l.* are commonly collected in the Amazon, and they have been observed infected with *P. vivax* and *P. falciparum*, but their role as malaria vectors has not yet been elucidated [15-25]. *Anopheles aquasalis* is distributed predominantly along the Atlantic coast because of its tolerance to saltwater environment and has been found naturally infected by *P. vivax* [20,26-28] in the Eastern Amazon region.

Outside the Brazilian Amazon, *An. darlingi* has been associated with malaria transmission in Bolivia, Colombia, French Guiana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela [12,29]; *An. albitarsis s.l.* in Venezuela [30]; *An. nuneztovari s.l.* in Venezuela [30], Peru [31] and Colombia [32,33]; *An. triannulatus s.l.* in Venezuela [34] and Peru [31]; and, *An. aquasalis* in Trinidad [35], Guyana [28] and Venezuela, where it is considered to be the primary coastal malaria vector of *P. vivax* [36].

The life cycle of *Plasmodium spp.* starts when mosquitoes ingest gametocytes, the parasite sexual stage, during

the blood meal taken through the skin of infected vertebrate hosts. Inside the mosquito alimentary tract, fusion between male and female gametocytes produces motile ookinetes, which traverse the mosquito midgut epithelium to form oocysts [37,38]. The presence of well-developed oocysts outside mosquito midgut indicates *Plasmodium* establishment in a susceptible vector and this parameter is used to determine the infection rate of a mosquito population [39,40].

In the field studies, the infection rate, i.e., the amount of individuals in a mosquito population that carry well-developed *Plasmodium* oocysts, is an important parameter for defining vector competence and thus, a key indicator in the description of malaria dynamics and transmission biology in a given geographic region. Indeed, infection rates in mosquito vectors are related to gametocyte survival, viability and success of fertilization, and finally, midgut invasion by the resulting ookinetes. However, not all gametocytes that are ingested by susceptible mosquito vectors reach the ookinete stage [41-43]. Factors such as gametocyte density, gender ratio and maturity, presence of anti-malarial drugs, human and mosquito immune factors, and intrinsic parasite factors influence gametocyte viability, fusion and infectivity and consequently oocyst formation [44-48]. To complete the sexual development of *Plasmodium* in the mosquito, sporozoites are released from the oocyst and go on to invade the salivary glands. Once the salivary glands become infected with sporozoites, the mosquito is infectious to humans during the next blood meal [49-51].

It is well known that among the over 400 species of mosquitoes in the genus *Anopheles* only about 10% are important as vectors of human malaria. There is a multitude of both ecological and genetic determinants that influence vector competence, both among species and even at the level of geographic populations within a single species [41-45,47]. Differences in susceptibility to *Plasmodium* infection among the putative vectors of malaria in the Amazon have never been fully and carefully considered until this study.

Mosquito vectors of malaria from Africa and Asia have been well established in colonies and are feasible to maintain in laboratory. For example the *Anopheles gambiae*, the major vector in several African countries, is the most well studied mosquito, including its interaction with human and murine *Plasmodium* species causative agents of malaria [52,53]. Distinctly, the colonization of *An. darlingi*, the major Amazon vector, has proven to be difficult as well as other anopheline species from the region, and presently there is only *An. aquasalis* as an available autonomous colony. *Anopheles aquasalis* has been reared in laboratory as free mating since 1995 [54-56] and recently adapted as a well-established colony in Amazon institutions for experimental studies [57-59].

The goal of this work was to compare the susceptibility to *P. vivax* of colonized *An. aquasalis* with four groups of field-collected *Anopheles* species. This study was focused on vector infection rates as defined by the presence, quantification of oocysts and proportion (percentage) of infected individuals in these mosquito populations, following exposure to blood obtained from infected human patients. In addition, *P. vivax* infection in the vector was correlated with gametocyte numbers present in the circulating blood of infective human hosts. In laboratory studies, the infection rate is a critical part of the determination of vector competence. It is important to study *P. vivax* infection of New World vectors due to the huge gap regarding the knowledge comparing other vector-parasite pairs from the Old World.

## Methods

### Blood collection and ethic statements

Adult volunteers (ages >18 years) residents from the region of Manaus (State of Amazonas, Brazil) with *P. vivax* malaria infection diagnosed by blood smears were invited to participate in the study. Volunteers signed informed consent documents as blood sample donors. About 3 ml of blood samples were collected by venipuncture from volunteers and placed into a sterile lithium heparinate vacutainer tube. After blood collection, all patients were treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (located in the city of Manaus) or in the health posts from the region of Manaus where they were diagnosed, following ethical procedures determined by the Brazilian Health Ministry. This study was approved by the Brazilian National Ethics Committee Board (CONEP, 3726).

### *Plasmodium vivax* peripheral parasitaemia and gametocyte counts

Thick and thin blood smears from malarial patients were prepared by Giemsa staining method and examined under light microscope x100 oil immersion lens to confirm the presence of *P. vivax* parasites. Sexual (gametocyte) and asexual stages counting per 500 leukocytes were performed.

### *Anopheles* collections

Mosquito larvae were collected during one year at different breeding sites near the city of Manaus, capital of Amazonas State, Brazil: Puraquevara Road (Portela 03°03'16.4"S 59°53'44.0"W; Km 9 Vicinal 03°03'09.1"S 59°52'12.6"W; Carlão 03° 02' 46.33000" 59° 52' 53.90000"); Brasileirinho Road (Raifram 03°02'09.5"S 59°52'15.5"W; Cristo Vive 03°01'33.1"S 59°51'07.7"W). Larvae were reared in the insectary as described elsewhere [17]. Emerged adult mosquitoes were identified as the following species: *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An.*

*nuneztovari s.l.* and *An. triannulatus s.l.*, as described elsewhere [60,61]. Field mosquitoes from each species were separated and housed in the rearing containers. *Anopheles aquasalis* mosquitoes originated from a colony established in 1995 [54] were reared from eggs to adult. All mosquitoes were *ad libitum* fed 10% sugar solution and kept in laboratory conditions at 26-28°C and 70-80% RH (relative humidity). Three- to five-days old adult females were used in all experiments. Pinned voucher specimens were deposited at the Biological Collection at the Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz, Amazonas).

### *Plasmodium vivax* infection of mosquitoes via membrane feeding assay

Adult mosquitoes were sugar starved overnight prior to infection via membrane feeding assay. Individuals from each of the five species were separated in two experimental groups. One group was offered whole blood (WB) from *P. vivax* patients for a period of 45 to 90 minutes via membrane feeding assay (glass device covered with Parafilm®). Blood was held at 37-39°C through a hose system connected to a thermal bath. The second group was treated in similar way but with inactivated-blood serum (IBS). The *P. vivax* infective blood samples were centrifuged for 15 minutes at 2,000 g and the serum removed and heated for 1 hour at 56°C. Then, the inactivated serum was added back to the red blood cells containing parasites, suspended and offered to the mosquitoes. After the infective blood meals only fully engorged mosquitoes were transferred to rearing containers and maintained in the insectary as described above for the development of infection.

### Evidence of infected mosquitoes

Five to eight days after infective blood meal, midguts from the experimentally infected mosquitoes were dissected in phosphate buffered saline, stained with 2% commercial Mercurochrome (Merbromin), placed under a coverglass and examined for the presence of oocysts. The number of oocysts on the mosquito midgut was recorded.

### Data analysis

In this study, the blood-feeding rate was calculated as the proportion of female mosquitoes that were fully engorged after a blood meal. The susceptibility of the *Anopheles* species to *P. vivax* was evaluated by the presence and the number of oocysts in the midguts. The population infection rates were calculated by dividing the number of infected mosquitoes (those with one or more oocysts) by the number of dissected mosquitoes. G tests were used to compare the frequency of infection among all the studied mosquito species conjointly, as

well as pairwise comparisons between each pair of species. The Kruskal-Wallis test evaluates differences in the number of oocysts between the infected mosquito species. Only positively infected mosquitoes were used for this last analysis. Conover-Inman test, *a posteriori*, was used for comparison of the number of oocysts among all studied mosquito species [62,63]. For each mosquito species, logistic regressions were used in order to evaluate if the probability of the mosquito to be infected was related to the number of gametocytes in the blood meal. Spearman's Rank correlations were used in infected mosquitoes to correlate blood-circulating gametocyte numbers with oocyst numbers. G tests were used to compare the number of oocysts per infected midgut with the gametocytes present in the infective blood. G test was also used to evaluate if blood factors affect the mosquito infection probability, comparing the mosquito infection rate of the species fed on WB or ISB blood samples. All statistical analysis used  $\alpha = 0,05$  and the R-Project software version 2.13.1 (R Core Team).

## Results

A total of 2,449 adult female mosquitoes and 62 *P. vivax* isolates from malarial patients were used for the different experimental feeding assays and only the fully engorged mosquitoes after blood feeding were analyzed in this study (Table 1). The five mosquito species differed in regard to feeding time until engorgement. *Anopheles aquasalis*, *An. darlingi* and *An. triannulatus s.l.* fed the most rapidly with 64% of individuals fed to repletion in 40 minutes. *Anopheles albitarsis s.l.* and *An. nuneztovari s.l.* fed more slowly, with 72% and 64%, respectively, fully engorged over a period of approximately 60 to 80 minutes. The proportion of infected mosquitoes

following engorgement on an infected blood meal was significantly different among species ( $G = 199.1$ ,  $GL = 4$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1). *Anopheles aquasalis* and *An. albitarsis s.l.* showed very similar infection rates ( $G < 0.01$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.98$ ). Actually, *An. aquasalis* showed the highest infection rate (44.8%, remaining comparisons,  $G > 18$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.001$ ) followed by *An. albitarsis s.l.* (44.7%), which were significantly different to all other mosquito species ( $G > 8.14$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.01$ ). *Anopheles nuneztovari s.l.* held the third highest infection rate (24.5%), and it was not statistically different to *An. darlingi*, which had an infection rate of 18.3% ( $G = 2.1$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.148$ ), but was different to *An. triannulatus s.l.*, with only 8.8% of the individuals infected ( $G = 14.6$ ,  $GL = 1$ ,  $p < 0.001$ ). *Anopheles darlingi* also had a significantly higher infection rate compared with *An. triannulatus s.l.* ( $G = 13.1$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.001$ ) (Figure 1).

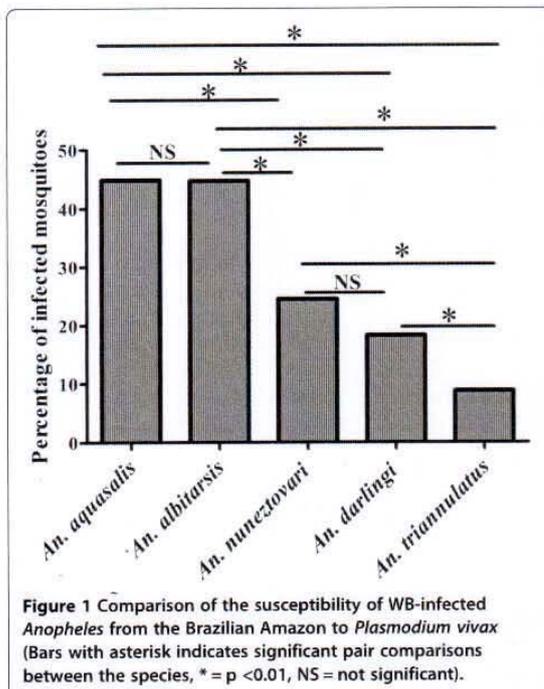
The intensity of infection, measured by the numbers of oocysts per infected mosquitoes, fed on WB and IBS varied significantly among species ( $K = 48.9$ ,  $GL = 4$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2). The highest number of oocysts was observed in *An. aquasalis* (mean =  $28.6 \pm 41.7$  S.D, median = 12) and showed statistical difference when compared with all the other species. *Anopheles darlingi* (mean =  $15.9 \pm 24.3$  SD, median = 7) was followed by *An. albitarsis s.l.* (mean =  $13.3 \pm 14.8$  SD, median = 6) and *An. nuneztovari s.l.* (mean =  $7.3 \pm 8$  SD, median = 5). There was no significant difference in the number of oocysts between *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.* and *An. nuneztovari s.l.* However, *An. triannulatus s.l.* had significantly less oocysts than all other studied species (mean =  $3.4 \pm 4.7$  S.D., median = 1).

To outline the distribution of infection intensities, among WB-infected mosquitoes, we organize the oocyst

**Table 1 Infection rate and mean number of oocysts produced in *Anopheles* species from the Brazilian Amazon infected with whole blood (WB-infected mosquitoes) or inactivated blood serum (IBS-infected mosquitoes)**

<i>Anopheles</i> species	Number of gametocyaemic samples	Number of dissected gut	Infection rate (%)	Mean number of oocysts (Min - Max)
<b>WB-infected mosquitoes</b>				
<i>An. albitarsis s.l.</i>	29	861	44,8	29,4 (1-260)
<i>An. aquasalis</i>	12	76	44,7	12,8 (1-50)
<i>A. darlingi</i>	17	530	18,3	15,9 (1-150)
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	17	106	24,5	7,3 (1-34)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	20	260	8,8	3,3 (1-22)
<b>IBS-infected mosquitoes</b>				
<i>An. albitarsis s.l.</i>	10	201	40,8	22,5 (1-200)
<i>A. aquasalis</i>	9	40	20	5,5 (1-17)
<i>An. darlingi</i>	9	217	28,1	11,9 (1-124)
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	9	43	30,2	11,5 (1-80)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	10	115	16,5	5,4 (1-29)

Doc = oocysts, Min = minimal number of oocysts, Max = maximal number of oocysts.



numbers into four groups, as follows: 1–10, 11–50, 51–100, and more than 100 oocysts. A comparison of the distribution of these groups among individuals within species is illustrated in Figure 3. Sixty-nine per cent of the mosquito specimens did not develop oocysts: the proportion of individuals with zero oocysts was higher in *An. triannulatus* s.l., followed by *An. darlingi*, *An. nuneztovari* s.l., *An. aquasalis*, and *An. albitarsis* s.l. Approximately 16% of individuals from all five species were infected with 1 to 10 oocysts and only 10% were infected with 11 to 50 oocysts, with the lower number of infected individuals observed in *An. triannulatus* s.l. (0.4%) and the higher in *An. albitarsis* s.l. (21.3%). Only *An. darlingi* and *An. aquasalis* had more than 50 oocysts, with 1.3 and 7.6% of the individuals, respectively.

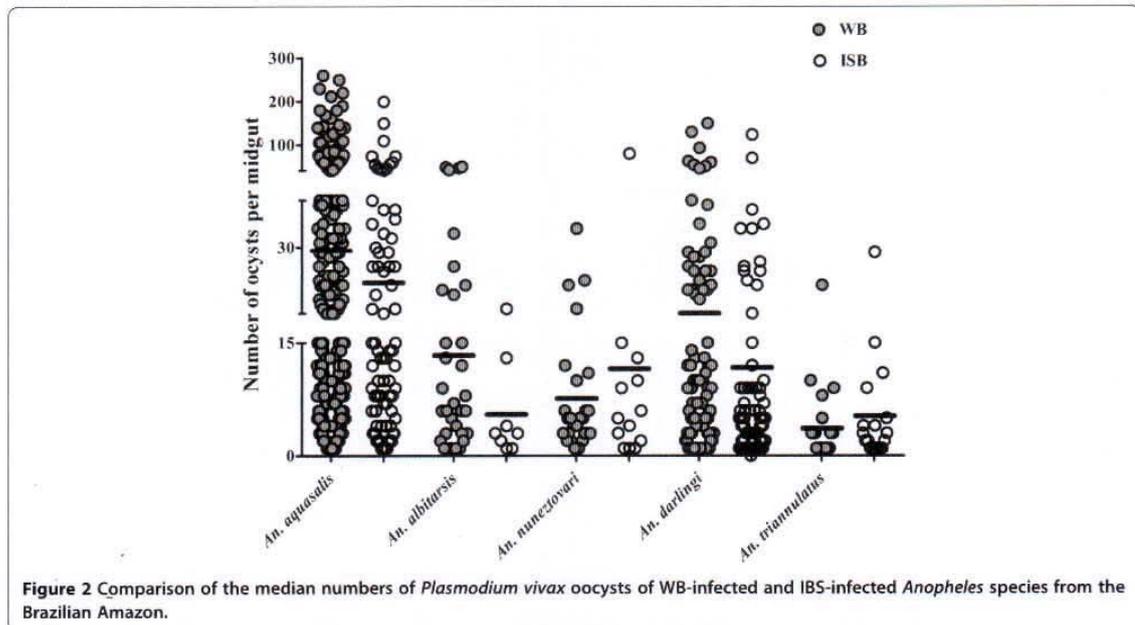
Considering all the studied *Anopheles* species as a whole group, the inactivation of factors present in blood serum was not of significant importance to change the infection rate ( $G = 0.2899$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.585$ ). However, the pattern of the infection rate differed among IBS-infected mosquito species. While the serum inactivation did not cause changes in infection rates on *An. aquasalis* ( $G = 1.08$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.298$ ) and *An. nuneztovari* s.l. ( $G = 0.5$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.47$ ), serum inactivation resulted in a 53% increase in infection rates in *An. darlingi* ( $G = 8.55$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.003$ ), and 87% increase in *An. triannulatus* s.l. ( $G = 4.4$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.035$ ). Inversely, the infection rate for *An. albitarsis* s.l. decreased by 55% ( $G = 7.32$ ,  $GL = 1$ ,  $p = 0.007$ ) (Figure 4).

In general, the intensity of infection, represented by oocyst numbers, varied among species when inactivated serum was used to infect mosquitoes (IBS-infected mosquitoes). There was no difference in oocyst numbers formed on *An. aquasalis* ( $U = 1.3$ ,  $p = 2.44$ ) and *An. nuneztovari* s.l. (Mann–Whitney  $U = 0.466$ ,  $p = 0.495$ ). On the other hand, the inactivation slightly increased the oocyst formation on *An. triannulatus* s.l. ( $U = 7.7$ ,  $p = 0.006$ ) and decreased in *An. darlingi* ( $U = 5.01$ ,  $p = 0.024$ ) and *An. albitarsis* s.l. ( $U = 8.27$ ;  $p = 0.004$ ) (Figure 2).

A total of 17 *P. vivax* isolates from malarial patients were used for *An. darlingi* feeding experiments, 13 for *An. albitarsis* s.l., 17 for *An. nuneztovari* s.l., 20 for *An. triannulatus* s.l. and 29 for *An. aquasalis* (Table 1). Infection rates and range of oocyst numbers per gut varied widely among the different species of WB-infected mosquitoes and IBS-infected mosquitoes. In general, a relationship between the number of gametocytes/500 leukocytes and the infection rate of the mosquitoes ( $Z = -8.37$ ,  $p < 0.001$ ) was observed. However, that relationship varied among the species. For *An. darlingi* ( $Z = -2.9$ ,  $p < 0.01$ ) and *An. aquasalis* ( $Z = -4.66$ ,  $p < 0.001$ ) infection rates increased with an increase in the number of gametocytes. For *An. nuneztovari* s.l., *An. triannulatus* s.l. and *An. albitarsis* s.l. ( $Z < 1.02$ ,  $p > 0.3$  in all cases) there was no correlation between those two variables. Also, among infected species, *An. aquasalis* (Spearman  $\rho = 0.255$ ,  $n = 386$ ,  $p < 0.01$ ) and *An. darlingi* ( $\rho = 0.518$ ;  $n = 54$ ,  $p < 0.01$ ) showed a positive correlation between the number of gametocytes and the number of oocysts formed. The data for all other species did not exhibit a correlation between the quantity of gametocytes and the quantity of oocysts ( $p > 0.05$ ).

## Discussion

The number of field mosquito specimens available for experimental infection was limited by the seasonality of the species and the malaria transmission peaks in the Amazonas region near to Manaus city. A membrane-feeding assay was used to infect *Anopheles* species. Experimental infection of mosquito vectors can involve direct feeding on the skin of patients or offering blood meal through a membrane-feeding device. Ethical preference tends to lean towards the use of membrane-feeding experiments, in order to minimize the human factor interaction. Most experimental results with Amazon outbred *Anopheles* species have used direct skin feeding on gametocytaemic malarial patients [17,27,64]. These findings are in agreement with other published data where both direct and membrane feeding using blood from *P. vivax*-gametocytaemic patients resulted in *An. darlingi* infection rates between 22 and 23% with a mean oocyst load per infected midgut of 11.5 with a range of 1–175 [65,66]. *Anopheles aquasalis* and *An. albitarsis* s.l. had a significantly higher infection rate than *An. darlingi*,



**Figure 2** Comparison of the median numbers of *Plasmodium vivax* oocysts of WB-infected and IB5-infected *Anopheles* species from the Brazilian Amazon.

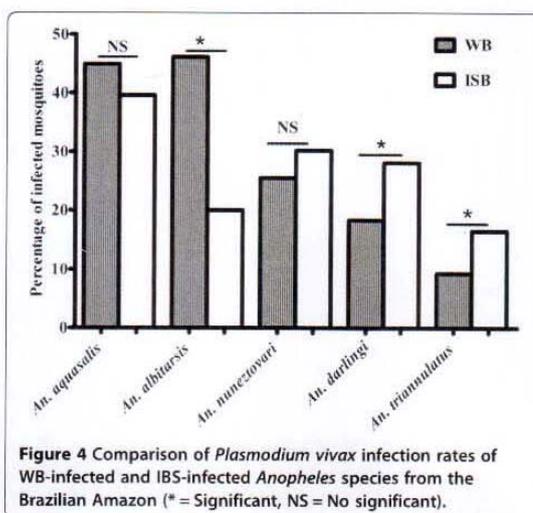
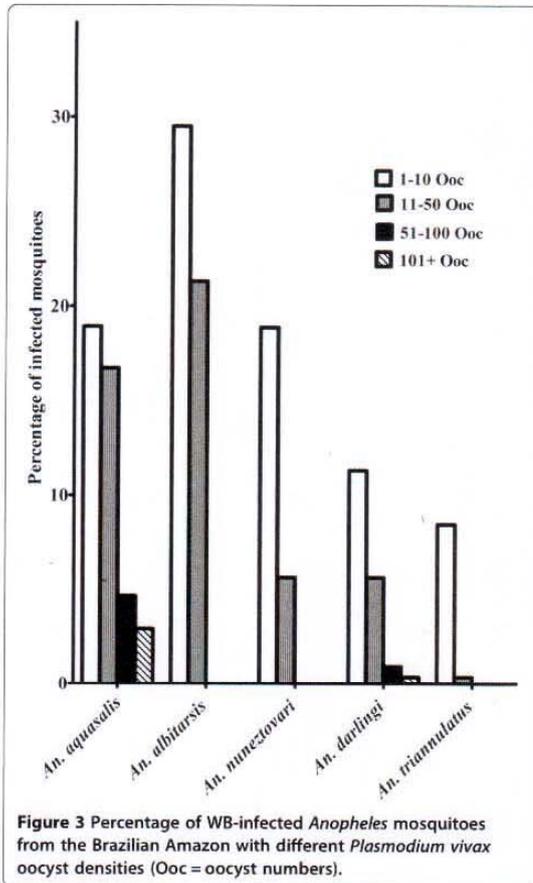
considered the main malaria vector in the Brazilian Amazon, and all three species showed high quantity of oocysts, being that the highest one was found in *An. aquasalis*. These results confirm that the membrane-feeding assay is as efficient as direct feeding on human skin when it comes to the study of *Plasmodium* infection on mosquito vectors.

*Anopheles darlingi* in Amazon area is more abundant during the late wet season and early dry season, while the other species are more abundant during the early dry season [44,67]. Similar situation occurs in Manaus region (personal observation). During the time period when *An. darlingi* was in high abundance, *An. albitarsis s.l.* and *An. nuneztovari s.l.* were in low abundance. When the abundance of *An. darlingi* was low, *An. albitarsis s.l.* and *An. nuneztovari s.l.* abundance increased. This dynamics in species succession is a very important factor for maintenance of malaria transmission, and can present difficulties for malaria control in this region due to susceptibility of all studied species to *P. vivax* infection [68].

Here, it was demonstrated that *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari s.l.*, and *An. triannulatus s.l.* field populations, and the laboratory-colonized *An. aquasalis* are susceptible to *P. vivax* under laboratory conditions. All of the studied species might be sporadic competent vectors in nature, although there was a generalized high proportion of uninfected mosquitoes. However, infection rates were much higher than those reported in nature for the five species examined. As determined by the ELISA technique, based on the use of species-specific anti-

sporozoite monoclonal antibodies, Amazonian mosquito populations had different *P. vivax* infection rates: *An. darlingi* ranged from 0.3 to 9.3%; *An. albitarsis s.l.* from 0.4 to 5.2%; *An. nuneztovari s.l.* from 0.3 to 1.1%; *An. triannulatus s.l.* 0.2% and *An. aquasalis* from 0.3 to 1.3% [15,18,20-25,27,69-71]. Since this study used blood infected with gametocytes that was offered to mosquitoes, higher infection rates were expected, but variable infectivity in the same setting of gametocytaemia was observed. Differences in infectivity of the different blood samples could be due to a combination of variables, such as, gametocyte maturity, gametocyte gender ratio, different *P. vivax* genotypes, immune factors in patient sera, and host response mechanisms, all of which could alter gametocyte infectivity [27,48,72-74].

The number of oocysts has little importance in malaria epidemiology since most infected mosquitoes found in nature only possesses a few oocysts [75]. The degree of anthropophily in nature is probably the most important factor to determine vector capacity [76]. In sites around Manaus, Brazil, *An. darlingi* is known to be strongly anthropophilic and endophilic, and population of this species occurs through the year. *Anopheles albitarsis s.l.* was shown to be a very susceptible species to *P. vivax*, and these results agree with results obtained in other Brazilian Amazonian states of Roraima, Pará, Amapá and Rondônia [15,16,19,70]. However, Klein and collaborators considered *An. albitarsis s.l.* a dubious malaria vector because of the low number of oocysts, zoophilic behavior and seasonal distribution [44]. Like *An. darlingi*



and *An. albitarsis* s.l., *An. aquasalis* showed a high susceptibility to *P. vivax*. The high level of susceptibility of *An. aquasalis* to *P. vivax* indicates the value of using this species in studying New World malarial parasite vector-interaction. Unlike *An. darlingi*, *An. aquasalis* is well adapted to colonization in the laboratory.

*Anopheles nuneztovari* s.l. also showed a high infection rate, although not statistically different to *An. darlingi*, it was significantly different to *An. albitarsis* s.l. Oocyst numbers in *An. nuneztovari* s.l. were lower than in *An. darlingi* and *An. albitarsis* s.l., although the mean number of oocysts was not significantly different between these species. *Anopheles nuneztovari* s.l. is considered an important malaria vector in some South American countries [30,31]; however, for others, this species is not considered a malaria vector because natural infections are rarely observed and when they are, infection rates are very low [18,23,24]. The results presented here clearly suggest the high potential of *An. nuneztovari* s.l. as a vector of malaria, which could be considered a risk depending on its density in a given area. In the Manaus area for example, *An. nuneztovari* s.l. is probably an important species for malaria transmission, because of its high feeding and infection rates observed in laboratory. The population of this species was found in high densities in localities around Manaus where *An. darlingi* is also abundant [18]. On the other hand, although *An. triannulatus* s.l. became infected with *P. vivax* in the experiments described here, this species had significantly the lowest infection rates and mean number of oocysts compared with the other species studied. These observations reinforce the conclusion that *An. triannulatus* s.l. is not an important malaria vector in the Amazon region [15,16,44,68].

Except for *An. albitarsis* s.l. and *An. aquasalis*, mosquito infection rates were increased after blood serum inactivation. Blood serum factors have been shown to influence the ability of *P. vivax* gametocytes to infect mosquitoes in experiments in which patient plasma was replaced with *P. vivax*-naïve sera or plasma [46,66]. Infection in these two mosquito species does not appear to be strongly related to host immune factors. Resistance to *Plasmodium* infection in *An. albitarsis* s.l. and *An. aquasalis* may be more strongly associated with intrinsic factors related to the mosquito's own immune system, which could respond more effectively to destroy *Plasmodium* infections. Future studies should include evaluation of *P. vivax* strain variability on mosquito susceptibility and both intra- and interspecific variation in mosquito immune responses to *Plasmodium* infection.

The results also indicate that the quantity of gametocytes are positively correlated with the infection rate and the number of oocysts formed, but when results were analyzed by individual species only *An. darlingi* and *An.*

*aquasalis* had a positive correlation between the quantity of gametocytes and the other two variables. However, according to Klein and collaborators there was no correlation between the number of *P. falciparum* gametocytes and the mean number of oocysts formed in *An. darlingi*, although, in general, low numbers of circulating gametocytes resulted in few infected mosquitoes [17]. Distinct results could be related to observational methods for verifying the quantity of gametocytes, as determined by light microscopy, which does not predict *P. vivax* transmission to mosquitoes [77].

### Conclusion

Development of novel malaria control strategies includes methods aimed at disrupting parasite development in the mosquito vector. Studying natural vector-parasite interactions, as opposed to model systems, is critical to the development of strategies that can ultimately be used in the field. These studies are made difficult in cases where mosquito vectors cannot be colonized in the laboratory. Such is the case with many of the vectors in South America, including the main vector *An. darlingi*, which has not been colonized after several efforts by distinct research groups (personal observation). Only *An. aquasalis*, the main vector in coastal Brazil, has been established and maintained in the laboratory. This study established baseline data for key transmission parameters showing that in laboratory, *P. vivax* infection of colonized *An. aquasalis* had an infection rate of 44.8% with a mean oocyst count of 29 per infected individual. It is possible now to begin using this system to explore mosquito immune response to *P. vivax* infection [57-59].

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

CMRV, FACP, RS, PFPP, NFCS, WPT, and MVGL conceived and designed the experiments; CMRV, KMC, RS, FACP, EVS, and JBPL: field collection and laboratory procedures; CMRV and TJI: data analysis; CMRV, PFPP, TJI, WMM, FACP, WPT, MVGL, and NFCS: data interpretation and manuscript preparation. This manuscript is a part of the PhD thesis developed by CMRV and supervised by PFPP. PFPP is a senior visiting researcher at the Foundation of the Tropical Medicine Dr. Heitor Vieira Dourado in Manaus (FMT-HVD). PFPP, NFCS and MVGL are productivity fellows of the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq). All authors read and approved the final version of this article.

### Acknowledgements

To the technicians of the Foundation of the Tropical Medicine Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) namely: Iria Cabral Rodrigues and Sara Gisele Maia da Silva for rearing mosquitoes and membrane-feeding assays; also acknowledgement for patient recruitment, blood collection and malaria thick smear preparation to Wellington Silva and Maria Raimunda da Costa; and José Eckner Alves Lessa for smear evaluation for malaria diagnoses. We would like to thank the technicians from District Health Posts of Puraquequara and Ramal do Brasleirinho, namely Gelsony Paz Procópio, Edmar de Oliveira Valente, Joab Nascimento and Aldo Rodrigues. The authors are grateful to Ricardo Mota and Diego Leite for their help in the fieldwork and to Carlos Praia, Gervilane Ribeiro and João Bosco for mosquito identification. We would especially like to thank all the innumerable unnamed malarial patients for donating their blood samples, without whom this research project would not be possible.

### Financial support

This study was partially funded by Bill & Melinda Gates Foundation (TransEpi Study) and by the following Brazilian agencies: Foundation of the Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Strategic Programme for Supporting Health Research (PAPEs V), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG) and Amazonas State Research Support Foundation (FAPEAM). CMRV received PhD scholarships from FAPEAM.

### Author details

<sup>1</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz - Amazonas, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, 69057-070 Manaus, AM, Brazil. <sup>2</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil. <sup>4</sup>Ministerio da Saúde, Núcleo Amazonas/Fundação de Vigilância em Saúde, Manaus, AM, Brazil. <sup>5</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil. <sup>6</sup>Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil. <sup>7</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brazil. <sup>8</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz-Minas Gerais, Av. Augusto de Lima, 1715, CEP 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil.

Received: 20 October 2013 Accepted: 17 December 2013

Published: 21 December 2013

### References

1. WHO: *WHO global malaria programme: world malaria report 2013*. Geneva: World Health Organization; 2013.
2. Ministério da Saúde, Sistema de vigilância em Saúde: **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011**. *Bol Epidemiol* 2013, **44**:1-16.
3. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim M: **Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon**. *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:1611-1614.
4. Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, Russell B, Renia L, Marinho CR, Lacerda MV: **On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field**. *Int J Parasitol* 2012, **42**:1099-1105.
5. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, Filho FS, Brasil P, Ventura AM, Tada MS, Couto VS, Silva AR, Silva RS, Alecrim MG: **Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature**. *Malar J* 2012, **11**:12.
6. Raposo CCBS, Santos JB, Santos GMC, Gonçalves EGR, Silva AR: **Plasmodium vivax malaria: related factors to severity in the State of Maranhão, Brazil**. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013, **46**:67-72.
7. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM: **Vivax malaria: neglected and not benign**. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**(6):79-87.
8. Baird JK: **Neglect of Plasmodium vivax malaria**. *Trends Parasitol* 2007, **23**:533-539.
9. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN: **Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia**. *PLoS Med* 2008, **5**:e128.
10. Price RN, Douglas NM, Anstey NM: **New developments in Plasmodium vivax malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance**. *Curr Opin Infect Dis* 2009, **22**:430-435.
11. Deane L: **Malaria vectors in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986, **81**:5-14.
12. Zimmerman RH: **Ecology of the malaria vectors in the Americas and future direction**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, **87**:371-383.
13. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Boeckel TV, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI: **The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis**. *Parasit Vectors* 2010, **3**:72.
14. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI: **A global map of dominant malaria vectors**. *Parasit Vectors* 2012, **5**:69.
15. Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH: **Potential vectors of malaria and their different susceptibility to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Northern Brazil identified by immunoassay**. *Am J Trop Med Hyg* 1986, **35**:873-881.

16. Oliveira-Ferreira J, Lourenço de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT: **Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State Brazilian Amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 1990, **43**:6–10.
17. Klein T, Lima JBP, Tada M, Miller R: **Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil, to infection by *Plasmodium vivax*.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **45**:463–470.
18. Tadei WP, Thatcher BD: **Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of subgenus *Nysorhynchus*.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000, **42**:87–94.
19. Silva-Vasconcelos A, Kató MYN, Mourão EN, Souza RTL, Lacerda RNL, Sibajev A, Tsouris P, Póvoa MM, Momen H, Rosa-Freitas MG: **Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of Anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**:151–161.
20. Povoia M, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JCOF, Segura MNO, Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RNL, Souza RTL, Galiza D, Santa Rosa E, Wirtz RA: **Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belem, Pará, Brazil.** *J Med Entomol* 2003, **40**:379–386.
21. Povoia M, Souza RTL, Lacerda RNL, Santa Rosa E, Galiza D, Souza JR, Wirtz RA, Schlichting CD, Conn JE: **The importance of *Anopheles albittarsis* E and *Anopheles darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Amazonian Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:163–168.
22. Santos RL, Sucupira IM, Lacerda RN, Fayal Ada S, Póvoa MM: **Entomological survey and infectivity during malaria outbreak in the Anajás municipality, Pará State.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, **38**:202–204.
23. Santos RL, Padilha A, Costa MD, Costa EM, Dantas-Filho Hde C, Povoia MM: **Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon.** *Rev Saude Publica* 2009, **43**:859–868.
24. Galardo AKR, Arruda M, Couto A, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH: **Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:461–469.
25. Rocha JAM, Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Kretzl AU: **Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon region, Brazil.** *Am Trop Med Hyg* 2008, **78**:872–877.
26. Galvão ALA, Damasceno RG, Marques AP: **Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará.** *Arq Higien* 1942, **12**:51–110.
27. Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Póvoa MM: **Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:547–550.
28. Laubach HE, Validum L, Bonilla JA, Agar A, Cummings R, Mitchell C, Cuadrado RR, Palmer CJ: **Identification of anopheles aquasalis as a possible vector of malaria in Guyana, south America.** *West Indian Med J* 2001, **50**:319–321.
29. Hiwat H, Issaly J, Gaborit P, Somai A, Samjrhawan A, Sardjoe P, Soekhoe T, Girod R: **Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010, **104**:207–213.
30. Rubio Palis Y, Wirtz RA, Curtis CF: **Malaria entomological inoculation rates in Western Venezuela.** *Acta Trop* 1992, **52**:167–174.
31. Hayes J, Calderon G, Falcon R, Zambrano V: **Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru.** *J Am Mosq Control Assoc* 1987, **3**:418–422.
32. Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML: ***Anopheles* species present in the department of Putumayo and their natural infectivity with *Plasmodium*.** *Biomedica* 2013, **33**:42–52.
33. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, González R: **Malaria vector species in Colombia: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**:223–238.
34. Benarroch EI: **Studies of malaria in Venezuela.** *Am J Hyg* 1931, **14**:690–693.
35. Chadee DD, Kitron U: **Spatial and temporal patterns of imported malaria cases and local transmission in Trinidad.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**:513–517.
36. Berti J, Zimmerman R, Amarista J: **Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993, **88**:353–362.
37. Shahabuddin M, Kaslow DC: **Biology of the development of *Plasmodium* in the mosquito midgut: a molecular and cellular view.** *Bull Inst Pasteur* 1994, **92**:119–132.
38. Sinden RE: **Excystment by sporozoites of malaria parasites.** *Nature* 1974, **252**:314.
39. Beier JC: **Malaria parasite development in mosquitoes.** *Annu Rev Entomol* 1998, **43**:519–543.
40. Gamage-Mendis AC, Rajakaruna R, Weerasinghe S, Mendis C, Carte R, Mendis KN: **Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**:3–6.
41. Sinden RE, Alavi Y, Raine JD: **Mosquito - malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness.** *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34**:625–629.
42. Gouagna LC, Mulder B, Noubissi E, Tchuinkam T, Verhave JP, Boudin C: **The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy.** *Trop Med Int Health* 1998, **3**:21–28.
43. Vaughan JA: **Population dynamics of plasmodium sporogony.** *Trends Parasitol* 2006, **23**:63–70.
44. Klein TA, Lima JB, Tang A: **Vector incrimination and effects of antimalarial drugs on malaria transmission and control in the Amazon basin of Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, **87**:393–397.
45. Hurd H, Carter V, Nacer A: **Interactions between malaria and mosquitoes: the role of apoptosis in parasite establishment and vector response to infection.** *CTMI* 2005, **289**:185–218.
46. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, Warmerdam T, Awono-Ambene PH, Bonnet S, Diallo M, Coulibaly M, Tchuinkam T, Mulder B, Targett G, Drakeley C, Sutherland C, Robert V, Doumbo O, Toure Y, Graves PM, Roeffen R, Sauerwein R, Birkett A, Locke E, Morin M, Wu Y, Churcher TS: **Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers.** *PLoS One* 2012, **7**:e42821.
47. Guttery DS, Holder AA, Tewari R: **Sexual development in *Plasmodium*: lessons from functional analyses.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002404.
48. Abeles SR, Chuquiyauri R, Tong C, Vinetz JM: **Human host-derived cytokines associated with *Plasmodium vivax* transmission from acute malaria patients to *Anopheles darlingi* mosquitoes in the Peruvian Amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88**:1130–1137.
49. Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C: **Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes.** *EMBO J* 2000, **19**:6030–6040.
50. Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PFP, Barillas-Mury C: **Midgut epithelial responses in different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper model of epithelial repair in *Aedes aegypti*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:4010–4015.
51. Pimenta PF, Touray M, Miller L: **The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland.** *J Eukaryot Microbiol* 1994, **41**:608–624.
52. Jaramillo-Gutierrez G, Rodrigues J, Ndikuyezere G, Povelones M, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C: **Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes.** *BMC Microbiol* 2009, **30**:154.
53. González-Lázaro M, Dinglasan RR, Hernández-Hernández Fde L, Rodríguez MH, Laclaustra M, Jacobs-Lorena M, Flores-Romo L: ***Anopheles gambiae* croquemort SCRbQ2, expression profile in the mosquito and its potential interaction with the malaria parasite *Plasmodium berghei*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:395–402.
54. Carvalho SC, Martins Junior AJ, Lima JB, Valle D: **Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albittarsis* and *Anopheles aquasalis*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**:1117–1120.
55. Arruda ME, Rios RI, Arantes PC, Oliveira AC, Nascimento LP: **Manutenção em laboratório de *Anopheles albittarsis* e *Anopheles aquasalis* por copula induzida.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1982, **77**:89–91.
56. Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Santa Rosa EP, Souza RTL, Galiza D, Sucupira I, Conn JE, Povoia ME: **Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: culicidae) in Belem, Para, Brazil.** *J Med Entomol* 2006, **43**:107–109.
57. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Pinheiro WD, Tadei WP, Secundino NF, Traub-Csekö YM, Pimenta PF: ***Anopheles aquasalis* infected by *Plasmodium vivax* displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and plasmodia.** *PLoS One* 2010, **5**:e9795.
58. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HR, Guedes BA, Orfanó AS, Tadei WP, Rios-Velásquez CM, Han YS, Secundino NF, Barillas-Mury C, Pimenta PF, Traub-Csekö YM: **The JAK-STAT pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e1317.

59. Bahia AC, Oliveira JH, Kubota MS, Araújo HR, Lima JB, Rios-Velásquez CM, Lacerda MV, Oliveira PL, Traub-Csekö YM, Pimentá PF: **The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection.** *PLoS One* 2013, **8**:e57014.
60. Faran ME, Linthicum KJ: **A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae).** *Mosq Syst* 1981, **13**:1–81.
61. Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG: *Clave ilustrada para los anofelinos de Sudamérica oriental*. Atlanta: Communicable Disease Center, United States Public Health Service; 1967.
62. Conover WJ: *Practical nonparametric statistics*. New York: Wiley; 1999.
63. Hollander ME, Wolfe DA: *Nonparametric statistical methods*. Nova Jersey: Wiley; 1999.
64. Klein T, Tada M, Lima JBP: **Infection of *Anopheles darlingi* fed on patients with *Plasmodium falciparum* before and after treatment with quinine or quinine plus tetracycline.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **44**:604–608.
65. Alves FP, Gil LH, Marelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Silva LH: **Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon.** *J Med Entomol* 2005, **42**:777–779.
66. Bharti A, Chuquiyaui R, Brouwer KC, Stancil J, Lin J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM: **Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:610–616.
67. Klein T, Lima JBP: **Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil.** *J Am Mosq Control Assoc* 1990, **6**:700–707.
68. Deane LM, Daniel Ribeiro C, Lourenço de Oliveira R, Oliveira-Ferreira J, Guimarães AÉ: **Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia state-Brazil and problems related to its control.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1988, **30**:153–156.
69. Couto AA, Calvosa VA, Lacerda R, Castro F, Santa-Rosa E, Nascimento JM: **Controle da transmissão da malária em área de garimpo no Estado do Amapá com participação da iniciativa privada.** *Cad Saude Publica* 2001, **17**:897–907.
70. Póvoa M, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, Warhurst D: **Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon region, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96**:179–184.
71. Martins-Campos KM, Pinheiro WD, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Melo GC, Rodrigues IC, Fé NF, Barbosa M, Tadei WP, Guinovart C, Bassat Q, Alonso PL, Lacerda MV, Monteiro WM: **Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon.** *Malar J* 2012, **11**:351.
72. Gonzalez-Ceron L, Rodríguez MH, Entel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernández JE: **Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in Southern Mexico.** *Infect Immun* 1999, **67**:410–412.
73. Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Ribeiro CT, Goldberg AC, Banic DM: **HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria.** *Acta Trop* 2004, **92**:63–69.
74. Souza-Nelras WC, Luciane M, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA, Couto ARA, Soares JS, Carvalho LH, Cunha MG, Póvoa MM, Herrera S, Herrera MA, Rossit ARB, Carareto CMA, Machado RLD: **Research *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences?** *Malar J* 2010, **9**:178.
75. Adak T, Singh OP, Das MK, Wattal S, Nanda N: **Comparative susceptibility of three important malaria vectors *Anopheles stephensi*, *Anopheles fluviatilis*, and *Anopheles sudaicus* to *Plasmodium vivax*.** *J Parasitol* 2005, **91**:79–82.
76. Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Yadav RS, Shukla RP, Dua VK, Sharma VP: ***Anopheles fluviatilis* complex: host feeding patterns of species S, T, and U.** *J Am Mosq Control Assoc* 1996, **12**:147–149.
77. Sattabongkot J, Maneechai N, Rosenberg R: ***Plasmodium vivax*: gametocyte infectivity of naturally infected Thai adults.** *Parasitology* 1991, **102**:27–31.

doi:10.1186/1475-2875-12-460

Cite this article as: Rios-Velásquez et al.: Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malaria Journal* 2013 **12**:460.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



Abeles SR, Chuquiyaui R, Tong C, Vinetz JM: Human host-derived cytokines associated with *Plasmodium vivax* transmission from acute malaria patients to *Anopheles darlingi* mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2013, 88: 1130–1137.

Abraham EG, Islam S, Srinivasan P, Ghosh AK, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Kafatos FC, Dimopoulos G, Jacobs-Lorena M. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptional repertoire during ookinete development and midgut invasion. *J Biol Chem* 2004, 279(7): 5573-5580.

Adak T, Singh OP, Das MK, Wattal S, Nanda N: Comparative susceptibility of three important malaria vectors *Anopheles stephensi*, *Anopheles fluviatilis*, and *Anopheles sundaicus* to *Plasmodium vivax*. *J Parasitol* 2005, 91: 79–82.

Agaisse H, Perrimon N. The role of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 2004, 198: 72-82.

Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* 2007, 66(2): 291-302.

Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, Billker O, Franke-Fayard B, Janse CJ, Waters A, Sinden RE. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol* 2003, 33: 933-943.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim M. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010, 16(10): 1611-4.

Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Silva LHP. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol* 2005, 42(5): 777-779.

Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009, 63: 195-221.

Angrisano F, Tan YH, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut – placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *Interntl J Parasitol* 2012, 42: 519-527.

Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012, 4(1): e2012013.

Arbouzova NI, Zeidler MP. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 2006, 133: 2605-2616.

Arruda ME, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH: Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 1986, 35: 873–881.

Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RMC, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102(3): 367-371.

Awono-Ambene HP, Diawara L, Robert V. Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001, 64(1, 2): 32-34.

Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HR, Guedes BA, Orfanó AS, Tadei WP, Ríos-Velásquez CM, Han YS, Secundino NF, Barillas-Mury C, Pimenta PF, Traub-Csekö YM. The JAK-STAT pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, 5(11): e1317.

Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Pinheiro WD, Tadei WP, Secundino NFC, Traub-Cseko YM, Pimenta PFP. *Anopheles aquasalis* infected by *Plasmodium vivax* displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and plasmodia. *Plos One* 2010, 5(3): e9795.

Bahia AC, Oliveira JH, Kubota MS, Araújo HR, Lima JB, Ríos-Velásquez CM, Lacerda MV, Oliveira PL, Traub-Csekö YM, Pimenta PF. The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection. Plos One 2013, 8(2): e57014.

Barillas-Mury. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. Trends Parasitol 2007, 23(7): 297-299.

Barillas-Mury C, Charlesworth A, Gross I, Richman A, Hoffmann JA, Kafatos FC. Immune factor Gambifl, a new Rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. EMBO J 1996, 15(17): 4961-4701.

Barillas-Mury C, Han Y, Seeley D, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. EMBO J 1999, 18(4): 959-967.

Barillas-Mury C, Wizel B, Han YS. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. Insect Biochem Mol Biol 2000, 30: 429-442.

Baton L, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. Trends Parasitol 2005, 21(12): 573-580.

Bharti A, Chuquiyauri R, Brouwer KC, Stancil J, Lin J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM. Experimental infection of the Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg 2006, 75: 610-616.

Blumberg BJ, Trop S, Das S, Dimopoulos G. Bacteria- and Imd pathway-independent immune defenses against *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. Plos One 2013, 8(9): e72130.

Böete C. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. Trends Parasitol 2005, 21(10): 445-447.

Bonnet S, Gouagna S, Jean-Yves S. Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate infectiousness of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers to mosquitoes. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2000, 94: 103-106.

Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, Warmerdam T, Awono-Ambene PH, Bonnet S, Diallo M, Coulibaly M, Tchuinkam T, Mulder B, Targett G, Drakeley C, Sutherland C, Robert V, Doumbo O, Toure Y, Graves PM, Roeffen R, Sauerwein R, Birkett A, Locke E, Morin M, Wu Y, Churcher TS. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Plos One* 2012, 7(8): e42821.

Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira UM. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop* 2000, 33(5): 489-92.

Chadee DD, Kitron U. Spatial and temporal patterns of imported malaria cases and local transmission in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 61: 513-517.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins F, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002, 298: 159-165.

Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Develop Comp Immunol* 2010, 34: 387-395.

Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol* 2010, 26(3):

Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F, Christophides GK, Fontenille D, Kafatos FC. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Reports* 2006, 7: 1285-1289.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev 2005, 18(3): 570-581.

Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, Russell B, Renia L, Marinho CR, Lacerda MV. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. Int J Parasitol 2012, 42(12): 1099-105.

Couto AA, Calvosa VS, Lacerda R, Castro F, Santa Rosa E, Nascimento JM. Controle da transmissão da malária em área de garimpo no Estado do Amapá com participação da iniciativa privada. Cad Saúde Púb 2001, 17(4): 897-907.

Davis NC. A note on the malaria carrying Anophelines in Belém, Pará and Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. Rev Malariol 1931, 10 (10).

Deane LM, Causey OR, Deane MP. Notas sôbre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serv Esp Saúde Púb 1948, 1(4): 827-965.

Deane L. Malaria vectors in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986, 81(II): 5-14.

Deane LM, Daniel Ribeiro C, Lourenço de Oliveira R, Oliveira-Ferreira J, Guimarães AE: Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia state-Brazil and problems related to its control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1988, 30: 153–156.

Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. Cell Microbiol 2003, 5(1): 3–14.

Dimopoulos G, Casavant L, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of novel mosquito innate immunity genes from ESTs generated from immune competent cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 6619-6624.

Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Kafatos FC. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge and malaria infection. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 8814-8819.

Dimopoulos G, Richman A, Muller HM, Kafatos FC. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94(21): 11508-13.

Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. EMBO J 1998, 17(21): 6115–6123.

Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. PloS Path 2006, 2(6): 513-525.

Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA, Imler JL. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. Nat Immunol 2005 , 6: 946-953.

Duarte AMRC, Pereira DM, Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, Mello MHS, Matos Jr MO, Mucci LF, Fernandes LN, Natal D, Malafronte RS. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. Parasites Vectors 2013, 6: 58.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghoniaim A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. Nat Genet 2003, 33: 388-391.

Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles* (*Anopheles intermedius* Peryassú, *An. (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, *An. (Nys.) oswaldoi* Peryassú as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012, 107(3): 429-432.

Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culcidae). Mosq Syst 1981, 13: 1-81.

Faye FBK, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, Rogier C, Trape JF. Diagnostic criteria and risk factors for *Plasmodium ovale* malaria. J Infect Dis 2002, 186: 690-5.

Ferguson HM, Read AF. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol* 2002, 18: 256-261.

Forattini OP. *Culicidologia médica*. Volume 2. Ed. São Paulo: Universidade de São Paulo; 860 pp. 2002.

Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Levashina EA. Boosting NF $\kappa$ B-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. *Immunity* 2006, 25(4): 677-85.

Galardo AKR, Arruda M, Couto AAR, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 76: 461-469.

Galvão ALA, Damasceno RG, Marques AP. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará. *Arq Higen* 1942, 12: 51–110.

Garver LS, Bahia AC, Das S, Souza-Neto JA, Shiao J, Dong Y, Dimopoulos G. *Anopheles* Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-*Plasmodium* action. *PLoS Pathog* 2012, 8(6): e1002737.

Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *Plos Path* 2009, 5(3): e1000335.

Garver LS, Oliveira G de A, Barillas-Mury C. The JNK pathway is a key mediator of *Anopheles gambiae* antiplasmodial immunity. *Plos Pathog* 2013, 9(9): e1003622.

Gonzalez-Ceron L, Rodríguez MH, Entel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernandez JE: Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. *Infect Immun* 1999, 67: 410–412.

Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG. *Clave ilustrada para los anofelinos de Sudamérica Oriental*. Atlanta: Communicable Disease Center, United States Public Health Service; 1967.

Graves PM. Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1980, 74(6): 738-42.

Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PF, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102 (11): 4010-4015.

Gupta L, Molina-Cruz A, Kumar S, Rodrigues J, Dixit R, Zamora RE, Barillas-Mury C. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. Cell Host Microbe 2009, 5: 498-507.

Harbach RE. *Anopheles* classification. Mosquito Taxonomic Inventory. [Internet database]. [Update 21 November 2013, acess 20 Dezember 2013]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>.

Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IRF, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HCJ. Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. Plos Med 2010, 7(2): e1000209.

Hayes J, Calderon G, Falcon R, Zambrano V. Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. J Am Mosq Control Assoc 1987, 3(3): 418-22.

Hillyer JF. Transcription in mosquito hemocytes in response to pathogen exposure. J Biol. 2009 Jun, 8: 51.

Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. Internatl J Parasitol 2007, 37: 673-681.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. J Parasitol 2003, 89(1): 62-69.

Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasites Vectors* 2011, 4: 177.

Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY, Lai JH. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol* 2005, 174: 8163-8172.

Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003, 299: 1575-1578.

Klein T, Lima JBP: Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 1990, 6: 700–707.

Klein TA, Lima JB, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1991b, 44: 598-603.

Klein T, Lima JBP, Tada M, Miller. Comparative susceptibility of anopeline mosquitoes in Rondonia, Brazil, to infection by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 1991a, 45: 463–470.

Klein TA, Lima JB, Tang A. Vector incrimination and effects of antimalarial drugs on malaria transmission and control in the Amazon basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87(Suppl 3): 393-7.

Lacerda MV, Fragoso SC, Alecrim MG, Alexandre MA, Magalhães BM, Siqueira AM, Ferreira LC, Araújo JR, Mourão MP, Ferrer M, Castillo P, Martin-Jaular L, Fernandez-Becerra C, del Portillo H, Ordi J, Alonso PL, Bassat Q. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis* 2012, 55(8): e67-74.

Leclerc V, Reichhart JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 2004, 198: 59-71.

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007, 25: 697-743.

Levashina EA. Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2004, 34(7): 673-8.

Lin CC, Chou CM, Hsu YL, Lien JC, Wang YM, Chen ST, Tsai SC, Hsiao PW, Huang CJ. Characterization of two mosquito STATs, AaSTAT and CtSTAT. Differential regulation of tyrosine phosphorylation and DNA binding activity by lipopolysaccharide treatment and by Japanese encephalitis virus infection. *J Biol Chem* 2004, 279(5): 3308-3317.

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

Martins-Campos KM, Pinheiro WD, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Melo GC, Rodrigues IC, Fé NF, Barbosa M, Tadei WP, Guinovart C, Bassat Q, Alonso PL, Lacerda MV, Monteiro WM: Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. *Malar J* 2012, 11: 351.

Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Rev Microbiol* 2013, 11: 701-712.

Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR, Kafatos FC. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *PNAS* 2006, 103(45): 16858-16863.

Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C. Reactive Oxygen Species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J Biol Chem* 2008, 283(6): 3217-3223.

Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, González R. Malaria vector species in Colombia: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106(Suppl 1): 223-38.

Mourya DT, Gokhale MD, Barde PV, Padbidri VS. A simple artificial membrane-feeding method for mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94: 460.

MS/SVS - Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

MS / SVS / Sivep malária - Ministério da Saúde (Brasil) / Secretaria de Vigilância em Saúde / Sistema de informação de Vigilância Epidemiológica. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Brasil 2010 e 2011. [Base de dados em internet]. [Atualizado em Setembro de 2013, acessado em 20 Dezembro 2013]. Disponível em:

[[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/08/dados\\_malaria\\_brasil\\_2010\\_2011\\_at2013\\_svs.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/08/dados_malaria_brasil_2010_2011_at2013_svs.pdf)]. 2013b.

MS/SVS. Ministério da Saúde (Brasil) / Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. *Bol Epidemiol.* 2013a, 44(1): 1-16.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet* 2009, 9: 555-566.

Mueller I, Zimmerman AP, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends Parasitol* 2007, 23(6): 278-283.

Muirhead-Thompson RC. The malaria infectivity of an African village population to mosquitoes (*An. gambiae*). A random xenodiagnostic survey. *Am J Trop Med Hyg* 1957, 6: 971-979.

Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Yadav RS, Shukla RP, Dua VK, Sharma VP: *Anopheles fluviatilis* complex: host feeding patterns of species S, T, and U. *J Am Mosq Control Assoc* 1996, 12: 147–149.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 2000, 4(4): 423-30.

Naranjo-Diaz N, Rosero DA, Rua-Urbe G, Luckhart S, Correa MM. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic área. *Parasites Vectors* 2013, 6: 61.

Neves A, Urbinatti PR, Malafronte R dos S, Fernandes A, Paganini W da S, Natal D. Malaria outside the Amazon region: natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. *Acta Trop* 2013, 125(1): 102-6.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria J* 2010, 9: 115.

Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1990, 43: 6-10.

Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Ribeiro CT, Goldberg AC. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop* 2004, 92(1): 63-9.

Orjuela LI, Herrera M, Erazo H, Quiñones ML. *Anopheles* species present in the department of Putumayo and their natural infectivity with *Plasmodium*. *Biomedica* 2013, 33(1): 42-52.

Osta M, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 2004, 303: 2030-32.

Paily KP, Hoti SL, Balaraman K. Development of lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) in mosquito species (Diptera: Culicidae) fed artificially on microfilaremic blood. *J Med Entomol* 2006, 43(6): 1222-6.

Pimenta PF, Touray M, Miller L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol* 1994, 41: 608-624.

Pothikasikorn J, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Roongruangchai K, Roongruangchai J. Comparison of blood feeding response and infection of *Aedes aegypti* to *Wuchereria*

*bancrofti* using animal membranes and direct host contact. J Am Mosq Control Assoc 2007, 23(3): 294-8.

Póvoa M, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JCOF, Segura MNO, Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RNL, Souza RTL, Galiza D, Santa Rosa E, Wirtz RA. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belem, Pará, Brazil. J Med Entomol 2003, 40: 379-386.

Póvoa MM, Souza RT, Lacerda RN, Rosa ES, Galiza D, de Souza JR, Wirtz RA, Schlichting CD, Conn JE. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006, 101(2): 163-8.

Póvoa M, Wirtz R, Lacerda R, Miles M, Warhurst D. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapá, Amazon region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001, 96:179-84.

Raposo CC, Santos JB, Santos GM, Gonçalves Eda G, Silva AT. *Plasmodium vivax* malaria: related factors to severity in the State of Maranhão, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013, 46(1): 67-72.

Reyburn AM, Virk A. 22-year-old woman with fever and jaundice after travel to Ghana. Clin Proc 2009, 84(5):461-464.

Rezende HR, Soares RM, Cerutti C Jr, Alves IC, Natal D, Urbinnatti PR, Yamasaki T, Falqueto A, Malafrente R dos S. Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. Neotrop Entomol 2009, 38(2): 272-80.

Richman AM, Dimopoulos G, Seeley D, Kafatos FC. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. EMBO J 1997, 16(20): 6114-6119.

Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, Santos EV, Pessoa FAC, Lima JBP, Monteiro WM, Secundino NFC, Lacerda MVG, Tadei WP, Pimenta. Experimental

*Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malaria J* 2013, 12:460.

Rocha JAM, Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU. Malaria vectors in areas of *Plasmodium falciparum* epidemic transmission in the Amazon Region, Brazil. *Am Trop Med Hyg* 2008, 78: 872-877.

Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 2010, 329: 1353-1355.

Rubio-Palis Y, Wirtz RA, Curtis CF. Malaria entomological inoculation rates in Western Venezuela. *Acta Trop* 1992, 52: 167-174.

Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* 1964, 24: 407-409.

Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis* 2010, 14(3): 299-309.

Santos RL, Padilha A, Costa MD, Costa EM, Dantas-Filho H de C, Povoá MM. Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon. *Rev Saude Pú* 2009, 43: 859-68.

Sattabongkot J, Maneechai N, Phunkitchar V, Eikarat N, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Burge B, Coleman RE. Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate the infectiousness of *Plasmodium vivax* gametocyte carriers to mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2003, 69(5): 529-535.

Sattabongkot J, Maneechai N, Rosenberg R: *Plasmodium vivax*: gametocyte infectivity of naturally infected Thai adults. *Parasitology* 1991, 102: 27–31.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *J Mol Med* 2006, 84: 901-910.

Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2013, 13(10): 900-6.

Sherman IW. A brief history of malaria and discovery of the parasite's life cycle. In: Sherman IW, editor. *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington: American Society of Microbiology; p. 3-22. 1998.

Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Póvoa MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006<sup>a</sup>, 101(5): 547-550.

Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RNL, Santa Rosa E, Souza RTL, Galiza D, Sucupira I, Conn JE, Póvoa MM. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belem, Para, Brazil. *J Med Entomol* 2006b, 43(1): 107-109.

Silva-Vasconcelos A, Kató MYN, Mourão EN, Souza RTL, Lacerda RNL, Sibajev A, Tsouris P, Póvoa MM, Momen H, Rosa-Freitas MG. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of Anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97(2): 151-161.

Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004, 363: 1017-24.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites Vectors* 2012, 5: 69.

Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Boeckel TV, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites Vectors* 2010, 3: 72.

Souza-Neiras WC, Luciane M, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA, Couto ARA, Soares IS, Carvalho LH, Cunha MG, Póvoa MM, Herrera S, Herrera MA, Rossit ARB, Carareto CMA, Machado RLD: Research *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malar J* 2010, 9: 178.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *PNAS* 2009, 106(42): 17841-17846.

Stone WJ, Eldering M, van Gemert GJ, Lanke KH, Grignard L, van de Vegte-Bolmer MG, Siebelink-Stoter R, Graumans W, Roeffen WF, Drakeley CJ, Sauerwein RW, Bousema T. The relevance and applicability of oocyst prevalence as a read-out for mosquito feeding assays. *Sci Rep* 2013, 4(3): 3418.

Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of subgenus *Nysorhynchus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000, 42: 87-94.

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, MacCallum R, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 2007, 316(5832): 1738-1743.

WHO. *WHO global malaria programme. World malaria report 2013*. Geneva: World Health Organization; 2013b.

WHO. World Health Organization. Malaria. [Accessed on 15 December 2013]. Disponível em <http://www.who.int/topics/malaria/en/>. 2013a.

WHO. World Health Organization. Malaria. [Accessed on 15 December 2013]. Disponível em: <http://www.worldmaliareport.org/node/57#>. 2013c.

Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004, 279: 821-824.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Path* 2008, 4(7): e1000098.

Yoeli M. Notes on the experimental infection of *Anopheles elutus* with *Plasmodium falciparum* by feeding through a prepared animal membrane. *Rivista di Malariol.* 1938, 17: 62-66.

Zimmerman RH. Ecology of the malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87(3): 371-383.