

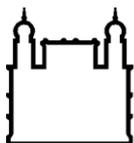
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**ASPECTOS ECOLÓGICOS DA TRANSMISSÃO DA
MALÁRIA EM ÁREA INDÍGENA YANOMAMI, BRASIL**

JORDI SÁNCHEZ RIBAS

Rio de Janeiro
Setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JORDI SÁNCHEZ RIBAS

ASPECTOS ECOLÓGICOS DA TRANSMISSÃO DA MALÁRIA EM ÁREA INDÍGENA YANOMAMI, BRASIL

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador (ES): Prof. Dra. JOSELI DE OLIVEIRA FERREIRA

Prof. Dra. TERESA FERNANDES SILVA DO NASCIMENTO

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

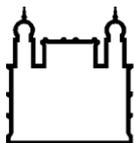
S211 Sánchez Ribas, Jordi

Aspectos ecológicos da transmissão da malária em área indígena
Yanomami, Brasil / Jordi Sánchez Ribas. – Rio de Janeiro, 2015.
xxi, 199 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 178-199

1. *Anopheles*. 2. Ecologia larva. 3. Lagos associados aos rios. 4.
Malária. 5. Yanomami. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JORDI SÁNCHEZ RIBAS

**ASPECTOS ECOLÓGICOS DA TRANSMISSÃO DA
MALÁRIA EM ÁREA INDÍGENA YANOMAMI, BRASIL**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. JOSELI DE OLIVEIRA FERREIRA

Prof. Dra. TERESA FERNANDES SILVA DO NASCIMENTO

Aprovada em: 11/09/2015

EXAMINADORES:

Presidente: Prof. Dr. Claudio Tadeu Daniel Ribeiro (Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz)

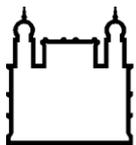
Revisor: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira (Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz)

Prof. Dr. Ronaldo Figueiró Portella Pereira (Universidade Estadual da Zona Oeste)

Prof. Dra. Simone Ladeia Andrade (Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz)

Prof. Dra. Fátima dos Santos (Fundação Nacional de Saúde)

Rio de Janeiro, 11 de setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dedico estes quatro anos de trabalho à
memória do meu avô Jesús Sánchez Sala.

AGRADECIMENTOS

Ao povo Yanomami que nos recebeu com grande generosidade e respeito nas comunidades. A colaboração deles foi crucial no desenvolvimento dos diferentes componentes do presente projeto. Pela oportunidade de compartilhar os seus conhecimentos. Pela admiração que sempre vou ter pelo povo Yanomami.

O mais profundo agradecimento a minha família (Josep Sánchez, Conxita Ribas, Marta Sánchez e Maria Lamarca) por seu constante e fiel apoio, orientações acertadas e pela grande compreensão das dificuldades ao longo de todo o doutorado. Seu apoio foi fundamental nos momentos mais difíceis deste longo caminho.

Enorme agradecimento as minhas orientadoras Joseli de Oliveira Ferreira e Teresa Fernandes Silva do Nascimento pela grande oportunidade de poder trabalhar junto aos Yanomami, sua confiança, enorme apoio ao longo deste processo e também muito importante, uma paciência de ferro.

Aos colegas do Distrito Especial de Saúde Indígena Yanomami que nos acompanharam nas árduas tarefas no campo. Houve momentos de adversidades e complicações, mas foram superados com cooperação e trabalho duro da equipe de campo. Sem a ajuda deles este trabalho não teria sido cumprido. Gostaria de mencionar Cleomar Pereira, Ozimar José de Souza, José Ronaldo dos Santos, Egídio Saraiva e Maria de Jesus do Nascimento, que foram peças muito importantes no cumprimento das longas capturas de anofelinos durante as saídas a campo. Aos enfermeiros, auxiliares de enfermagem e técnicos de endemias dos Polós Base pelo apoio e acolhimento durante o nosso trabalho.

Ao Anderson Augusto Calvet. Grande camarada de viagem e principal apoio nos momentos duros que tivemos que superar no campo.

Aos colegas do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários que tanto me ajudaram com o processamento da imensa quantidade de material e na confecção das bases de dados. À Maria Goreti Rosa Freitas, pelas discussões sobre assuntos científicos e por seus conselhos e reflexões.

À Nildimar Honório pelo apoio mostrado em momentos importantes. Ao Marcelo Quintela pelo apoio ao longo do processo, como na primeira saída a campo e ao Maycon Neves e Glauber Rocha, pelo grande apoio com o processamento das formas imaturas que chegavam constantemente da área. À Tacilaine Divina Cardoso e Lais Araújo de Souza, pela ajuda na digitalização dos dados.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia pelo seu apoio e ânimo durante este processo, especialmente ao Juan Camilo Sánchez, por sua ajuda nas etapas de análise estatística dos dados.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À Coordenação do Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária pelo auxílio financeiro, confiança e apoio nas diferentes etapas deste projeto.

À Secretaria Especial de Saúde Indígena (SESAI) e ao Distrito Sanitário Especial da Saúde Indígena -Yanomami (DSEI-Y) pelo apoio logístico que envolveu todo o trabalho na área.

Ao meus amigos das antigas Lluís Trilla e Sergi Pelayo, pelos conselhos certos no momento certo. Ao Lluís também pelas valiosas contribuições na metodologia com larvas.

Aos nossos colaboradores da Faculdade de Saúde Pública, da Universidade de São Paulo (FSP-USP), Maria Anice Sallum, Tatiane Porangaba e demais colegas da USP, pela grande acolhida e excelente e proveitoso tempo durante meu trabalho com eles em São Paulo.

Aos profissionais da malária que conheci ao longo do meu estágio no Centers for Disease Control de Atlanta, USA, onde tive também uma excelente acolhida e encontrei um excelente ambiente de trabalho e muita aprendizagem. Especial agradecimento ao John Barnwell, Curtis Huber, Justine Pompei, John Gimnig, Venkatachalam Udhayakumar, Naomi Lucchi, Audrey Lenhart e demais colegas de trabalho do CDC.

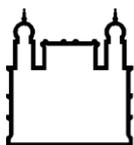
À Antonella Petruzzella pela ajuda na identificação das macrófitas submersas.

Ao Jorge Luiz Nessimian pela ajuda na correta identificação da fauna de macro-invertebrados predadores.

Ao Arion Tulio pela camaradagem e apoio demonstrado durante o trabalho de campo no Marari.

Ao Daniel Barros e Myrna Barata pelo apoio na análise de dados secundários de malária e pelas proveitosas conversas sobre os aspectos operacionais do controle da malária no Brasil.

Ao Wolfgang Junk e Andrey Moreira pelo suporte em material bibliográfico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A malária se constitui numa das principais endemias em populações indígenas na Amazônia. Porém, fatores modeladores da dinâmica da transmissão são ainda pouco entendidos, tais como os determinantes da sua heterogeneidade espacial e da ocorrência de surtos sazonais de elevadas taxas de morbimortalidade. Neste estudo, buscamos determinar a fauna, aspectos ecológicos e taxa de infecção plasmodial de anofelinos em três áreas indígenas Yanomami (Parafuri, Toototobi e Marari). Considerando as três áreas, as espécies mais abundantes foram *An. oswaldoi s.l.* e *An. darlingi*, que juntas corresponderam a 59,5% dos 6.333 anofelinos adultos capturados. No Toototobi, as espécies mais frequentes foram *An. oswaldoi s.l.* (47,3%) e *An. intermedius* (31,8%), em Parafuri foram *An. oswaldoi s.l.* (48,7%) e *An. darlingi* (42,5%) e, em Marari *An. nuneztovari s.l.* (54,9%) e *An. darlingi* (21,6%). A maioria dos anofelinos foi coletada fora das habitações e o pico horário de picadas variou entre crepuscular (*An. oswaldoi s.l.*) e próximo à meia noite (*An. darlingi*). Foram processados 2.014 e 461 anofelinos para a detecção de esporozoítos dentre os coletados nos Polo Base Marari e Toototobi, respectivamente. Sete *An. darlingi* foram positivos para *P. vivax*, com taxas de infecção de 1,63%, 1,52% e 2,02% nas comunidades de Alapusi, Gasolina e Taibrapa, respectivamente. As taxas de inoculação entomológica correspondentes nestas comunidades foram de 65,4, 58,6 e 48,3 picadas infetantes por pessoa por ano no peridomicílio. Identificamos 160 criadouros, sendo 54 em Toototobi, 53 em Parafuri e 53 em Marari e propusemos uma nova classificação de criadouros naturais em oito tipos, baseada principalmente na associação com os pulsos de inundação, sazonalidade e grau de exposição ao sol. Adicionalmente, utilizamos uma nova metodologia para amostrar as formas imaturas, baseada na quantificação da Área Efetiva de Criação (AEC), definida em (m²). Apresentamos também o Modelo de Sanfona, para explicar as flutuações do raio de ocorrência das espécies de anofelinos por estações do ano e sua dispersão em áreas associadas a rios de baixa ordem. A abundância dos tipos de AEC variou muito entre aldeias, assim como as flutuações deste parâmetro entre as diferentes estações do ano. Os três Polos Base estão localizados próximos aos rios de baixa ordem, que se caracterizam por apresentarem flutuações periódicas dos níveis de descarga dos rios, Pulsos de Inundação (PI) de caráter polimodal, de curta duração e imprevisíveis. Foram coletadas 6.295 larvas de anofelinos, das quais 1.399 (22,2%) eram *An. darlingi*, sendo que 96,9% desta espécie foram coletados em lagos associados aos rios (LAR). *An. darlingi* foi a espécie mais abundante nos criadouros em Parafuri (35%), sendo praticamente ausente em Toototobi, onde o *An. oswaldoi s.l.* (12,5%) foi a espécie mais abundante. *An. darlingi* apresentou maiores densidades em criadouros expostos ao sol e associados aos PI. Em contraste, *An. costai-like* predominou em criadouros temporários e não associados aos rios. Os nossos dados mostraram uma marcada heterogeneidade na ocorrência e densidades das espécies de anofelinos entre as comunidades, que explicaria a complexidade da dinâmica da transmissão da malária nestas áreas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Malaria is a major endemic disease in indigenous populations in the Amazon. However, modulating factors of the transmission dynamics are poorly understood, such as the determinants influencing its spatial heterogeneity and the occurrence of seasonal outbreaks associated with high rates of morbidity and mortality. In the present study, we intend to determine the faunal composition, ecological aspects and infection rates of the anophelines occurring in three Yanomami areas (Parafuri, Toototobi and Marari) of Brazil. We collected a total of 6,333 adult anophelines and the most abundant species, considering the three areas, were *An. oswaldoi s.l.* and *An. darlingi*, which together accounted for 59.5% of the total collected. In Toototobi, the most frequent species were *An. oswaldoi s.l.* (47.3%) and *An. intermedius* (31.8%), in Parafuri were *An. oswaldoi s.l.* (48.7%) and *An. darlingi* (42.5%) and in Marari were *An. nuneztovari s.l.* (54.9%) and *An. darlingi* (21.6%). Most anophelines were collected outside the indigenous huts and the biting activity peak differed between crepuscular for *An. oswaldoi s.l.* to near midnight for *An. darlingi*. A total of 2,014 anophelines from Marari were processed for sporozoites detection and 461 from Toototobi. We found 7 *An. darlingi* infected with *P. vivax* in Marari, with infectivity rates of 1.63%, 1.52% and 2.02% in Alapusi, Gasolina and Taibrapa communities respectively. Based in the peridomiliary collections, the Entomological Inoculation Rates (EIR) calculated for these communities were 65.4, 58.6 and 48.3 infective bites per person per year respectively. We identified 160 breeding sites; 54 in Toototobi, 53 in Parafuri and 53 in Marari and we proposed a new larval habitat nomenclature divided in 8 types, based mainly in the association with river flood pulses, seasonality and degree of sun exposure. Also we used a new methodology to sample immature forms, based on the quantification of the Effective Breeding Area (EBA), set in (m²). We also present the Squeezebox Model, in order to explain the fluctuations of the occurrence range of anopheline species in each season and how they disperse in areas associated with low-order rivers. We found high variability of EBA types between communities and different seasons. All three Yanomami areas are located close to low-order rivers, which are characterized by fluctuations of the river discharge or Flood Pulses (FP) that are polymodal, short and unpredictable. We collected a total of 6,295 anopheline larvae, of which 1,399 (22.2%) were *An. darlingi* with 96.9% of this species collected in lakes associated with the river (LAR). *An. darlingi* was the most abundant species in Parafuri (35%) being virtually absent in Toototobi, where *An. oswaldoi s.l.* predominated (12.5%). *An. darlingi* showed higher densities in breeding sites exposed to the sun and associated with flood pulses. In contrast, *An. costai*-like, predominated in larval habitats that were temporary and not associated with river flood pulses. Our data showed a marked heterogeneity in the occurrence and density of *Anopheles* species, which would explain the complexity of the dynamics of malaria transmission in these areas.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
Agradecimentos	vi
Índice.....	xi
Índice de Figuras	xiv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária: perspectiva global e tendências recentes.	1
1.2 As Américas e o Brasil - um mapa complexo da transmissão da malária. .	7
1.3 Atuais estratégias de controle da malária - a situação na Amazônia brasileira.....	11
1.4 Os povos indígenas no Brasil - o caso do povo Yanomami.	15
1.5 Malária no Distrito Sanitário Indígena Yanomami - Breve histórico.....	19
1.6 Hidrogeomorfologia da Amazônia e as diferentes paisagens da malária.	21
1.7 Principais anofelinos neotropicais encontrados na área Yanomami do Brasil - Bionomia e importância médica.	26
1.8 Justificativa para o Estudo.....	35
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 O Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y), Brasil.....	37
3.2 Área de estudo: Parafuri, Toototobi e Marari.....	38
3.3 Características ecológicas da área Yanomami do Brasil.....	43
3.4 Malária nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari.	44
3.5 Coletas de anofelinos.....	47
3.6 Coleta de formas adultas de anofelinos: Atração humana protegida - AHP, armadilhas luminosas CDC e aspirador manual intradomiciliar.....	48
3.7 Dissecção dos ovários para determinação de fêmeas nulíparas/paridas.	51
3.8 Identificação morfológica das espécies de anofelinos.....	52

3.9	Confirmação de espécies de anofelinos através da análise de sequências da região <i>barcoding</i> do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI PCR).....	52
3.9.1	Extração de DNA mitocondrial - Técnica Chelex 100	52
3.9.2	Amplificação por PCR convencional para o gene COI e purificação por PEG.....	53
3.9.3	Sequenciamento e purificação por Sephadex.	54
3.9.4	Análise das sequências no BLAST e confirmação molecular.	55
3.10	Avaliação da infecção dos anofelinos pelo plasmódio.....	56
3.10.1	Acondicionamento dos anofelinos no campo	56
3.10.2	Extração de DNA genômico.	56
3.10.3	PET-PCR para avaliação da infectividade dos anofelinos.....	57
3.10.4	Nested-PCR para confirmação da infectividade.	59
3.11	Coleta de larvas de anofelinos em criadouros naturais.	60
3.11.1	Localizando criadouros até 1km de distancia das malocas Yanomami.....	60
3.11.2	Área Efetiva de Criação - AEC e os seus diferentes subtipos.....	61
3.12	Análises estatísticas	67
4.	RESULTADOS	69
4.1	Distribuição das espécies de anofelinos adultos nos Polos Base Toototobi, Parafuri e Marari.....	69
4.2	Confirmação molecular das espécies de anofelinos por COI <i>barcode</i>	73
4.3	Sazonalidade das espécies de anofelinos adultos mais abundantes nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.....	74
4.4	Distribuição das espécies de anofelinos por ambiente de captura nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.....	76
4.5	Distribuição das espécies mais abundantes por horários de hematofagia nas capturas de 12h.	81
4.6	Taxa de Picada Homem/Noite no peridomicílio em Toototobi e Parafuri.	84
4.7	Avaliação da paridade das fêmeas adultas.	86
4.8	Infectividade para plasmódios - Resultados de PET-PCR + Nested PCR.....	87
4.9	Nova proposta de classificação de criadouros de anofelinos Amazônicos.....	90
4.10	Tipos de criadouros de anofelinos encontrados em Toototobi, Parafuri e Marari.	95

4.11	Características dos rios em Toototobi, Parafuri e Marari.....	98
4.12	Área Efetiva de Criação (AEC) por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi e Parafuri.	99
4.13	Localização dos criadouros nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.	100
4.14	Capturas de larvas de anofelinos por criadouro em Toototobi, Parafuri e Marari.	105
4.15	Distribuição das larvas das espécies de anofelino por tipo de criadouro em Toototobi e Parafuri.	108
4.16	Focos de Refúgio Estival.	109
4.17	Fatores ambientais determinantes da distribuição das principais espécies de anofelinos.	111
4.18	Lagos Associados aos Rios (LAR). Pulsos de Inundação e associação de anofelinos com macrófitas submersas.	115
4.19	Dados de pluviosidade e sazonalidade das Áreas Efetivas de Criação dos criadouros.....	119
4.20	Dados de sazonalidade das larvas e adultos em Toototobi e Parafuri. ...	124
4.21	Dinâmica sazonal das espécies mais abundantes nas comunidades de Parafuri e Toototobi	127
4.22	Dados de mobilidade dos Yanomami: Toototobi, Parafuri e Marari.....	133
4.23	Dados de malária no Polo Base de Marari.	134
5.	DISCUSSÃO	138
6.	CONCLUSÕES	175
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
	ANEXO	200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição mundial da malária.....	2
Figura 2. Mapa da distribuição da malária na região das Américas	7
Figura 3. Mapa amostrando os países livres de malária (verde), os que estão em fases de eliminação da doença em nível nacional ou sub-regional (azul) e os países (vermelho) que estão na fase de controle.....	12
Figura 4. Localização das reservas indígenas no Brasil.....	16
Figura 5. Dados de malária no DSEI-Y por espécie plasmodial, período 2005 - 2014.	21
Figura 6. Mapa representando os principais rios da bacia Amazônica.....	23
Figura 7. Mapa de distribuição das principais espécies de anofelinos transmissores da malária na região das Américas.....	27
Figura 8. Localização das três áreas de estudo.....	38
Figura 9. Mapas das três áreas de estudo.....	41
Figura 10. Exemplos dos tipos de <i>shabono</i> construídos nas três áreas de estudo.....	43
Figura 11. Quantificação da Área Efetiva de Criação.....	63
Figura 12. Representação esquemática dos segmentos lineares e curvados de um lago <i>oxbow</i> utilizados para o cálculo do perímetro total de Área Efetiva de Criação.....	64
Figura 13. Dinâmica sazonal das espécies mais abundantes de anofelinos adultos em Toototobi.....	75
Figura 14. Dinâmica sazonal das espécies de anofelinos adultos mais abundantes em Parafuri.	76
Figura 15. Frequência de <i>An. darlingi</i> nas comunidades do Polo Base Parafuri (Komomassipe e Warareu) e Marari (Taibrapa, Gasolina e Alapusi), por horário de captura (12 horas).....	82
Figura 16. Frequência de <i>An. oswaldoi</i> s.l. nas comunidades do Polo Base Toototobi (Mahaxipoha e Raxasi, Apiahik e Koioipi) e Parafuri (Warareu, Xaruna e Makabey), por horário de captura (12 horas).	83
Figura 17. Frequência de <i>An. intermedius</i> e <i>An. nuneztovari</i> s.l. Nas comunidades de Apiahik (Toototobi) e Taibrapa 2 (Marari) respectivamente, por horário de captura (12 horas).....	84

Figura 18. Classificação dos diferentes criadouros propostos e a sua associação com os pulsos de inundação dos rios de baixa ordem na área Yanomami do Brasil.	90
Figura 19. Imagens LANDSAT (projeto PRODES 2011) mostrando a localização da comunidade de Makabey (A) e Xaruna (B) ao longo do rio Parima, na área de Parafuri.	92
Figura 20. Criadouros naturais de anofelinos nas áreas estudadas.....	95
Figura 21. Total da AEC por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi e Parafuri.....	100
Figura 22. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) do Polo Base de Toototobi.	101
Figura 23. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) no Polo Base Parafuri.....	102
Figura 24. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) no Polo Base Marari.....	103
Figura 25. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (marcadores azuis) mapeados próximos a comunidade Taibrapa 2 (marcador vermelho) no Polo Base Marari.....	103
Figura 26. Exemplos de microhabitats encontrados no canal dos rios de baixa ordem ou nos córregos (SFS) no Polo Base do Marari..	105
Figura 27. Focos de Refúgio Estival (FRE) nas áreas estudadas durante as estações de estiagem.....	110
Figura 28. Exemplos de subtipos de AEC onde foram coletadas larvas em abundância no interior de LAR.	116
Figura 29. As três fases principais da OX em relação aos pulsos de inundação - Pl.....	118
Figura 30. Pluviosidade (mm) em Toototobi e Parafuri, outubro 2012 - julho 2015..	120
Figura 31. Dados mensais de pluviosidade e dinâmica da Área Efetiva de Criação (AEC), por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi.....	122
Figura 32. Dados mensais de pluviosidade e dinâmica da Área Efetiva de Criação (AEC), por tipo de criadouro nas comunidades de Parafuri.	123

Figura 33. Associação da Área Efetiva de Criação e o número de larvas e adultos por mês de coleta (janeiro de 2013 a julho de 2014) em Toototobi e Parafuri.....	125
Figura 34. Dinâmica sazonal do total de formas adultas coletadas das espécies de anofelinos mais abundantes do Toototobi, setembro 2012 a julho 2014... 126	126
Figura 35. Dinâmica sazonal do total de formas adultas coletadas das espécies de anofelinos mais abundantes do Parafuri, setembro 2012 a julho 2014. 126	126
Figura 36. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para <i>An. darlingi</i> , Komomassipe - Parafuri.....	128
Figura 37. Relação da Área Efetiva de Criação por tipo de criadouro e abundância de formas adultas e larvas de <i>An. darlingi</i> no Komomassipe - Parafuri.....	128
Figura 38. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para <i>An. oswaldoi s.l.</i> , Koiopi - Toototobi.	130
Figura 39. Relação da Área Efetiva de Criação e abundância de adultos e larvas de <i>An. oswaldoi s.l.</i> no Koiopi - Toototobi.	130
Figura 40. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para <i>An. mattogrossensis</i> , Apiahik - Toototobi.....	132
Figura 41. Relação da Área Efetiva de Criação e abundância de adultos e larvas de <i>An. mattogrossensis</i> no Apiahik - Toototobi.....	132
Figura 42. Relação da Área Efetiva de Criação e abundancia de formas adultas e larvas de <i>An. oswaldoi s.l.</i> no Apiahik - Toototobi	133
Figura 43. Número de casos de malária diagnosticados por mês entre janeiro de 2013 e maio de 2015 nas comunidades de Ahima, Castanha e Taibrapa e número de <i>An. darlingi</i> adultos coletas entre março de 2013 e março 2015..	136
Figura 44. Número de casos de malária diagnosticados por mês entre janeiro de 2013 e maio de 2015 nas comunidades de Gasolina e Alapusi e número de <i>An. darlingi</i> adultos coletas entre março de 2013 e março 2015.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distâncias, modos de deslocamento e tempos das aldeias incluídas no estudo em relação a sede do respectivo Polo Base.....	40
Tabela 2. Distribuição anual dos casos de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> por comunidade baseado no Índice Parasitário Anual (IPA).	45
Tabela 3. Distribuição dos casos de malária por sexo e faixa etária ajustados por cada 1.000 habitantes nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari..	47
Tabela 4. Número absoluto e frequência das espécies de <i>Anopheles</i> adultos nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari.....	69
Tabela 5. Número absoluto e frequência das espécies de <i>Anopheles</i> adultos coletados nas comunidades de Toototobi no período de setembro 2012 a julho de 2014.	71
Tabela 6. Número absoluto e frequência das espécies de <i>Anopheles</i> adultos coletados nas comunidades de Parafuri, no período de setembro 2012 a julho de 2014.	72
Tabela 7. Número total e frequência das espécies de <i>Anopheles</i> adultos coletados nas comunidades de Marari no período de março de 2013 a março de 2015.	73
Tabela 8. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio, nas comunidades de Toototobi.	77
Tabela 9. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio, nas comunidades de Parafuri.....	79
Tabela 10. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Marari.	79
Tabela 11. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Toototobi.	80
Tabela 12. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Parafuri.....	81

Tabela 13. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Marari.....	81
Tabela 14. Taxa de Picada Homem/Noite - TPHN, calculada a partir das capturas de 12 horas, no ambiente peridomiciliar no Toototobi e Parafuri, de setembro de 2012 a julho de 2014.	85
Tabela 15. Taxa de Picada Homem/noite - TPHN, calculada a partir das capturas de 12 horas, no ambiente peridomiciliar e extradomiciliar no Polo Base Marari, no período de março 2013 a março de 2015.	86
Tabela 16. Número absoluto de fêmeas paridas e nulíparas de <i>An. darlingi</i> em Parafuri e <i>An. oswaldoi s.l.</i> em Toototobi e Parafuri, setembro 2012 a julho 2014.....	87
Tabela 17. Espécies de anofelinos positivos por comunidade do Polo Base Marari. Taxa de Infectividade (%) e Taxa de Inoculação Entomológica anual.	89
Tabela 18. Número e percentual dos tipos de criadouros encontrados em Toototobi, Parafuri e Marari.....	97
Tabela 19. Principais características ambientais dos criadouros nas áreas de estudo associados aos rios de baixa ordem.....	98
Tabela 20. Características dos rios das comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.	99
Tabela 21. Número total de larvas por espécie nas comunidades de Toototobi no período de setembro 2012 a julho 2014.....	107
Tabela 22. Número total de larvas por espécie nas comunidades de Parafuri no período de setembro 2012 a julho 2014.....	107
Tabela 23. Número e porcentagem das espécies das larvas de anofelinos por tipo de criadouro em Toototobi.....	108
Tabela 24. Número e porcentagem das espécies de larvas de anofelinos por tipo de criadouro em Parafuri.	109
Tabela 25. <i>Generalized Estimating Equation</i> (GEE) análises para fatores associados às densidades de larvas de anofelinos de <i>An. darlingi</i> , <i>An. oswaldoi s.l.</i> e <i>An. triannulatus s.l.</i>	113
Tabela 26. <i>Generalized Estimating Equation</i> (GEE) análises para fatores associados às densidades de anofelinos de <i>An. mattogrossensis</i> , <i>An. costalike</i> e <i>An. intermedius/guarao-like</i>	114

Tabela 27. Fases em que foram encontradas as principais LAR por comunidade no Marari, a relação com os PI documentados e as capturas de adultos e larvas de <i>An. darlingi</i>	119
Tabela 28. Avaliação de parâmetros de receptividade e vulnerabilidade à malária das 13 comunidades estudadas, Toototobi, Parafuri e Marari.....	137

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AEC	Área Efetiva de Criação.
pAEC	Área Efetiva de Criação em perímetro sombreado
psAEC	Área Efetiva de Criação em perímetro parcialmente ou bem exposto ao sol.
eAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação emergente
aAEC	Área Efetiva de Criação em algas filamentosas verdes
dAEC	Área Efetiva de Criação em detritos flutuantes sombreados
dsAEC	Área Efetiva de Criação em detritos flutuantes parcialmente ou bem exposto ao sol.
smAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação submersa <i>Mayaca sp.</i>
scAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação submersa <i>Cabomba sp.</i>
suAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação submersa <i>Utricularia sp.</i>
shAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação submersa <i>Hydrocaritacea sp.</i>
seAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação submersa <i>Eichornia sp.</i>
sfAEC	Área Efetiva de Criação em vegetação flutuante.
AHP	Atração Humana Protegida
ATTZ	Área de Transição Terrestre Aquática
DSEI-Y	Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami
FAAR	Área Inundada Associada aos Rios
FANAR	Área Inundada Não Associada aos Rios
FRE	Focos de Refúgio Estival
IPA	Índice Parasitário Anual
LAR	Lagos Associados aos Rios
MILD	Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração.
MSF	Igarapés ou <i>medium forest streams</i>
Nested-PCR	PCR aninhada
NOX	Lagos Não de Ferradura ou <i>non-oxbow lake</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
OX	Lagos de Ferradura ou <i>oxbow lake</i>
PET-PCR	Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Iniciadores - PCR
PI	Pulso de Inundação

PNCM	Plan Nacional de Controle de Malária
RP	Poças de chuva
RPM	Revoluções por minuto
SESAI	Secretaria Especial de Saúde Indígena.
SFS	Córregos ou <i>small forest streams</i>
SIASI	Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
TI	Taxa de Infecção
TIEA	Taxa de Inoculação Entomológica Anual
TPHN	Taxa de Picada Homem Noite
UdS	Unidade de Sanfona

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária: perspectiva global e tendências recentes.

Apesar dos grandes avanços em nível mundial para o controle da malária e uma diminuição significativa da morbimortalidade desta doença em muitas regiões endêmicas no mundo, a malária continua sendo a infecção parasitária mais importante que acomete o homem [1].

Os dados mais recentes sobre a distribuição da malária no mundo são de 2013 e indicam que a transmissão desta doença ainda ocorre em 97 países, distribuídos em seis regiões estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [2]. Globalmente, são estimados que 3,2 bilhões de pessoas moram em áreas de risco de contrair malária e, dentre estas, 1,2 bilhões habitam áreas de alto risco. Em 2013, foram registrados aproximadamente 198 milhões de casos de malária no mundo e um número aproximado de 584.000 mortes. Estes dados são alarmantes e inaceitáveis, visto que a malária é uma doença que tem tratamento. O maior número de casos e de mortes se concentra, até a presente data, na região da África Subsaariana, onde estima-se que ocorreram 90% das mortes em 2013, principalmente em crianças menores de cinco anos (grupo etário responsável por 78% das mortes por malária no mundo).

No passado, as taxas de morbidade e mortalidade associadas à malária eram mais elevadas, tendo uma grande abrangência e distribuição no mundo. Em 1945 a transmissão deste agravo ocorria em todos os continentes, atingindo países de latitudes muito díspares, desde as regiões mais setentrionais, como o Canadá ou Finlândia, até o Chile e Austrália no sul do planeta [3]. Desde então, os esforços mundiais para controlar e eliminar a malária têm tido um enorme progresso e a doença vem sendo eliminada de muitos países de uma forma gradual, especialmente nos países situados nas latitudes mais ao norte [4]. Inclusive nas áreas consideradas mais problemáticas (principalmente na África subsaariana), houve significativas melhoras desde o ano 2000 [5].

Entre os anos de 2000 e 2013, foram registradas quedas significativas em alguns indicadores de malária. Por exemplo, a taxa de mortalidade por malária foi reduzida globalmente em 47% e 54% nos países da África [2]. A

Figura 1 mostra a distribuição da malária e o Índice Parasitário Anual (IPA) estimado em 2013 no mundo.

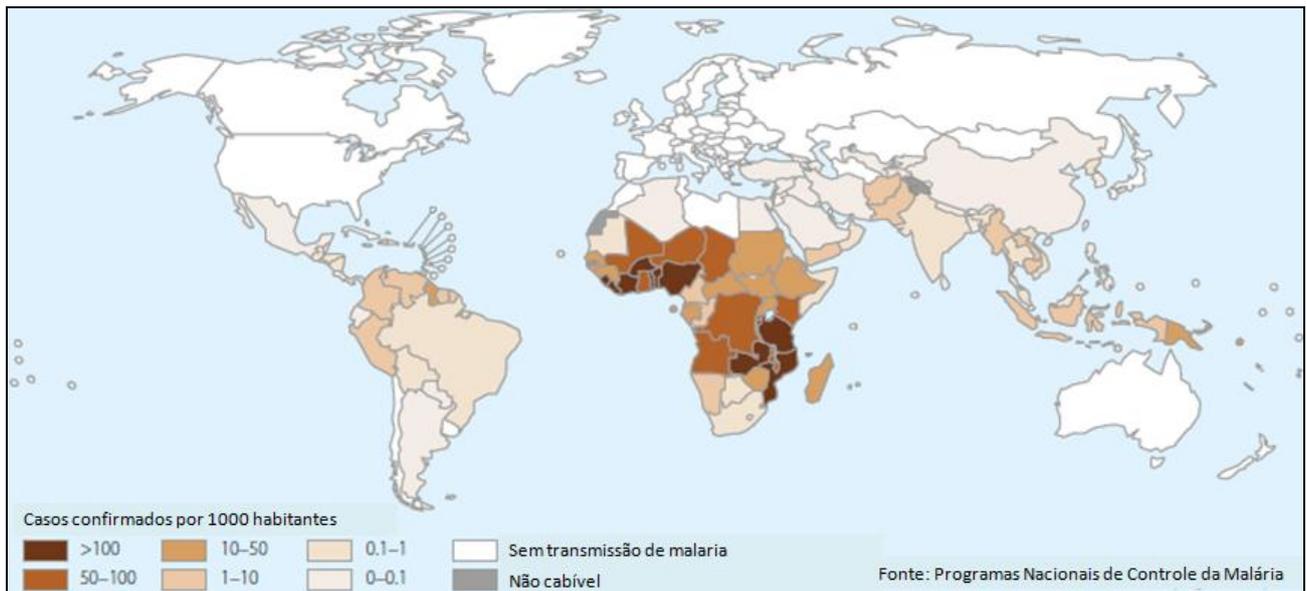


Figura 1. Mapa da distribuição mundial da malária, considerando todas as espécies plasmodiais e baseado no IPA, 2013. Extraída e adaptada de [2].

Os agentes causais da malária são protozoários do gênero *Plasmodium*, que é transmitido às pessoas pela picada infectante dos mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Existem cinco espécies de plasmódios que infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. O *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies mais prevalentes, sendo o *P. falciparum* responsável pela maior parte das mortes e o mais prevalente na África subsaariana. O *P. vivax* tem maior distribuição geográfica e predominância sobre o *P. falciparum* em muitas regiões endêmicas no mundo, inclusive no Brasil [6]. As outras espécies, têm prevalências muito mais reduzidas, como o *P. malariae*, *P. ovale* e, mais recentemente, o *P. knowlesi*, que era considerada uma espécie de *Plasmodium* restritamente simiana encontrada em regiões de floresta do continente asiático [1].

O ciclo biológico dos parasitos da malária é muito complexo e o que ocorre em algumas fases do ciclo ainda não está bem estabelecido. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* faz o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado e ingere as formas sexuadas do parasita (gametócitos) que circulam no sangue. A fêmea do anofelino depende do repasto sanguíneo para a maturação dos ovos [7]. Dentro do anofelino, as primeiras etapas do ciclo vão ocorrer rapidamente. As formas sexuadas vão se fusionando e evoluem, gerando um

ocineto que, posteriormente, vai se aderir na parede do intestino médio do anofelino através de ligações específicas, traspassando esta parede e formando o oocisto. Cada oocisto pode gerar um grande número de esporozoítos (estima-se que cada oocisto de *P. vivax* e *P. falciparum* poderia gerar em média 3.688 e 3.385 esporozoítos imaturos, respectivamente). Os esporozoítos vão migrar pela cavidade torácica do mosquito e, parte deles, vai se estabelecer no interior das glândulas salivares [8]. Nesta fase, quando a fêmea realiza um novo repasto sanguíneo, inocula esporozoítos presentes em sua saliva na pele do hospedeiro vertebrado. A maioria dos esporozoítos permanece na derme e alguns migram até os capilares sanguíneos onde atingem a circulação para chegarem ao fígado e outros podem migrar para vasos linfáticos, chegando aos linfonodos drenantes [9, 10]. Os esporozoítos que chegam ao fígado se aderem ao endotélio dos sinusóides hepáticos e iniciam o *gliding*, processo de movimentação no qual o parasita desliza até atravessar a barreira sinusal, provavelmente via células de Kupffer. Os parasitas passam a migrar através de vários hepatócitos antes de se desenvolverem em um hepatócito específico, onde será formado um vacúolo parasitóforo [11-14]. Protegidos no vacúolo parasitóforo, os esporozoítos iniciam um processo de maturação e de divisão celular denominado esquizogonia extraeritrocítica, uma reprodução assexuada, onde se formam esquizontes hepáticos repletos de merozoítos. Durante esta etapa do ciclo, a infecção é assintomática. Quando a infecção se dá por *P. vivax* ou *P. ovale*, há a formação de formas denominadas hipnozoítos, que vão permanecer latentes nos hepatócitos. Após a esquizogonia, os esquizontes maduros liberam os merozoítos teciduais através de brotamento de vesículas (merossomos) ou por ruptura do esquizonte no hepatócito [15], os quais serão liberados no sangue e invadiram as hemácias (ciclo eritrocítico). Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns se diferenciam dando origem às formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, os quais amadurecem sem sofrer divisão celular. Estas formas são incapazes de se fecundar no hospedeiro humano e ficarão circulando no sangue até o momento de serem ingeridas com as hemácias por fêmeas dos mosquitos durante o repasto sanguíneo [1].

O *P. vivax*, por apresentar hipnozoítos em estado de latência no fígado que podem gerar novos ciclos eritrocitários meses ou até mesmo anos após a

infecção inicial e por ter a capacidade de se desenvolver no anofelino em baixas temperaturas, é de mais difícil controle [2].

Na África subsaariana, a alta frequência do fenótipo nulo de Duffy na população confere resistência à malária vivax, um fator muito importante que limitou a expansão desta espécie nesta área geográfica [2]. Dessa forma, os indivíduos que não apresentam o antígeno Duffy em seus eritrócitos são altamente resistentes à infecção pelo *P. vivax* [16]. Entretanto, evidências recentes mostraram que alguns indivíduos Duffy negativos do Quênia e do Brasil podem se infectar com este parasito [17-19].

Tradicionalmente a malária grave está associada quase exclusivamente ao *P. falciparum*, apesar de existirem relatos, cada vez mais frequentes, de infecções graves pelo *P. vivax*. Em um estudo na Papua Nova Guiné, foi confirmado que 21% dos casos de malária grave estavam associados a monoinfecções por *P. vivax*. Este fenômeno também tem sido observado no Brasil [6, 20]. Entretanto, atualmente, tem-se discutido muito sobre a presença de outras patologias como bacteremia, desnutrição e a presença de coinfeções, no diagnóstico da malária grave pelo *P. vivax*.

Se não tratadas corretamente, as infecções crônicas pelos plasmódios podem persistir por meses ou anos nos humanos, dependendo da espécie plasmodial e da imunidade. Esses indivíduos se tornam fontes importantes de infecção para as espécies de anofelinos competentes [1]. Por exemplo, o *P. malariae* tem uma característica diferenciada em relação às outras espécies de plasmódios devido a sua capacidade de permanecer por décadas no hospedeiro humano como fonte de infecção. Além disso, os níveis de parasitemia detectados nas infecções pelo *P. malariae*, normalmente são mais baixos do que nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. De fato, o *P. malariae* produz menos merozoítos por hemácia infectada e apresenta um ciclo de desenvolvimento mais longo (72 horas) do que os *P. vivax* e *P. falciparum* [21]. No entanto, embora o *P. malariae* tenha sido considerado a espécie de plasmódio mais benigna, nos portadores crônicos de longa duração, pode ocasionalmente, causar complicações graves e até letais [22]. A distribuição de *P. malariae* no mundo se sobrepõe a do *P. falciparum*. Já o *P. ovale* é restrito a regiões de climas tropicais do Velho Mundo e é mais prevalente na África tropical, podendo ocorrer em outros lugares dos trópicos, como nas Filipinas e na Papua Nova Guiné [21].

As infecções por *P. knowlesi* são mais virulentas que por outras espécies e o seu potencial de causar malária grave é três vezes maior do que o *P. falciparum*. Muitos países do sudeste asiático têm registrado a ocorrência desta espécie, desde a Indonésia até as ilhas de Andaman e Nicobar, na Índia. O *P. knowlesi* é o maior responsável pelos casos de malária clínica na Malásia, especialmente em populações que vivem em áreas de floresta, como as populações indígenas [23]. As infecções por esta espécie podem ser potencialmente letais se não forem tratadas a tempo. Embora a transmissão do *P. knowlesi* tenha uma natureza zoonótica, visto que macacos silvestres são seus principais reservatórios, acredita-se que esta espécie de plasmódio também seja transmitida de humano para humano pelos anofelinos dos complexos *Leucosphyrus* e *Dirus*, decorrentes de mudanças ambientais nas áreas endêmicas [24]. Durante muito tempo, o *P. knowlesi* foi confundido com *P. malariae*, *P. falciparum* e até com *P. vivax* no diagnóstico parasitológico. Foram as técnicas de diagnóstico molecular que auxiliaram a detectar e determinar a prevalência desta espécie na Ásia [23].

As apresentações das formas clínicas da malária são muito variáveis, e dependem dos níveis de transmissão, idade das pessoas e fatores intrínsecos do hospedeiro (como fatores genéticos e associados à resposta imune) e do parasita. Em regiões consideradas de alta transmissão, a alta morbimortalidade da doença ocorre nas faixas etárias mais jovens e, nos adultos, a maior parte das infecções são assintomáticas [6, 25].

Vários indicadores são utilizados para avaliar os níveis de transmissão da malária nas populações afetadas. Alguns destes índices estão mais voltados para o vetor, como a determinação da taxa de inoculação entomológica (TIE). Esta taxa é um dos principais parâmetros utilizados para medir a intensidade de transmissão da malária em uma determinada área e corresponde ao número de picadas infectantes que uma pessoa recebe por unidade de tempo [26]. Este dado é importante na avaliação dos programas de controle e vigilância da malária. Dois parâmetros básicos precisam ser mensurados para a sua determinação: a Taxa de Picada por Homem por cada Noite (TPHN) e a prevalência da infecção nos anofelinos capturados. A obtenção destes dados requer a coleta de anofelinos durante o repasto sanguíneo em humanos, uma tarefa que não é fácil e que não é mais permitida no Brasil, e a detecção de esporozoítos no anofelino através da dissecação e

exame microscópico da glândula salivar ou por testes imunoenzimáticos e moleculares [27, 28].

Entre os parâmetros que estimam a ocorrência de malária no hospedeiro humano, o mais utilizado em áreas endêmicas, inclusive no Brasil, é o Índice Parasitário Anual (IPA), definido pelo número de casos/1.000 habitantes/ano. Nas áreas endêmicas da Amazônia Legal, o risco de contrair malária em valores de IPA pode variar de: baixo (0,1 a 9,9), médio (10 a 49,9) ou alto (maior ou igual a 50) [29].

Uma das grandes dificuldades na compreensão e controle da transmissão da malária é sua enorme heterogeneidade, tanto em nível de macro quanto em microescalas. Esta variabilidade nos níveis de transmissão é devido a uma interação muito complexa que inclui diferentes fatores ecológicos e ambientais, necessários para a manutenção dos ciclos locais de transmissão. Dentre estes fatores, os que têm maior peso na intensidade de transmissão da malária são os entomológicos, como a densidade, longevidade, hábitos alimentares e a competência vetorial dos anofelinos locais [1]. Existem aproximadamente 450 espécies de anofelinos no mundo, mas somente umas 30 espécies, são consideradas vetores importantes de malária [2]. Mesmo dentre estas, existem graus variados de competência e capacidade vetorial. No continente Africano, nas áreas de maior endemicidade para a malária, os vetores pertencentes ao complexo *An. gambiae* (como o *An. arabiensis* e, principalmente, *An. gambiae* s.s) se destacam por serem altamente longevos, adaptarem-se com facilidade as alterações do meio ambiente e por serem altamente antropofílicos. Estes fatores consagraram estas duas espécies como os vetores mais eficientes do mundo e os principais responsáveis (junto com *An. funestus* s.l.) pela transmissão da malária e, conseqüentemente, pelas mortes por *P. falciparum* na África subsaariana [30].

A transmissão da malária na África subsaariana e em algumas localidades da Oceania é muito intensa, onde a taxa de inoculação entomológica pode ser tão alta quanto 1.000 picadas infectantes por pessoa por ano. Ou seja, sem se considerarem os fatores associados à sazonalidade da doença, uma pessoa pode receber em média três picadas infectantes por dia [1]. Por outro lado, na maior parte da Ásia e nas Américas Central e do Sul, a transmissão da malária é principalmente sazonal e de baixa intensidade,

onde um indivíduo geralmente pode receber uma ou poucas picadas infectantes/ano.

Nas Américas, existem regiões com vetores específicos locais que têm a capacidade de manter a transmissão da malária, como o *An. pseudopunctipennis* e *An. albimanus*, em regiões da Mesoamérica, e *An. aquasalis*, em regiões costeiras do oceano Atlântico da América do Sul. Em contraste, o *An. darlingi* tem papel importante na transmissão da malária em vastas áreas nas Américas e a sua presença está associada às altas taxas de transmissão em muitas áreas, sendo considerado o vetor mais eficiente nesta região pela maioria dos entomologistas [31].

1.2 As Américas e o Brasil - um mapa complexo da transmissão da malária.

Dados de 2013 apontam que 120 milhões de pessoas de 21 países das Américas moram em áreas consideradas de risco para a transmissão da malária. A malária por *P. vivax* é predominante e corresponde a 70% do total de casos das Américas. Entretanto, no Suriname e na Guiana, a malária por *P. falciparum* representa mais de 50% dos casos, e chegando a quase 100% no Haiti e na República Dominicana. A Figura 2 mostra a distribuição da malária nas Américas tendo o IPA como indicador.

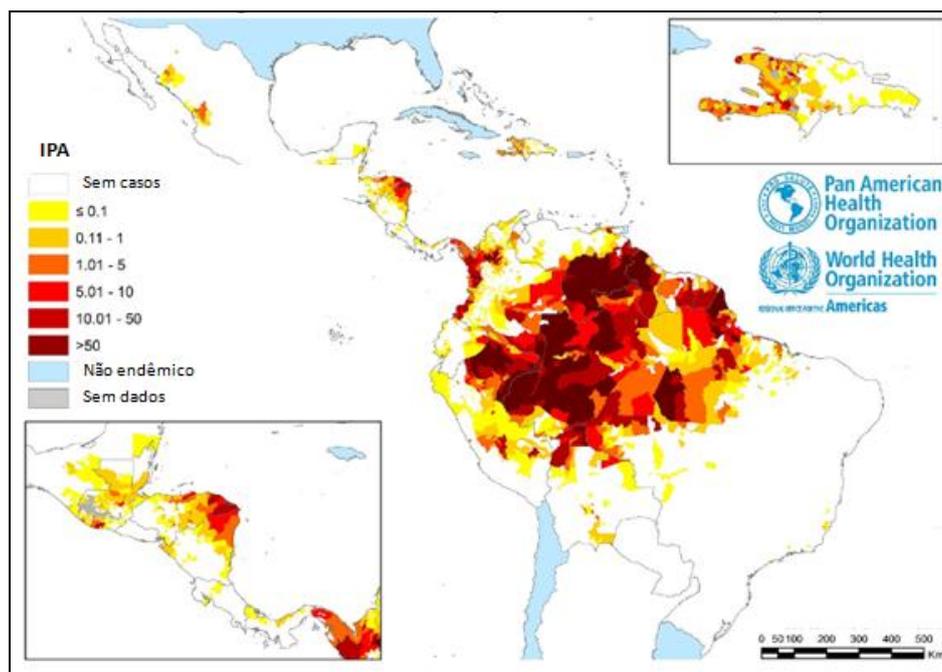


Figura 2. Mapa da distribuição da malária na região das Américas, baseada no IPA (número de casos/1.000 habitantes/ano). Extraída e adaptada de [2].

Dentre os países endêmicos, só três foram responsáveis pela maioria dos casos registrados em 2013. O Brasil é um deles, sendo responsável por 42% dos casos, seguido da Venezuela e Colômbia, com 18% e 12%, respectivamente. A maioria dos países reportou uma diminuição dos casos diagnosticados, e somente a Venezuela e a Guiana, registraram um incremento de casos no período de 2000 a 2013 [2].

A história da malária do Brasil tem tido importantes mudanças ao longo dos anos. O primeiro relato que se tem notícia data de 1587 e menciona a ocorrência de febre quartã e terçã entre as tribos indígenas Tupinambá. Porém, no fim do século XIX, a grande migração de nordestinos para a Amazônia, fugindo da terrível seca em suas terras e atraídos pela extração do látex, teve como consequência a primeira grande epidemia amazônica de malária, acarretando muitas mortes. Esse agravo também atingia grande área fora da região Amazônica, como nos estados ao noroeste do país e a “Baixada Fluminense”, no Rio de Janeiro, principalmente pela recente libertação dos escravos e o abandono dos canais de irrigação das plantações, o que aumentou a oferta de criadouros para os anofelinos vetores [32, 33].

No final do século XIX, a malária se encontrava disseminada em todo o território nacional, principalmente nas áreas costeiras, onde estavam os principais núcleos urbanos. A segunda epidemia aconteceu na construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré que ligaria Santo Antonio (hoje parte de Porto Velho) a Guajará-Mirim no rio Mamoré. Milhares de trabalhadores morreram de malária durante a construção da estrada de ferro que por este motivo ficou conhecida como a “ferrovia do diabo”. Outra epidemia importante foi causada pela invasão do *Anopheles gambiae* no Rio Grande do Norte e Ceará, no início do século XX. A ação vigorosa dos serviços de saúde do estado brasileiro eliminou essa espécie invasora e controlaram a malária em Natal e em outras cidades nordestinas, nos anos 1940 [34-36].

No Brasil, a campanha contra a malária atingiu o objetivo de controlar a doença, mas não de erradicá-la. Na década 70, a malária foi eliminada da maioria das cidades brasileiras e os números de casos se restringiram aos da região Amazônica. Entretanto, o programa de colonização da Amazônia criado pelo governo nesta mesma década, novamente gerou migração desordenada de pessoas de vários estados brasileiros, principalmente do sul e nordeste,

para Amazônia e, conseqüentemente, resultando em aumento absurdo do números de casos nesta região [33, 34].

Já em anos mais recentes, especificamente entre os anos de 2000 a 2011, o Brasil registrou uma redução de 56% na incidência de malária. Mesmo assim, a malária continua sendo um problema importante de saúde pública no país [37]. Os casos de malária no Brasil são quase que exclusivamente provenientes da região Amazônica (99,8%) [6]. Entre os anos de 2001 a 2013, uma média de 392.600 casos de malária foram registrados por ano no país. No entanto, neste período, houve flutuações importantes no número de casos, com um pico de 607.782 casos no ano de 2005, considerado nível de transmissão muito elevado para o Brasil, próximo do recorde histórico de casos registrados em 1999 (637.470 casos) [29].

No ano de 2011, os seis estados que registraram o maior número de casos foram Pará (114.752 casos) seguido pelos estados do Amazonas (59.431), Rondônia (30.412), Acre (22.586), Amapá (18.978) e Roraima (14.006) [29]. Embora esteja concentrada nestes estados, a malária não está distribuída de maneira homogênea dentro de cada um deles. Por exemplo, dos 808 municípios amazônicos, 80,4% dos casos de malária estão concentrados em 37 municípios e, entre estes municípios, cinco são responsáveis por 30,4% dos casos. Os assentamentos agrícolas, os garimpos, as áreas indígenas e áreas rurais e as de ocupação desordenada das periferias das cidades são aquelas onde há maior incidência e mais difícil controle [38]. Outro fator que foi identificado como muito importante no aumento de casos de malária na região Amazônica, foi a proliferação descontrolada de atividades de piscicultura em áreas urbanas e periurbanas, onde parte dos tanques artificiais construídos nas proximidades das habitações transformaram-se em excelentes criadouros de anofelinos, aumentando a incidência da malária e mudando os padrões sazonais nessas localidades [29].

Embora tenha ocorrido uma queda do número de casos de malária ao longo dos últimos anos no Brasil, focos de transmissão importantes, especialmente de *P. vivax* persistem. No ano de 2013, as infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* foram responsáveis por aproximadamente 82% e 16,5% dos casos de malária, respectivamente [38]. A predominância de *P. vivax* nem sempre ocorreu de forma homogênea e uniforme no território amazônico e parece estar associada à implementação do diagnóstico precoce e tratamento

do *P. falciparum* com derivados de artemisinina pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). De fato, o tratamento precoce, antes que os gametócitos de *P. falciparum* apareçam na circulação, depois de oito a 10 dias após o início do ciclo eritrocítico, teve um grande impacto na transmissão desse parasito. Já o tratamento precoce contra o *P. vivax* não teve muito impacto. Além dos gametócitos circularem no sangue logo após três dias do início do ciclo eritrocítico, a formação de hipnozoítos nesta espécie dificulta o seu controle [6].

O *P. malariae* que embora seja pouco prevalente no Brasil segundo dados oficiais, pode estar sendo subnotificado devido às baixas parasitemias, que dificultam a identificação desta espécie na gota espessa, as infecções concomitantemente com outros plasmódios e pela semelhança com *P. vivax* na microscopia. Até a presente data não foram detectados casos autóctones por *P. ovale* e *P. knowlesi* no Brasil [6].

No período de 2007 a 2013, só foram registrados 932 casos de malária fora da região Amazônica. Existe também transmissão autóctone em alguns focos delimitados da Mata Atlântica onde a transmissão da malária é veiculada principalmente pelo *An. (Kerteszia) cruzii* [39]. Esta malária tem sido chamada de malária de bromélias, já que os principais vetores incriminados na transmissão local têm estas plantas como criadouros preferenciais. O paradigma da malária de bromélias tem postulado tradicionalmente que somente as espécies de *P. vivax* e *P. malariae* ocorriam de forma significativa neste bioma [38]. Entretanto, a maioria dos casos estão associados a pessoas que moram ou estiveram em áreas de floresta de mata Atlântica. Além disso, a existência de variantes de *P. vivax* e de malária simiana (*P. brasilianum*) indicam que algumas espécies de macacos do Novo Mundo presentes na mata Atlântica podem atuar como reservatórios naturais, sugerindo que uma parte do ciclo da malária extra-amazônica seja de caráter zoonótico [6].

No entanto, o paradigma da malária extra-amazônica no Brasil parece estar longe de ser esclarecido, já que investigações recentes têm mostrado um cenário mais complexo da epidemiologia da malária nesta região. Recentemente foi relatada a detecção de *P. falciparum* em 5,14% de amostras de doadores de sangue no estado de São Paulo [40] e em 4,4% dos anofelinos, principalmente *An. (Kerteszia) cruzii*, coletados em uma região da Mata Atlântica [41].

1.3 Atuais estratégias de controle da malária - a situação na Amazônia brasileira.

A malária afeta principalmente países de baixa ou média renda nos trópicos, onde as populações mais afetadas normalmente são as mais pobres e marginalizadas, sem acesso fácil aos serviços de diagnóstico e tratamento. São áreas que normalmente apresentam problemas no momento de se implementarem as medidas de prevenção e controle adequadas. Em outubro de 2007, houve uma chamada por projetos em nível global por parte da Fundação Bill e Melinda Gates para reorientar os esforços do controle da malária, visando-se a eliminação e erradicação desta doença. Foi considerado um objetivo muito ambicioso. Mas a atual queda da incidência da malária no mundo e as ferramentas disponíveis no combate à doença foram consideradas factíveis pela maioria dos malariologistas. Segundo estimativas dos especialistas do grupo de eliminação da malária, estima-se que a erradicação poderia ser alcançada entre os anos de 2050 e 2060 [3]. Portanto, dois termos banidos da malariologia voltam a ser utilizados nestes últimos anos: a eliminação e erradicação da malária.

Quando se fala de eliminação, faz-se referência à interrupção local da transmissão da malária em uma área geográfica restrita (país ou subregião), enquanto a erradicação faz referência a redução permanente a 0 casos de malária de forma global [3]. As estratégias voltadas para a eliminação têm como objetivo principal a interrupção da transmissão e a eliminação de parasitas nos portadores assintomáticos [42]. Devido à biologia do *P. vivax*, acredita-se que esta espécie seja mais difícil de ser eliminada em muitos países tropicais e subtropicais que o *P. falciparum*. Um país é certificado como livre de malária pela Organização Mundial de Saúde (OMS), quando prova que não teve casos autóctones no território durante os últimos três anos consecutivos [2]. No plano estratégico da OMS para os anos de 2016 a 2030, os objetivos a serem alcançados são: a redução de 40% na morbidade por malária para o ano 2020 e de pelo menos 90% até o ano 2030. Em 35 países, a eliminação foi incluída como objetivo a ser alcançado até 2030. Na Figura 3, estão representados os países onde a malária está em situação de controle, os que estão nas fases de eliminação da doença e os já livres de transmissão.

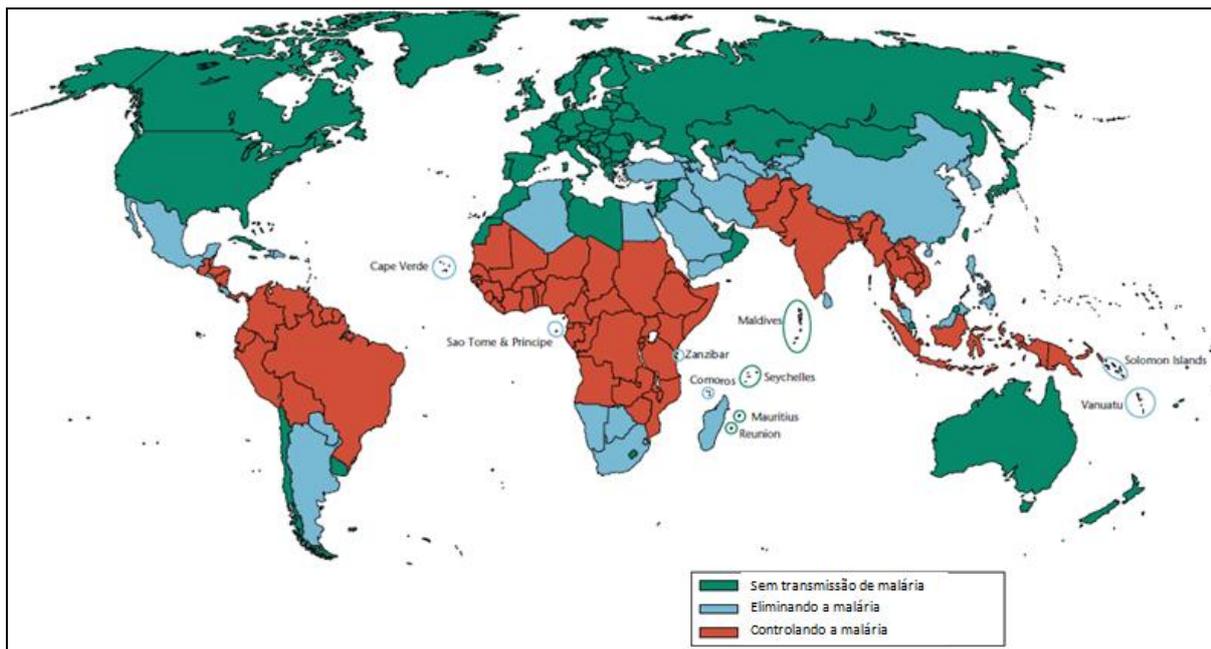


Figura 3. Mapa amostrando os países livres de malária (verde), os que estão em fases de eliminação da doença em nível nacional ou sub-regional (azul) e os países (vermelho) que estão na fase de controle, como é o caso do Brasil, dados de 2009. Extraída e adaptada de [3].

Nos últimos 150 anos, em várias regiões do mundo, a eliminação da malária vem sendo progressivamente bem sucedida. Os focos locais de alto risco da transmissão da doença, ou *hotspots*, são o resultado de uma complexa interação entre fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado, aos vetores e ao *Plasmodium*, dentro de um cenário ecológico propício. A identificação destas áreas de alto risco facilitará a distribuição dos recursos disponíveis para as ações de controle e eliminação [5].

A história do controle da malária no Brasil tem passado por diferentes etapas com diferentes estratégias que foram priorizadas pelos órgãos do governo. As primeiras medidas remontam ao século XIX. Contudo, foi em 1923 que o Departamento Nacional de Saúde Pública instituiu medidas profiláticas que investiam no diagnóstico parasitológico de indivíduos suspeitos, determinação do índice endêmico, medidas antilarvárias, telagem das casas, tratamento preventivo com quinino para os indivíduos sãos, tratamento dos doentes e inquérito epidemiológico. Nos anos 1930, quando o Nordeste foi invadido pelo *Anopheles gambiae*, esse mesmo departamento foi encarregado do controle e erradicação desse mosquito, criando, em 1939, o Serviço de Malária do Nordeste (SMN), que conseguiu erradicá-lo do país. O sucesso

dessa campanha inspirou a criação do Serviço Nacional de Malária (SNM), em 1941, quando a incidência de malária estava no auge em nosso país. Logo após, o recém criado Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERU) ficou encarregado da continuidade das campanhas de controle da malária e de outras endemias, como a febre amarela e a peste. A partir de 1958, um combate eficiente contra a malária conseguiu interromper sua transmissão nas regiões Sul e Sudeste, em todo o Nordeste e parte do Centro Oeste, através de ações desenvolvidas pela Campanha de Erradicação da Malária (CEM). Seu método de controle baseava-se principalmente no uso do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) para as ações de borrifação intradomiciliar, onde as características das habitações permitiam um bom desempenho do inseticida [34, 43, 44]. Na sequência, tivemos os seguintes programas de controle: Estratificação Epidemiológica (1980), Operação Impacto (1986) e o Projeto de Controle da Malária na Bacia Amazônica (1989).

A partir de 1992, seguindo normas da Conferência Ministerial, patrocinada pela OMS, em Amsterdã, a estratégia de erradicação foi substituída pelo Programa de Controle Integrado da Malária-PCIM (1992) e Plano de Intensificações de Controle da Malária nas áreas de Alto Risco da Amazônia Legal (1996) formulados para implementar diagnóstico precoce e tratamento imediato dos casos, ajustados às características particulares da transmissão existentes em cada localidade.

Em 2000, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal foi implementado tendo como meta a redução da incidência de malária em 50% até o final de 2001, em função do elevadíssimo número de casos. Em sequência, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Controle da Malária e essa iniciativa melhorou tanto a estrutura das unidades de saúde quanto o controle dos riscos de transmissão da doença na Região Amazônica. Em 2011, 56,4% dos casos de malária sintomática foram diagnosticados e tratados em até 48 horas após o início dos sintomas [29]. No aspecto do combate à fonte humana de infecção, as principais estratégias são a identificação de casos de pacientes que procuram espontaneamente os serviços de saúde para diagnóstico (busca passiva) e de casos detectados pela visita dos agentes a área geográfica onde ocorreram casos (Busca ativa) [29]. No entanto, em regiões de alta transmissão de malária, onde a população desenvolve um certo grau de imunidade contra a doença e os casos

assintomáticos são frequentes, como é o caso da área indígena Yanomami, o diagnóstico é feito periodicamente em toda a população, independente da presença de sintomas [25, 45, 46].

Algumas das intervenções de controle vetorial utilizadas atualmente no Brasil incluem o uso de Mosquiteiros Impregnados com Inseticida de Longa Duração (MILD) e a Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI) [47]. Ambas as intervenções afetam a longevidade e a capacidade vetorial dos anofelinos, o que influencia na transmissão da malária [37]. A BRI já vem sendo utilizada desde meados do século XX, e atualmente está recomendada para áreas endêmicas na Amazônia onde se tem constatado a atividade intradomiciliar dos vetores locais de malária. Esta intervenção é indicada no Brasil em áreas onde a BRI possa atingir a cobertura de 80% das casas e os ciclos de aplicação possam ser cumpridos com qualidade a cada três meses [47]. Atualmente o etofenprox é o piretróide utilizado nas ações de BRI, substituindo o uso anterior da alfacipermetrina. O uso dos MILD é também recomendado no Brasil em condições semelhantes à BRI, onde há constatação de transmissão intradomiciliar, seja por dados entomológicos, seja pela elevada proporção de casos de malária em menores de 10 anos. Finalmente, como método de controle de adultos, a termonebulização é recomendada somente em situações de emergência epidemiológica, já que é uma intervenção de eficácia muito limitada [47].

Portanto, o foco atual de muitos programas de controle de malária, incluindo o do Brasil, tem tido como pilares o uso de MILD, BRI e o diagnóstico rápido dos pacientes. No entanto, estas duas medidas de controle vetorial (MILD e BRI), só têm se mostrado eficazes contra mosquitos altamente endofágicos (ou seja que se alimentam principalmente dentro das moradias), mas muito menos eficazes contra as espécies que têm preferência por picar fora das moradias [48]. Esta última situação ocorre com a maioria dos principais vetores da malária do continente asiático e da América Latina, onde a transmissão extradomiciliar pode ter um papel muito importante [49, 50]. Por este motivo, abordagens que possam atuar contra a malária principalmente de caráter extradomiciliar, são cada vez mais importantes, pois para esse tipo de transmissão dispomos de poucas ferramentas eficientes.

Nesse sentido, outra estratégia é o controle de criadouros ou focos das formas imaturas. Utilizada há muitos anos atrás e pouco valorizada nas últimas

décadas, recentemente tem recobrado maior atenção [48, 51]. Esta é uma intervenção que, com alta cobertura, pode reduzir de forma significativa a densidade de formas adultas e portanto, o número de picadas infectantes que uma pessoa pode receber por ano. O controle de foco larvar é uma das ferramentas mais eficazes para combater anofelinos de caráter exofágico [52]. Atualmente, a OMS recomenda o uso de intervenções em criadouros (por manejo ambiental ou larvicidas) em situações onde os criadouros são poucos, claramente definidos e acessíveis [52]. Esta intervenção tem sido planejada como medida complementar de controle vetorial ao MILD e/ou BRI [48].

Um exemplo de campanha bem sucedida onde o controle larval teve papel importante no Brasil, foi a erradicação do *Anopheles gambiae*. A campanha contou com intervenções integradas, voltada tanto para a eliminação do inseto adulto quanto nos criadouros, através da utilização do larvicida Verde Paris e uma investida na procura e eliminação das formas imaturas, por uma equipe militarmente treinada [53].

1.4 Os povos indígenas no Brasil - o caso do povo Yanomami.

Estima-se que no mundo 370 milhões de pessoas são consideradas indígenas em aproximadamente 90 países [54]. A América Latina é uma região com um dos maiores índices de sociodiversidade do planeta, onde 400 grupos étnicos diferentes somam 50 milhões de indígenas, habitando as mais diversas regiões desde o México até a Argentina [54, 55].

O censo demográfico realizado pelo IBGE em 2010 revelou que a população indígena no Brasil é de 896.917 pessoas vivendo em 106.739.926 ha de terra, 12,5% do território nacional. Estas terras indígenas se concentram principalmente na Amazônia Legal (98%). Estas populações albergam uma das diversidades linguística e culturais mais ricas do mundo, representadas em aproximadamente 300 grupos étnicos que falam mais de 200 línguas diferentes [54]. Embora 36,2% da população considerada indígena vivam em áreas urbanas, a maioria (63,8%) ainda habita áreas rurais, e em muitas ocasiões, em áreas de difícil acesso na floresta Amazônica [55].

O território indígena Yanomami é considerado a Terra Indígena com maior número de habitantes (5% do total de indígenas do Brasil), constituindo uma sociedade de caçadores, coletores e agricultores que habitam as florestas

tropicais do Maciço das Guianas e ocupam um espaço territorial de 192.000 km² ao norte da Amazônia brasileira e das áreas vizinhas da Venezuela (22). Esta vasta região habitada pelos Yanomami foi homologada como Terra Indígena Yanomami pela União em 1992 [56]. Subdividido em quatro subgrupos linguístico de línguas Yanomami, Yanomae ou Yanomama, Sanema e Ninam ou Yanam, são considerados a maior etnia semi-isolada da Amazônia (Fig. 4).

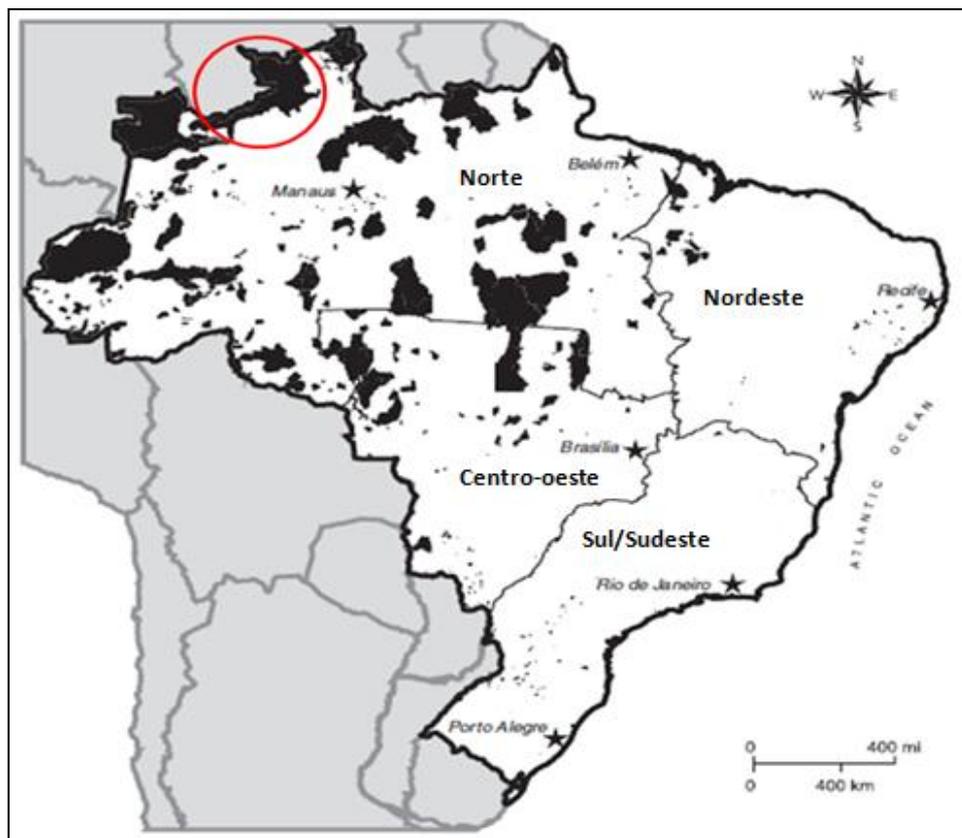


Figura 4. Localização das reservas indígenas no Brasil (em negro, e no caso da reserva indígena Yanomami, ressaltada também em vermelho). Extraída e adaptada de [54].

Dados populacionais de 2013 estimam que o total de população do Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y) no Brasil está ao redor de 21.249 pessoas, das quais 7.875 moram em comunidades que se encontram no estado do Amazonas e 13.374 no leste do estado de Roraima. Mais especificamente, a distribuição da população Yanomami por municípios brasileiros organiza-se do seguinte modo: Municípios do estado do Amazonas - Barcelos (3.123 Yanomami), Santa Isabel do Rio Negro (2.394) e São Gabriel

da Cachoeira (2.358); Municípios de Roraima - Alto Alegre (7.443), Amajari (3.585) Caracarái (998), Iracema (716) e Mucajaí (632) [57].

Em 2005, o DSEI-Y tinha uma população de 7.758 indígenas. Isto representou um crescimento populacional do 181,8% na população total para o ano de 2014 (21.857), com um aumento absoluto de 14.099 indígenas. No entanto, se comparamos os anos de 2013 e 2014, encontramos um crescimento populacional neste período de somente do 2,9%. O maior incremento populacional no DSEI-Y aconteceu anterior ao ano 2010.

Dados referentes à distribuição da população por sexo apontam que, em 2013, houve registro de 10.987 homens (51,8%), frente a 10.215 mulheres (48,2%) no DSEI-Y e, no caso da distribuição da população por faixas etária, os dados indicam que o 60,3% da população tem menos de 20 anos de idade, caracterizando o povo Yanomami como uma população principalmente jovem. Mais especificamente, a população menor de cinco anos representou, nesse ano, o 19% (4.031) da população total (Fonte DSEI-Y-SESAI-RR).

Os Yanomami apresentam baixas semelhanças antropométricas, genéticas ou linguísticas com os outros grupos étnicos vizinhos, o que sugere que os Yanomami vivem em situação de isolamento desde os tempos remotos, nas regiões montanhosas entre as nascentes do rio Orinoco (Venezuela) e do rio Parima (Brasil), que é considerado o território originário deste povo indígena [56]. Posteriormente, expandiram-se para áreas de planície, até abrangerem a área de ocupação atual, muito mais estendida que a originária.

Os Yanomami conservam um modo de vida dependente dos recursos da floresta, sendo as suas principais atividades a caça, a pesca, a coleta de frutos silvestres e o cultivo de vários produtos como a banana, a mandioca, a cana de açúcar e tabaco. Os primeiros contatos com o povo Yanomami ocorreram nos anos de 1950 e 1960 [58]. Os níveis de domínio da língua portuguesa são muito variáveis entre os membros das comunidades, dependendo da intensidade e frequência dos seus contatos com as populações não indígenas [58].

Os grupos locais Yanomami são geralmente constituídos por uma única casa plurifamiliar, em forma de cone ou de cone truncado chamada *shabono* (Yanomami orientais e ocidentais), ou por aldeias compostas de várias casas retangulares (Yanomami do norte e nordeste). Tradicionalmente os *shabonos* consistem de uma grande estrutura circular, sem paredes na parte interior do círculo e formando então uma grande praça central destinada a vários tipos de

atividades. Ainda hoje, algumas comunidades mantêm este padrão tradicional de construção, especialmente nos *shabonos* localizados no estado do Amazonas. Dentro dos *shabonos* ou malocas Yanomami, cada família se agrupa ao redor de um fogo e não existem paredes ou estruturas que separem uma família de outra. Cada família tem sua própria fogueira, onde o alimento é preparado e cozido durante o dia. À noite, as redes são penduradas próximas ao fogo, que é alimentado durante toda a noite para manter uma temperatura agradável aos indígenas.

A mobilidade é uma característica muito importante na cultura deste povo seminômade. Os deslocamentos durante longos períodos de tempo são feitos quando se movem para a segunda residência, onde passam parte do ano, ou para visitas a comunidades com laços de amizade. Esta rotatividade entre a maloca principal e a segunda residência garante o uso dos recursos naturais de maneira equilibrada. Desta forma, pode haver a recuperação de uma área, a que a tribo habitava anteriormente, enquanto a outra está sendo explorada. Estes deslocamentos também terão influência na transmissão da malária e na aplicabilidade das intervenções de controle da doença.

Um componente importante que influencia a assistência à saúde dos Yanomami é o conceito que eles têm das doenças. Obviamente, em virtude da própria cultura, eles têm um conceito etimológico dos agravos muito diferente do da biomedicina, embora em algumas localidades exista uma boa compreensão dos diferentes elementos necessários e responsáveis para transmissão de doenças como a malária. A crença de que as doenças têm normalmente uma origem mágica ou de fenômenos sobrenaturais, dificulta a aceitação do tratamento [58]. Entretanto, eles conseguem diferenciar as epidemias atribuídas ao branco das outras doenças, e a maioria aceita o tratamento para doenças como malária.

Ainda que dados da OPAS indiquem uma diminuição de 60% no número de casos de malária nas Américas, entre 2001 e 2012 [37], ainda existem grupos populacionais onde a redução não foi eficiente, como nos grupos indígenas. No Brasil, o cenário das epidemias de malária nas áreas indígenas, especialmente na região Amazônica, pode chegar a comprometer a sobrevivência de toda a comunidade [59, 60]. Muitos focos de transmissão de malária importantes da Amazônia legal brasileira estão concentrados em comunidades indígenas. Por exemplo, entre os anos 2003 e 2011, houve um

incremento de 142,8% da transmissão da malária em áreas indígenas. Em 2011, aproximadamente 10,6% dos casos de malária na Amazônia foram registrados em áreas indígenas, com mais impacto em alguns estados, como é o caso do estado do Amazonas, onde 49,0% de todos os casos registrados foram em comunidades ameríndias [61]. Apesar destes dados preocupantes, os estudos sobre a transmissão e a ecologia das espécies de vetores da malária nestas áreas são escassos.

Os primeiros estudos referentes à epidemiologia da malária em populações indígenas no Brasil ocorreram na década de 1960, entre populações Xavante localizadas ao longo do rio das Mortes, no atual parque indígena do Xingu, situado ao norte do estado do Mato Grosso [60]. Estudos sobre a migração e inquéritos soropidemiológicos em populações indígenas nas Américas, indicam que a malária não era autóctone nas Américas antes da chegada dos colonizadores. Não se tem como determinar com precisão quando e como a malária foi introduzida nestas comunidades [59, 60]. Registros de uma expedição datada de 1898, no Rio Xingu, revelaram que a malária era a principal causa de morte entre os indígenas locais. Especulou-se que a doença tinha sido introduzida por uma expedição anterior ou por algum visitante indígena infectado [59, 60, 62, 63].

1.5 Malária no Distrito Sanitário Indígena Yanomami - Breve histórico.

Até a década de 1960, os Yanomami do Brasil viviam praticamente isolados. Os primeiros relatos de malária no território Yanomami foram devidos ao contato inicial com não-indígenas e, até a década de 1980, a malária era restrita às áreas da periferia da reserva Yanomami, onde existiam contatos pontuais com sítios e fazendas, que resultavam essencialmente em casos importados e introduzidos entre os indígenas. A partir de 1987, ocorreu uma invasão abrupta de mais de 40.000 garimpeiros na área Yanomami, principalmente na de Roraima. Essa invasão resultou no estabelecimento da transmissão autóctone da malária [64]. A partir daí, a malária se disseminou, com a ocorrência de graves surtos epidêmicos, com elevada morbimortalidade, atingindo, inclusive as comunidades mais isoladas e sem assistência e ocasionando um grave problema de saúde na maior parte do DSEI-Y. Durante toda década de 1990, a transmissão de malária se manteve em altos níveis na

região. Não obstante, entre os anos 2000 e 2002, a situação foi revertida devido às ações de controle integrado desenvolvidas no DSEI-Y, praticamente interrompendo a transmissão da malária entre os Yanomami de Roraima. O controle integrado objetivava a interrupção local da transmissão através do esgotamento da fonte humana de infecção, pelo método da busca ativa sistemática de portadores da infecção e o tratamento precoce, concomitante com atividades de controle vetorial, como borrifações intradomiciliares e nebulizações espaciais de inseticidas. De novo, o relaxamento das medidas de controle e o incremento de atividades de garimpo em algumas áreas propiciariam um novo aumento da incidência da malária a partir de 2006, principalmente nas comunidades do estado do Amazonas [56].

Atualmente, a assistência sanitária na Terra Indígena Yanomami no Brasil é operacionalizada através das 37 unidades de referência sanitárias denominadas Polos Base de Saúde [56]. Portanto, ao se analisarem as tendências de incidência de malária, no tempo, dentro do território Yanomami é importante considerar as heterogeneidades naturais do nível de cobertura e da qualidade das medidas de controle que foram implementadas nos Polos e as características geo-fitoclimáticas.

No período de 2005 à 2014, foram registrados 41.689 casos de malária no conjunto de todos os Polos Base de Saúde do DSEI-Y, dos quais 33.399 foram de *P. vivax*, 7.948 causados por *P. falciparum* e 342 por *P. vivax* + *P. falciparum*. Não tem sido registradas infecções por *P. malariae* na área Yanomami do Brasil neste período de 10 anos. Segundo dados do Índice Parasitário Anual (IPA), o ano com maior intensidade de transmissão foi 2010, com um IPA geral de 395,7 (combinando o IPA de *P. falciparum* de 56,7 e de *P. vivax* de 337,2) casos por cada mil habitantes (Fig. 5). O *P. vivax* teve uma predominância histórica clara sobre o *P. falciparum*. No entanto, nos anos 2007 e 2008 houve um pico de casos por *P. falciparum*, quando as monoinfecções por esta espécie corresponderam ao 34,2% e 31,87% do total de casos no DSEI-Y, respectivamente. No ano de 2014 foram diagnosticados 2.525 casos de *P. vivax* (85,9%), 394 de *P. falciparum* (13,5%) e 18 malária mista *Pf+Pv* (0,6%).

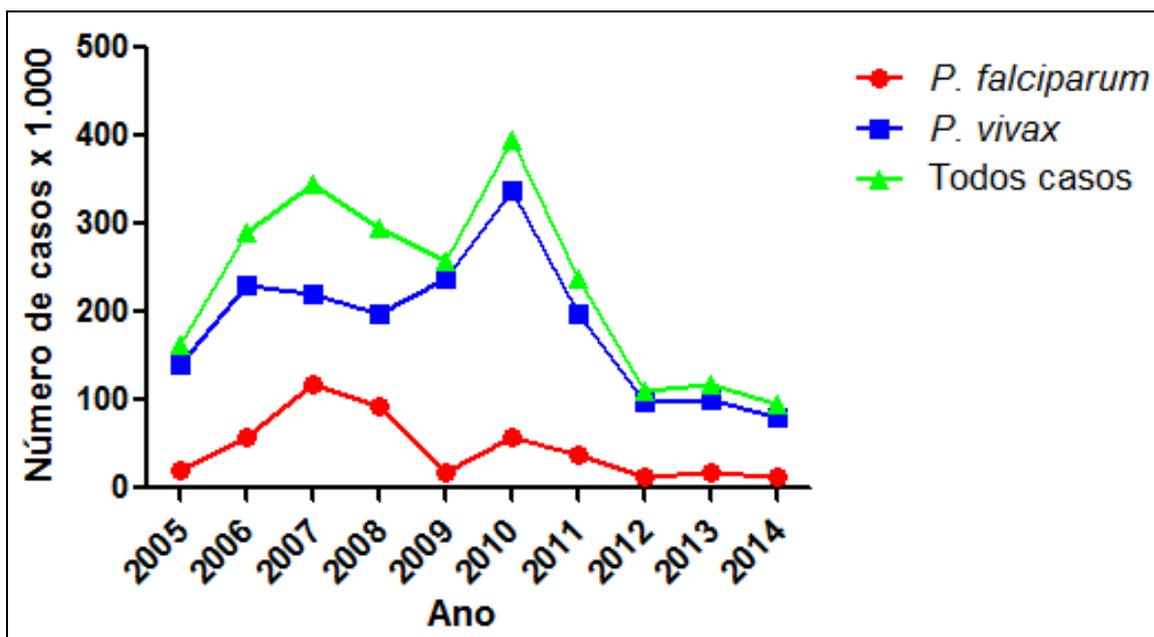


Figura 5. Dados de malária no DSEI-Y por espécie plasmoidal, período 2005 - 2014. Fonte: DSEI Yanomami e Ye'kuana/SESAI/RR.

1.6 Hidrogeomorfologia na Amazônia e as diferentes paisagens da malária.

A Amazônia é uma vasta região que apresenta uma enorme variedade de rios com dinâmicas sazonais diferenciadas. A bacia hidrográfica do Amazonas é a maior do mundo, representando aproximadamente 7.000.000 de km², contendo a maior área de floresta tropical do planeta (cerca de 5.000.000 km²). A chamada floresta de terra firme cobre 90% desta extensão, consistindo em áreas da floresta amazônica que não estão sujeitas aos alagamentos sazonais. Aproximadamente 150.000 km² correspondem às planícies de inundação dos grandes rios amazônicos. Soma-se a essa extensão uma área maior associada às regiões inundáveis ao longo dos rios menores, córregos e igarapés, assim como área de pântanos [65].

Segundo Sioli [66] os rios da Amazônia podem ser classificados em três categorias, de acordo com as características das suas águas: rios de águas brancas, rios de águas pretas e rios de águas claras. As características físicoquímicas das águas dos rios está determinada em grande medida pelo local onde se formam os cursos de água. Importantes rios, como o Solimões/Amazonas e alguns dos seus principais tributários, como os rios Juruá, Japura, Purus e Madeira são considerados de águas brancas. Os rios

de águas brancas têm parte de sua origem em áreas andinas e pre-andinas. Devido à riqueza mineral das águas destes rios, os solos das planícies de inundação são altamente férteis e a grande quantidade de sedimentos suspensos em suas águas lhes confere uma textura barrenta. Não obstante, a quantidade de sedimentos e o grau de turbidez serão variáveis e dependerão da profundidade da água, da estação do ano e da distância da margem dos rios. Estas águas são ricas em sais minerais dissolvidos, com alta condutividade e com pH normalmente entre valores de 6,0 e 7,0. As áreas inundáveis dos rios de água branca (borda barrenta) são chamadas de várzeas, enquanto as associadas aos rios de águas pretas (borda de areia), de igapó. As várzeas do rio Amazonas, podem ter uma amplitude que vai dos 20 aos 100 km [67].

O rio Negro, cuja bacia hidrográfica abrange cerca de 712.000 km², é o exemplo mais importante de um rio de águas negras com as planícies de inundação associadas. Este rio contribui com 35% das águas que vão formar o rio Amazonas, resultante da união do rio Negro e Solimões. Antes desse ponto de confluência, o rio Negro recebe um grande número de tributários principalmente de águas pretas. Os rios de águas negras, originam-se em áreas como as regiões rochosas arcaicas do escudo das Guianas. As águas dos rios de águas pretas são pobres em sólidos em suspensão, e apresentam uma coloração normalmente castanho-avermelhada. Estas águas apresentam uma condutividade muito reduzida (<20 IS cm⁻¹) e têm tendência a serem ácidas (pH 4-5). Estas características afetam diretamente as características nutricionais das planícies de inundação associadas, que são muito pobres [68].

Finalmente, existem os rios classificados como de águas claras, como o Tapajós, que se origina no planalto central brasileiro, e também o rio Uraricoera, que tem as suas origens na Serra Parima, área Yanomami (chamado de rio Parima antes de se transformar no rio Uraricoera) e que da sua confluência com o rio Tacutu forma o Rio Branco. As águas destes rios são esverdeadas e normalmente de pH ácido e tipo transparente. Estas águas apresentam uma grande variabilidade de características físicoquímicas, encontrando-se os valores dos parâmetros e de produtividade do solo entre os encontrados nos rios de água preta e branca. Muitos dos rios de águas pretas e brancas podem estar intercalados, como por exemplo, os rios Unini e Cuiuni, afluentes da margem direita do Rio Negro, que contêm águas provenientes de

áreas inundáveis associadas a rios de água branca [68]. A Figura 6, destaca os principais rios da Amazônia do Brasil e a classificação de suas águas.

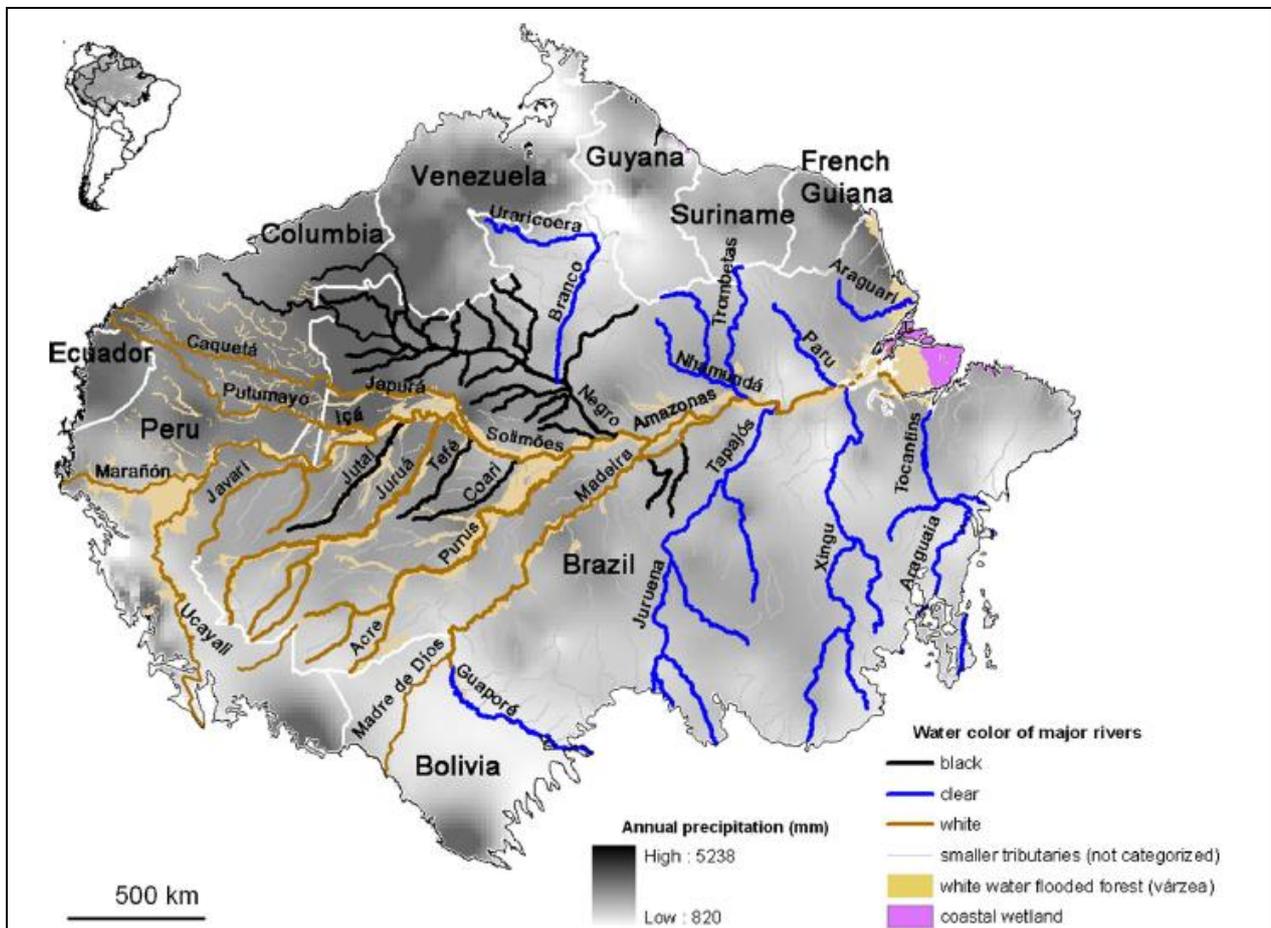


Figura 6. Mapa representando os principais rios da bacia Amazônica, classificados em três tipos principais, de águas brancas, claras e pretas. Extraída de [68].

Outra classificação importante dos rios está relacionada à hierarquia de seus tributários, compondo uma escala de 1ª a 12ª ordem. Rios de 1ª a 5ª ordem são considerados rios de baixa ordem, de 6ª a 12ª ordem são aqueles de alta ordem [69]. Assim, os rios de primeira ordem são aqueles segmentos mais próximos às nascentes, onde o volume de água ainda é baixo, enquanto os rios de alta ordem já teriam recebido a água de vários tributários e, portanto, teriam uma maior extensão e volume de água. Um exemplo de rio de 12ª ordem seria o segmento final do rio Amazonas.

Junk et al. [70], introduziram o conceito dos pulsos de inundação, baseados nas características hidrológicas dos rios, sua bacia de drenagem e

planície de inundação. O pulso de inundação constitui ritmos de alagamentos sazonais que se alternam nos períodos de cheias e seca. Estes mesmos autores propuseram que essas flutuações dos níveis dos rios são os principais determinantes da dinâmica dos seres vivos associados aos rios e suas planícies de inundação, com especial relevância nos trópicos. No Brasil, os exemplos clássicos dessa dinâmica estão representados nas várzeas da bacia Amazônica e na planície aluvial do Pantanal, onde os rios e os lagos permanentes das planícies de inundação vão se conectar ciclicamente através das áreas temporariamente inundáveis, as quais formam as áreas de transição do meio terrestre para o meio aquático (ATTZ). Os três componentes principais para a compreensão da dinâmica dos sistemas de rios são: o canal do próprio rio, as áreas de transição do meio terrestre para o meio aquático ou áreas inundáveis transitórias, e os corpos de água permanentes associados (lagos) [67, 68, 70, 71]. Nestes períodos de interconexão entre o rio e as planícies de inundação associadas, ocorrem importantes ciclos de transferência de nutrientes. Muitos organismos têm mostrado diferentes estratégias de adaptação às mudanças deste entorno [65]. Obviamente, existe uma enorme diferença entre a dinâmica dos rios e os pulsos de inundação associados a aqueles de baixa e alta ordem na Amazônia.

Enquanto os rios de alta ordem apresentam pulsos de inundação monomodais, previsíveis e de longa duração, os rios de baixa ordem são caracterizados por pulsos de inundação polimodais, imprevisíveis e de curta duração [68, 72]. A amplitude dos pulsos de inundação também dependerão da topografia e vazão do rio e dos regimes de chuvas. Os pulsos de inundação dos rios de baixa ordem estarão portanto, muito mais influenciados pela intensidade das chuvas locais, decrescendo em poucas horas depois de chuvas fortes [70]. A frequência e extensão dos pulsos de inundação em rios de baixa ordem também são importantes para os processos de intercâmbio de matéria orgânica entre os rios e as planícies de inundação. Nestes tipos de rios, os momentos de intercâmbio não ocorrerão em momentos equilibrados em tempo e espaço, porém em momentos pontuais e imprevisíveis. Com uma diminuição dos eventos de alagamento, os corpos de água associados vão tender a acumular matéria orgânica. Em vales pequenos associados aos rios de baixa ordem, são encontradas abundantes águas subterrâneas e solo normalmente saturado de água [65].

Toda essa dinâmica dos pulsos de inundação e do comportamento dos rios de baixa ordem desencadeia um processo de transformação dos componentes orgânicos e inorgânicos nas planícies de inundação, além de produzir corpos de águas de diferentes tamanhos e padrões de conexão com os rios e características físicoquímicas particulares. Assim, as espécies dependentes do meio aquático encontrarão maiores dificuldades de se adaptarem à dinâmica dos rios de baixa ordem, sendo lavadas ou obrigadas a migrar [65].

Outro elemento fundamental na paisagem da Amazônia são os lagos, principal tipo de macro habitat aquático na região. Segundo Junk et al. [67], os lagos de planície de inundação foram classificados em quatro tipos principais: *Scroll lakes* (lagos alongados e estreitos com abundantes macrófitas submersas), lagos de ferradura ou *oxbow lakes* (originados a partir de meandros abandonados e com uma forma típica de ferradura), lagos de várzea ou de depressões (localizados em depressões das planícies de inundação) e os lagos de terras altas ou *Ria-lake* (lagos dendríticos formados pelo represamento de tributários e o alagamento nos vales) [73]. A maioria destes lagos estão associados aos rios e podem manter uma conexão maior ou menor com esses cursos de água. A alternância de situações de alagamento ou seca nas planícies de inundação tem um impacto muito importante sobre os fatores bióticos e abióticos [65, 68]. Portanto, a dinâmica dos corpos hídricos é um dos principais fatores governantes dos processos ecológicos nas área úmidas, o maior condicionante da ocorrência e da densidade espaço-temporal de plantas e animais que se encontram dentro do seu limite.

Assim, nos rios Amazônicos e nos seus tributários, características como o cor da água, a ordem, os pulsos de inundação, a largura e a sinuosidade vão determinar em grande medida a abundância e características dos criadouros naturais associados e, conseqüentemente, a distribuição e densidade das espécies de anofelinos que, por sua vez, exercerá influência direta nos padrões de transmissão locais de malária.

1.7 Principais anofelinos neotropicais encontrados na área Yanomami do Brasil - Bionomia e importância médica.

A região Amazônica é considerada uma das regiões do mundo com maior biodiversidade. Contém grande riqueza de criadouros capazes de suportar o desenvolvimento de numerosas espécies de anofelinos, alguns deles reconhecidos vetores da malária [74]. É nos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* que se encontram os mais importantes vetores da malária no território brasileiro. Estabelecer a importância dos vetores, sua distribuição, seu grau de antropofilia, endofagia, endofilia e suscetibilidade aos plasmódios humanos são pontos fundamentais para o efetivo controle da malária em uma determinada região [33, 75]. Contudo, para se determinar a importância dos vetores é imprescindível a identificação correta das espécies. Dentro do subgênero *Nyssorhynchus* encontramos espécies distintas, porém, com características morfológicas semelhantes e, muitas vezes, possuem padrões comportamentais variáveis no âmbito de sua distribuição geográfica [76-78]. Embora estas diferenças possam ser explicadas até certo ponto pelo grau de plasticidade adaptativa das espécies a diferentes condições ambientais [45], podem também estar relacionadas a um grau de polimorfismo do grupo ou representarem complexos de espécie. Nesses casos é necessário o suporte de outras técnicas além da morfologia clássica para se determinar o status taxonômico dos membros de tais complexos [79-81]. Informações sobre aspectos da bionomia e importância médica referentes a uma só espécie pertencente a um complexo, não podem ser tomadas como válidas para o complexo como um todo [82]. A identificação correta da identidade das espécies, tem muita influência na compreensão da complexidade dos quadros de transmissão da malária e, conseqüentemente, na escolha de métodos de controle adequadas [79].

As espécies de anofelinos têm sido tradicionalmente divididas em vetores primários (a presença dos quais permite o desencadeamento e manutenção da transmissão) e espécies secundárias, que teriam uma importância complementar às espécies primárias na transmissão local da malária, muitas vezes tendo um papel ocasional e residual. Há também anofelinos que não são vetores de malária humana. No entanto, são vários os exemplos de espécies que em um local são consideradas primárias e em um

outro de secundária. Por exemplo, *An. nuneztovari* s.l. é considerado vetor primário na Venezuela e secundário no Brasil e *An. oswaldoi* s.l. foi considerado primário no Acre [83] e secundário na maioria dos outros lugares onde foi capturado [7]. Isto pode ser explicado pela complexidade inerente à existência dos complexos de espécies. Na Figura 7, é apresentado um mapa com a distribuição dos principais vetores da malária no continente americano [84]. Nota-se a pouca diversidade de espécies epidemiologicamente relevantes encontradas na América do Norte (somente o *An. freeborni*, *An. quadrimaculatus* s.l. e *A. pseudopunctipennis*) em comparação com a maior diversidade de vetores da malária encontrados na Mesoamérica e América do Sul.

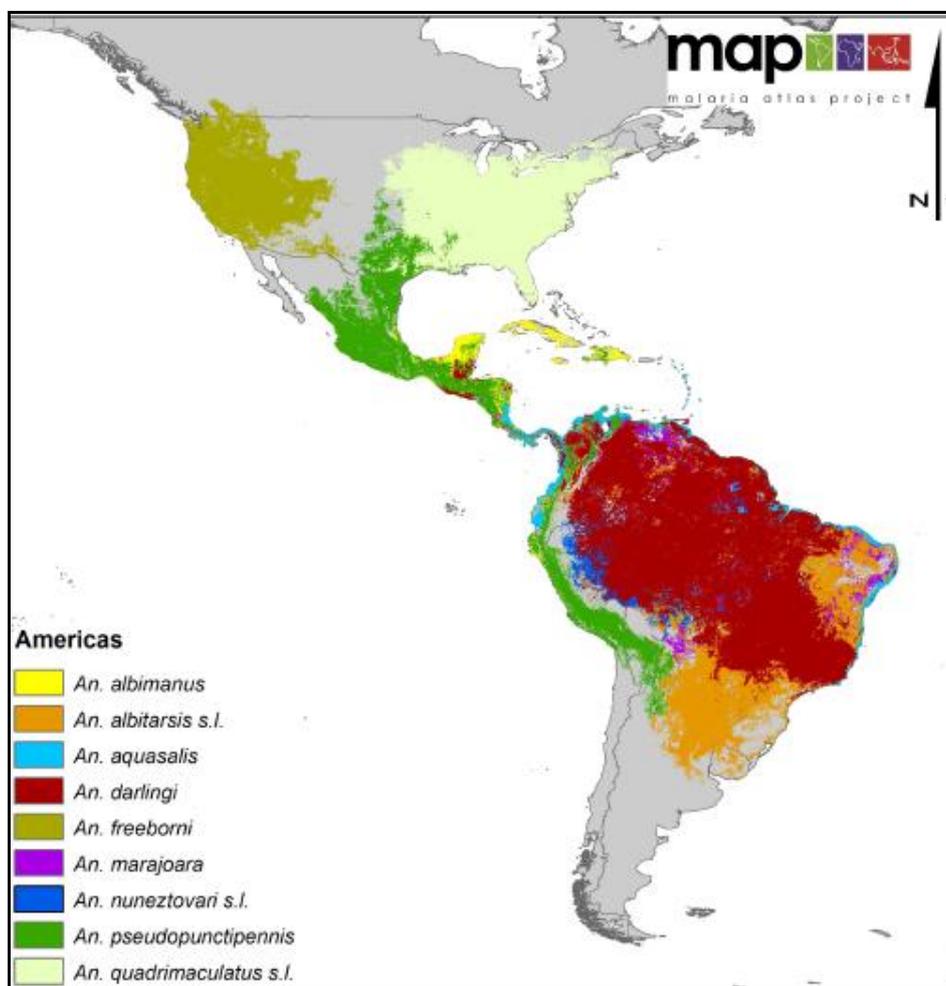


Figura 7. Mapa de distribuição das principais espécies de anofelinos transmissores da malária na região das Américas. Note-se a clara dominância de *An. darlingi* na região Amazônica. Extraída de Sinka [84].

Considerando-se a região Amazônica, o *Anopheles darlingi*, *Anopheles* do complexo Albitarsis e *An. aquasalis* são os principais vetores da malária. Algumas espécies têm sido apontadas como de alta importância local, como é o caso de *An. marajoara* [85], membro do complexo Albitarsis. Outras espécies, como o *An. triannulatus s.l.* e *An. nuneztovari s.l.*, também têm papel como transmissores secundários ou ocasionais na transmissão desse agravo [86]. No entanto, em algumas regiões, certas espécies consideradas vetores secundários podem passar a ter um papel como vetor primário. Algumas outras espécies têm sido encontradas infectadas com plasmódios, como o *An. intermedius*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. forattinii*, e o seu papel na transmissão da malária também tem sido considerado residual local ou ocasional [27, 82, 87].

No Brasil, o principal vetor da malária humana é o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, cuja distribuição geográfica abrange o sul do México até o norte da Argentina, estendendo-se da parte ocidental dos Andes à costa Atlântica [31]. Essa espécie está presente em todo o território brasileiro, com exceção de áreas muito secas no nordeste e regiões de grandes altitudes. Possui comportamento hematofágico que o qualifica como excelente vetor, uma vez que é um dos anofelinos brasileiros mais antropofílicos e endofágicos, com ampla distribuição geográfica, alta densidade populacional e é suscetível a todos os plasmódios humanos [7, 33, 88, 89]. Esta espécie é abundante na região amazônica, onde está diretamente envolvida com a transmissão da malária endêmica e epidêmica, podendo transmitir a malária mesmo quando em baixa densidade [7, 90-94]. Embora inicie sua atividade hematofágica no crepúsculo vespertino, *Anopheles darlingi* tem alto pico de atividade no meio da noite, podendo apresentar pico unimodal, por volta da meia noite ou bimodal com picos crepusculares vespertinos e matutinos. Este comportamento pode variar de acordo com a região geográfica [95-99]. É notória também a sua preferência por picar o homem dentro das casas. Entretanto, tem sido encontrado no crepúsculo vespertino exercendo a hematofagia tanto em humanos como em animais fora das casas [32, 33, 93, 96, 100]. A fêmea de *Anopheles darlingi* usualmente deposita seus ovos em criadouros como lagos, represas e remansos de igarapés. Suas larvas eventualmente têm sido encontradas em poças de chuvas e pegadas de animais, durante a estação chuvosa. Entretanto, as grandes coleções líquidas parcialmente sombreadas ou totalmente ensolaradas, porém límpidas e com vegetação emergente,

detritos ou algas são os focos preferenciais. Suas larvas podem se desenvolver em áreas mais afastadas das margens dos rios e mais profundas, onde exista um apoio como um tronco ou pequenas ilhas de plantas [7, 93]. *Anopheles darlingi* é uma espécie que vem se adaptando às alterações antrópicas, como áreas com alto impacto de desmatamento, assentamentos agrícolas e criadouros artificiais como tanques de piscicultura, podendo até mesmo se beneficiar dessas alterações [101]. Esse vetor está presente em muitas regiões do país (estima-se que em um 80% da extensão do Brasil), mas sem transmissão atual de malária [6]. O uso de inseticida tem selecionado populações mais resistentes desse vetor e variações nos aspectos morfológicos e comportamentais há muito vem sendo investigados em estudos genéticos de suas populações. Esses estudos podem esclarecer melhor diferenças na bionomia dessa espécie e inferir sobre aspectos de sua capacidade vetorial, assim como esclarecer se ela consiste em um complexo de espécies [102-107].

Outra espécie com grande distribuição na Amazônia e cujo papel como vetor da malária ainda não está bem esclarecido é o *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* Peryassú. Trata-se, porém, de um complexo de espécies, formado por pelo menos três membros: *An. oswaldoi* s.s., *An. oswaldoi* A e *An. oswaldoi* B [108]. *Anopheles oswaldoi* s.s. é muito similar a *Anopheles konderi* Galvão & Damasceno, tendo sido colocado em sinonímia com essa espécie por Lane [109]. Entretanto, Flores-Mendoza et al. [110], examinando exemplares proveniente de Coari, no Amazonas, validou e ressuscitou *Anopheles konderi*. Com efeito, *Anopheles oswaldoi* e *Anopheles konderi* podem ser separados morfológicamente pelas características da genitália masculina, cujo ápice de seus aedeagos apresentam formatos distintos. Dentro deste complexo de espécies encontramos uma diversificada preferência por criadouros, com variáveis níveis de tolerância ao sol, a turbidez e tamanho dos corpos de água [111]. *An. oswaldoi* s.l. está amplamente distribuída na América do Sul, ao este dos Andes, e especialmente associada a áreas de floresta do interior da Amazônia, embora tenha sido registrada também nas margens de floresta, em áreas de estradas e de cultivo [108]. As larvas de *An. oswaldoi* s.l. têm sido coletadas em águas claras ou turvas [112]. É um complexo de espécies consideradas exofágicas e de tendência zoofílicas, embora possa ser encontrada picando o homem quando este adentra em

ambientes de floresta ou na sua proximidade. Membros deste complexo têm sido capturados em muitas regiões e em altas densidades, mas na maioria das ocasiões não foram encontrados infectados com plasmódios [112]. Entretanto, alguns autores apontam para um papel importante dessa espécie na transmissão da malária em algumas áreas da Amazônia brasileira e em países da América do Sul [113]. Por exemplo, *An. oswaldoi* s.l. tem sido encontrado infectado no Acre, onde foi considerado o principal vetor da malária [83, 114-116], assim como em Rondônia [27, 76] e em uma área de alta prevalência de malária, na Colômbia [117]. A importância epidemiológica dessa espécie só pode ser esclarecida com a correta identificação dos membros desse complexo. Diversos estudos moleculares têm sido realizados visando determinar o status taxonômico do grupo [108, 118-120]. Porém, além dos dados moleculares, é importante que se faça um estudo mais abrangente, envolvendo análise morfológica, principalmente da genitália masculina e dados da biologia e ecologia dessa espécie nas áreas de sua distribuição geográfica [77, 121].

Dentro do subgênero *Nyssorhynchus*, outra espécie importante é o *An. triannulatus* Neiva & Pinto. É uma espécie abundante na região Amazônica e apresenta grande variabilidade fenotípica e comportamental ao longo de sua distribuição geográfica, sendo considerada como um complexo de espécie [79, 122-124]. Tem ampla distribuição na América do Sul e parte da América Central, estendendo-se da Argentina à Nicarágua e ilha de Trinidad [112, 125]. O complexo *Triannulatus* está composto por pelo menos três espécies: *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* e uma terceira espécie *An. triannulatus* C. As duas primeiras espécies podem ser separadas entre si por características morfológicas da genitália masculina e da larva de 4º estágio [126]. Análises moleculares podem distinguir as três espécies do complexo e evidenciam que *Anopheles halophylus* e *Anopheles triannulatus* C são mais estreitamente relacionadas entre si, quando comparadas ao *Anopheles triannulatus* s.s. [124, 127]. *Anopheles triannulatus* s.l. tem hábitos crepusculares, sendo considerada principalmente de caráter zoofílico, picando de preferência fora das moradias e no interior das florestas. Entretanto, pode invadir os domicílios e também se alimentar no homem [7, 93, 128-131]. Suas formas imaturas têm sido associadas principalmente a criadouros naturais, embora com pouca adaptação a corpos de água, resultado da atividade antrópica. Suas larvas já

foram encontradas em áreas abandonadas de mineração, tanques de piscicultura e criadouros artificiais urbanos [132]. Esta espécie prefere criadouros naturais grandes e permanentes, como lagos, pântanos, poças permanentes e margens lânticas de rios, e normalmente tem sido associada com vegetações emergentes e macrófitas submersas [131]. Um dos membros desse complexo, *Anopheles halophylus*, parece preferir criadouros com maior teor de salinidade, tendo sido encontrado em alagados temporários, ensolarados, ricos em vegetação flutuante (*Salvinia sp.*), formados durante a cheia do rio Miranda, em Mato Grosso do Sul [131].

Membros do complexo *Triannulatus* têm sido encontrados infectados em algumas ocasiões no estado de Rondônia [27] e outras regiões do Brasil [133], sendo considerado como vetor secundário quando se apresenta com altas densidades [88, 134, 135]. Não obstante à importância de cada uma das espécies do complexo, seu papel na transmissão da malária permanece sem esclarecimento [133].

Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari é outro anofelino importante no histórico epidemiológico da malária em países da América do Sul. Porém, como outros anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus*, tem status taxonômico bastante confuso. Sua distribuição geográfica abrange o norte da América do Sul, até o leste do Panamá, ocupando grandes áreas dentro da região Amazônica e alguns estados do nordeste [93, 136]. Dentro do complexo *Nuneztovari* os seguintes membros têm sido descritos: *An. nuneztovari s.s.*, *An. nuneztovari A*, *An. goeldii* e *An. dunhami*. Estudos moleculares têm sido empreendidos no intuito de esclarecer a posição taxonômica de cada membro do complexo. *An. goeldii* foi finalmente confirmado como espécie válida através de caracterização morfológica da genitália masculina de exemplares do Amapá [137] e por testes moleculares, baseado em análises das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I - COI, gene *white* e ITS2 em 2008 [138]. Portanto, os exemplares que foram identificados como *An. nuneztovari* em publicações anteriores, podem conter indivíduos que pertençam a diferentes espécies, já que a classificação só baseada nas características morfológicas das fêmeas não é suficiente para diferenciar estes grupos [139]. Formas imaturas de *An. nuneztovari s.l.* já foram encontradas criando-se em coleções líquidas como poças, depressão de pneus no solo, lagoas, expostas ao sol e com águas turvas [93]. Já as formas imaturas de *An. goeldii*, estas têm sido

encontradas principalmente em criadouros parcialmente ou bem expostos ao sol, como lagos, áreas inundáveis e tanque artificiais, associados à vegetação flutuante e emergente e com algumas características da água variáveis (água clara a turva, mas sempre parada). Esta espécie foi encontrada coabitando criadouros com *An. marajoara*, *An. darlingi*, *An. triannulatus s.l.* e *An. intermedius* [139]. Foi realizada uma estratificação em três grupos genéticos diferenciados: um da região de Venezuela e Colômbia e dois da região da bacia Amazônica [139]. Análise da variabilidade genética, estudos envolvendo características tanto morfológicas quanto moleculares e cromossômicas, têm verificado ampla divergência em populações geograficamente distintas [139-142]. Considerada uma espécie zoofílica e exofágica, tem sido algumas vezes capturada picando o homem e repousando dentro das casas [93]. Porém, essas características podem mudar de acordo com a região geográfica. Populações da Colômbia e Venezuela, em áreas malarígenas, mostraram marcado hábito antropofílico e endofágico e picos de atividade por volta da meia noite. Entretanto, populações do Brasil e Suriname têm apresentado hábitos zoofílicos e exofágicos, com picos de maior atividade por volta do crepúsculo vespertino [143, 144]. *An. nuneztovari s.l.* tem sido incriminado como vetor primário da malária em varias regiões de Venezuela, Colômbia e Peru [82]. A importância médica de *An. goeldii* ainda está por esclarecer. Galardo et al. [145] encontraram espécimes identificados como *An. nuneztovari* infectados com plasmódios. Estes exemplares foram capturados nos estados de Pará e Amapá. Ainda no Brasil, Tadei e Tacher [146] encontraram indivíduos identificados como *An. nuneztovari* infectados com *P. vivax*, *P. falciparum* e por *P. malariae* ao longo da rodovia BR-174.

Muitos exemplares de *An. nuneztovari s.l.* podem ser confundidos com espécies de outros grupos, como *An. oswaldoi*, *An. rangeli* e *An. benarrochi*, *An. strodei* e *An. evansae*, em decorrência de características morfológicas que se sobrepõem nessas espécies. A análise de características da genitália masculina, morfologia da larva de quarto estágio, a avaliação da distribuição geográfica e o uso de ferramentas moleculares são importantes estratégias para se alcançar uma identificação mais precisa da espécie e, conseqüentemente, determinar medidas mais eficazes para o seu controle.

Membros do subgênero *Kerteszia* encontram-se desde o México até o sul do Brasil, principalmente em áreas costeiras do oceano Pacífico e Atlântico,

onde várias espécies de bromélias, seus criadouros principais, são abundantes. No Brasil foram encontradas as seguintes espécies: *An. neivai* no Amazonas, *An. cruzii*, *An. bellator*, *An. homunculus*, *An. bambusicolus* (a única espécie que prolifera nos bambus) e *An. laneanus* nas áreas de Mata Atlântica. Dentre estas espécies, *An. cruzii* e *An. bellator* são as que têm maior importância epidemiológica. Esses dois vetores têm comportamentos diferentes, com o *An. bellator* preferindo terras mais baixas e *An. cruzii* encontrado mais frequentemente em áreas de encosta, sendo mais abundante em áreas de maior altitude [39].

Em algumas áreas, membros do subgênero *Kerteszia* têm sido incriminados como vetores primários e em outras têm um papel de caráter mais secundário ou ocasional na transmissão da doença. No caso dos remanescentes da mata atlântica, bioma de imensa biodiversidade no sudeste do Brasil, o *An. cruzii* é incriminado como o principal vetor da malária de floresta destas áreas [39]. *An. neivai* tem sido incriminada na transmissão da malária em área da costa de Pacífico da Colômbia [147]. Os membros do subgênero *Kerteszia* têm uma especificidade na ecologia das formas imaturas que os diferenciam enormemente de outras anofelinos, que é a escolha de bromélias como locais de oviposição [148]. Esta falta de dependência de corpos de água no solo, vai ter uma enorme importância na distribuição espaço-temporal destas espécies, e portanto, na dinâmica de transmissão da malária. Estratégias de controle tradicionais para estas espécies podem ser pouco eficientes (mosquiteiros) ou manejo de criadouros (ao proliferar em díspares e numerosas bromélias), embora estratégias muito agressivas de desmatamento para acabar com os criadouros naturais destes vetores foram relatadas no Brasil dos anos 1940 e 1950 [41]. *An. cruzii* pica tanto pessoas quanto animais e tem sido encontrado picando tanto de dia (em maior proporção que outros subgêneros de anofelinos) quanto de noite, mas com preferência para crepúsculo vespertino. O ciclo de transmissão da malária na mata Atlântica pode envolver humanos e algumas espécies de primatas neotropicais (do gêneros *Alouatta* e *Cebus*). Além das espécies de plasmódio que infectam humanos registradas na região (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*), os anofelinos do subgênero *Kerteszia* são também vetores dos plasmódios simianos, *P. simium* e *P. brasilianum*, que ocasionalmente podem também ser transmitidos às pessoas [148].

O subgênero *Anopheles* parece desempenhar um papel secundário em relação aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* em território brasileiro. Portanto, estudos direcionados especificamente para as espécies que compõem esse subgênero são mais escassos. Entretanto, algumas dessas espécies têm sido encontradas infectadas com plasmódios. Entre as espécies desse subgênero que habitam áreas de florestas temos *Anopheles (Anopheles) mattogrossensis* Lutz & Neiva, cuja distribuição geográfica até o momento conhecida abrange o Brasil, Venezuela, Colômbia e Bolívia [149], tendo sido registrada nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Roraima, Amapá, Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul [93, 149]. O *An. (Ano.) intermedius* apresenta também uma ampla distribuição na América Central e do Sul. No Brasil, encontra-se amplamente distribuído da Amazônia até áreas de costa dos estados do sul do país [150]. Ambos anofelinos de hábitos zoofílicos e exofágicos, mas que podem também picar o homem. Porém, raramente invadem o domicílio [93]. Alguns anofelinos membros da série Arribalzagia, como o *An. mattogrossensis* e *An. intermedius*, têm sido também incriminados na transmissão da malária, inclusive no Brasil [87, 145, 146]. O esclarecimento da identidade taxonômica dos membros desta série tem sido historicamente complicado, tanto por uma falta de estudos direcionados a eles como pela grande semelhança morfológica entre algumas das espécies. As espécies do subgênero *Anopheles* são características de áreas de floresta, não se adaptando facilmente a ambientes alterados pelo homem. Suas formas imaturas se desenvolvem em criadouros com vegetação, parcial ou totalmente sombreados, tais como pântanos, lagoas e poças residuais que se formam com água da chuva no solo das florestas [93, 151]. Larvas de *An. mattogrossensis* foram encontradas criando-se no mesmo ambiente com larvas de *An. darlingi*, *An. bachmanni* (= *Anopheles triannulatus*), *An. punctimacula* e *An. tarsimaculatus*. Análise da variabilidade genética de *An. mattogrossensis* e *An. intermedius* do Amazonas realizadas por Santos et al. [152], para enzimas Esterase (EST-I), Fosfoglucomtase (PGM) e LAP 1 e 2 revelaram uma baixa variabilidade para ambas as espécies, o que os autores associaram a uma alta especialização por nichos ecológicos concretos.

1.8 Justificativa para o Estudo.

Dentre as comunidades que habitam a Amazônia, as comunidades indígenas são especialmente vulneráveis à malária. Dados epidemiológicos indicam que os Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari apresentaram os maiores índices de transmissão da malária dentro do Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y). Em virtude da dificuldade de acesso às áreas indígenas e em vista das características socioculturais peculiares dessas populações, pouco é conhecido sobre a diversidade faunística, biologia e comportamento das espécies de anofelinos vetores de malária nessas áreas. Muitas destas regiões indígenas remotas encontram-se em áreas associadas a rios de baixa ordem, que podem formar criadouros de diferentes características e sazonalidade. A interação dos indígenas dessas aldeias com a dinâmica das coleções líquidas e com a fauna de anofelinos presente na região podem influenciar na prevalência da malária entre essas populações. Contudo, essencialmente nada se sabe a respeito. Portanto, é necessária a realização de estudos sobre a fauna anofélica, os aspectos ecológicos e a infectividade das espécies de anofelinos em áreas indígenas Yanomami do Brasil. As informações entomológicas e ecológicas são fundamentais para o melhor direcionamento das medidas de controle em áreas indígenas da Amazônia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a fauna, os aspectos ecológicos e a infectividade das espécies de anofelinos em áreas indígenas Yanomami do Brasil: Toototobi (AM), Parafuri (RR) e Marari (AM)

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a fauna de anofelinos e avaliar o comportamento hematofágico quanto ao horário e tipo de ambiente (intra, peri e extradomiciliares);
- Mapear e classificar os criadouros naturais associados aos rios de baixa ordem, utilizando uma nova classificação e metodologia de coleta, quantificando as formas imaturas dos anofelinos;
- Determinar a associação de parâmetros ambientais dos criadouros com as principais espécies de anofelinos coletados;
- Caracterizar a sazonalidade das principais espécies de anofelinos encontradas;
- Determinar as taxas de infectividade e de inoculação dos anofelinos nas áreas de estudo;
- Associar os dados entomológicos às flutuações da incidência da malária em Marari.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y), Brasil.

A assistência sanitária na Terra Indígena Yanomami no Brasil é operacionalizada através das 37 unidades de referência sanitárias denominadas Polo Base de Saúde, os quais foram definidos a partir do agrupamento de comunidades próximas geograficamente e com maiores afinidades e laços de convivência sociocultural. O conjunto destas estruturas de saúde forma o Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y), atendendo a uma população de 21.249 indígenas, distribuídos em 277 aldeias localizadas no norte ocidental do estado de Amazonas e no oeste do estado de Roraima. Os Yanomami compõem 98,3% desta população (20.875), sendo o restante de representantes principalmente da etnia Ye'kuana (357 indígenas - 1,7%) [57]. Os Polos Base estão estruturados como unidades básicas de saúde (postos de Saúde – sede do Polo Base), e contam com atuação de equipe multidisciplinar de saúde indígena, composta por um enfermeiro, um número variável de técnicos de enfermagem e guardas de endemias que realizam os diferentes programas de saúde e atuam, por exemplo, no combate à malária nos Polos Base endêmicos para esta doença.

O acesso à maioria dos Polos Base é feito por pequenas aeronaves que partem geralmente da sede do DSEI-Y, em Boa Vista - RR. Na sede de muitos Polo Base é possível se dispor de um gerador de energia, abastecimento de água encanada e sistema de esgoto. A comunicação entre os Polos Base e a sede do DSEI-Y em Boa Vista é feita por radiofonia. Os consolidados epidemiológicos de malária são gerados na sede do DSEI-Y em Boa Vista, a partir das fichas de atividade dos microscopistas e relatórios enviados de campo que alimentarão os sistemas de informação em saúde, como o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica -SIVEP-malária.

3.2 Área de estudo: Parafuri, Toototobi e Marari.

O presente estudo foi realizado em três Polos Base Yanomami: Parafuri, localizado no leste do Estado de Roraima, Toototobi e Marari, na parte mais setentrional do estado de Amazonas (Fig. 8).

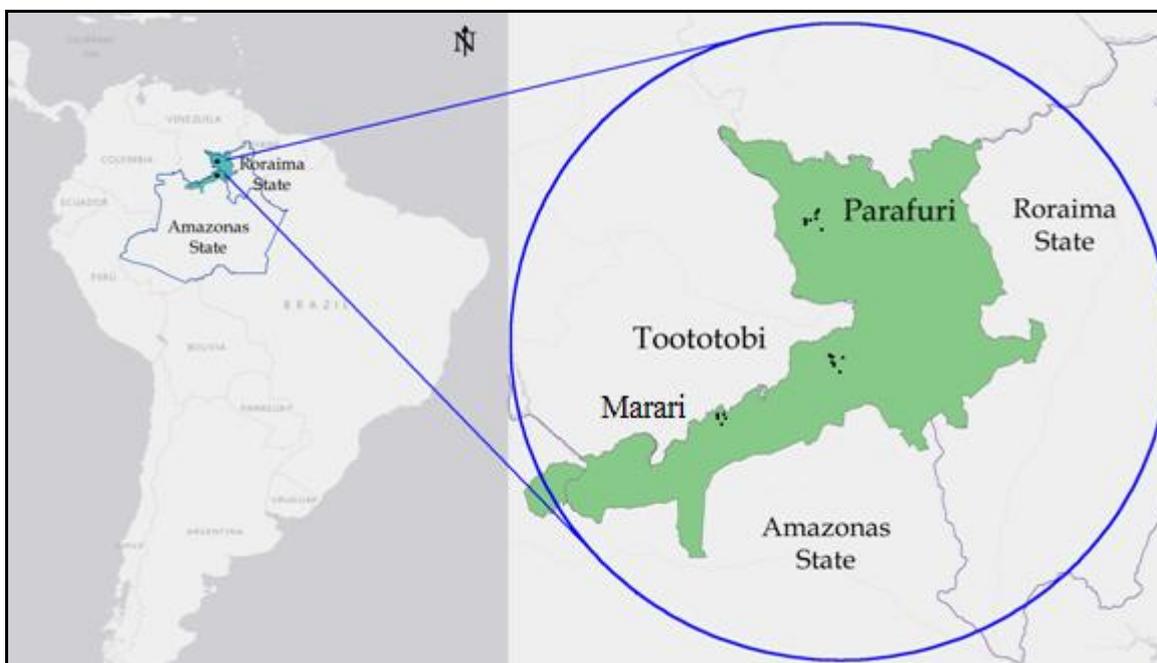


Figura 8. Localização das três áreas de estudo. Os Polos Base de Marari e Toototobi encontram-se ao norte do estado de Amazonas, enquanto o Polo Base de Parafuri está localizado no estado de Roraima, Brasil.

O Polo Base de Toototobi é composto por 741 indígenas distribuídos em 10 comunidades assentadas na área de influência do rio Toototobi e seus tributários. Três destas comunidades, Xiroxixopiu, Xuuhupi e Amahik formam o Subpolo Base de Xiroxirobiu, geograficamente destacado das demais. As sete comunidades restantes são: Koiopi, Apiahik, Kaxitão, Mahaxipoha, Pyau, Raxasi e Wanapiu. Todas as comunidades mantêm relações de parentesco e são muito comuns as visitas entre elas, especialmente entre as que estão mais próximas geograficamente. No Polo Base de Toototobi, incluímos em nosso estudo as comunidades Koiopi (79 pessoas), Apiahik (81), Mahaxipoha (50) e Raxasi (89). Todas as comunidades encontram-se a menos de 125 metros do nível do mar. Apiahik tem um assentamento alternativo na fronteira com a Venezuela, chamada de Sinatra. No ano de 2013 no Toototobi, o 53,3% eram indígenas do gênero masculino. Quanto à distribuição por faixas etárias, a

proporção de menores de 20 anos foi de 56,1%, e a proporção de menores de cinco anos foi de 18,7%. Encontramos a seguinte proporção do sexo masculino nas quatro comunidades estudadas: Apiahik (50,6%), Koiopi (59,5%), Raxasi (58,4%) e Mahaxipoha (58%). Considerando a estratificação populacional por comunidade e faixa etária encontramos: Apiahik (<5= 18,5% e <20=59,3%), Koiopi (<5=16,5% e <20=59,5%), Raxasi (<5=15,7% e <20=53,9%) e Mahaxipoha (<5=14% e <20=48%).

O Polo Base de Parafuri é composto por 427 indígenas distribuídos em seis comunidades: Komomassipe, Warareu, Hoxeana, Paapoko, Makabey e Xaruna. As comunidades incluídas no nosso estudo foram Komomassipe (138 indígenas) e Warareu (64 indígenas) localizadas próximas ao Polo Base, no rio Inajá e Makabey (64 indígenas) e Xaruna (93 indígenas) na beira do rio Parima. Entre as comunidades que se encontram na área de influência do rio Inajá (Komomassipe, Warareu, Paapoko e Hoxeana) existem vínculos que levam a frequentes visitas entre as comunidades. Já no caso das malocas de Makabey e Xaruna, o isolamento é maior e os contatos com outras comunidades do Polo Base Parafuri são esporádicos. As comunidades de Parafuri não têm malocas alternativas, mas podem passar algum tempo (constatamos até dois meses durante nosso estudo) em acampamentos improvisados, ou *tapiris*, no meio da floresta. No Polo base de Parafuri os homens constituíram uma porcentagem menor da população (somente o 48,1%). Constatamos isso em quatro comunidades: Komomassipe (45,7%), Warareu (43,8%), Makabey (51,6%) e Xaruna (38,7%). A população menor de 20 e cinco anos, representaram o 61,7% e 21,6% da população total, respectivamente. Segundo a estratificação populacional por comunidade e faixa etária encontramos: Komomassipe (<5= 26,1% e <20=65,9%), Warareu (<5=29,7% e <20=65,6%), Makabey (<5=21,9% e <20=60,9%) e Xaruna (<5=23,7% e <20=64,3%).

O Polo Base Marari é composto por 915 indígenas que habitam as cinco comunidades: Castanha (237 indígenas), Gasolina (233 indígenas), Taibrapa (234 indígenas), Alapusi (155 indígenas) e Ahima (56 indígenas). No entanto, recentemente, houve uma pequena divisão de uma parte da comunidade de Alapusi para formar uma outra comunidade menor na área da sede do Polo Base (Mababi). A comunidade de Taibrapa possui também uma segunda residência (Taibrapa 2). Este Polo Base caracteriza-se por ter malocas com alta densidade populacional. Todas as comunidades foram incluídas em nosso

estudo. As comunidades do Polo Base Marari têm o costume de passar meses nas malocas alternativas e também fora da área indígena, trabalhando na extração de piaçaba. Além disto, mantém também contato com Yanomami do Polo Base Maraiá, também no estado do Amazonas (principalmente com a comunidade do Kona - a vários dias a pé) e com algumas comunidades da Venezuela. O Polo Base de Marari tem uma proporção de 55,3% de indivíduos do sexo masculino. Já em relação às faixas etárias, confirmamos que a população menor de 20 anos corresponde ao 56,4% do total e os menores de cinco anos o 18,7% do total. Encontramos novamente proporções do sexo masculino maiores nas comunidades do Marari: Alapusi (52,9%), Ahima (55,4%), Castanha (58,2%), Taibrapa (54,7%) e Gasolina (54,7%). Os dados da estratificação populacional por comunidade e faixa etária são os seguintes proporções: Alapusi (<5= 17,4% e <20=54,8%), Ahima (<5=11% e <20=32%), Castanha (<5=18,6% e <20=56,1%), Taibrapa (<5=19,7% e <20=56,4%) e Gasolina (<5=18,6% e <20=57,6%).

Na Tabela 1 detalhamos os tempos e os modos de deslocamento que são utilizados para chegar nas diferentes comunidades. Adicionalmente, na Figura 9 são mostradas a localização das diferentes comunidades dos três Polos Base, em relação à sede de cada Polo Base, ressaltando-se os principais rios de baixa ordem das três regiões.

Tabela 1. Distâncias, modos de deslocamento e tempos das aldeias incluídas no estudo em relação à sede do respectivo Polo Base.

Polo Base/Comunidade	Distância da sede Polo Base (km)	Modo deslocamento/tempo	
		Época seca	Época chuvas
Tootootobi			
Mahaxipoha	14,9	Barco (6 horas) - pé (7 horas)	Barco (4 horas)
Raxasi	5,2	Barco (1 hora) - pé (1:30 horas)	Barco (40 minutos)
Apiahik	6,4	Barco (3 horas) - pé (2:00 horas)	Barco (2 horas)
Koiopi	8,1	pé (1:40 horas do Apiahik)	pé (2 horas do Apiahik)
Parafuri			
Xaruna	7,3	Barco (4 horas)	Barco (4 horas)
Makabey	15,2	Barco (3:45 horas)	Barco (3:45 horas)
Warareu	4,9	Barco (40 min)	Barco (40 min)
Komomassipe	7,4	Barco (1:40 horas)	Barco (1:40 horas)
Marari			
Alapusi	5,3	pé (1:40 horas)	pé (2 horas)
Castanha/Ahima	0	Do lado sede Polo Base	Do lado sede Polo Base
Taibrapa	2,2	pé (20 min)	pé (25 min)
Gasolina	5	pé (1:45 horas)	pé (2:15 horas)
Taibrapa 2	15,9	barco (6 horas do Gasolina)	barco (4 horas do Gasolina)

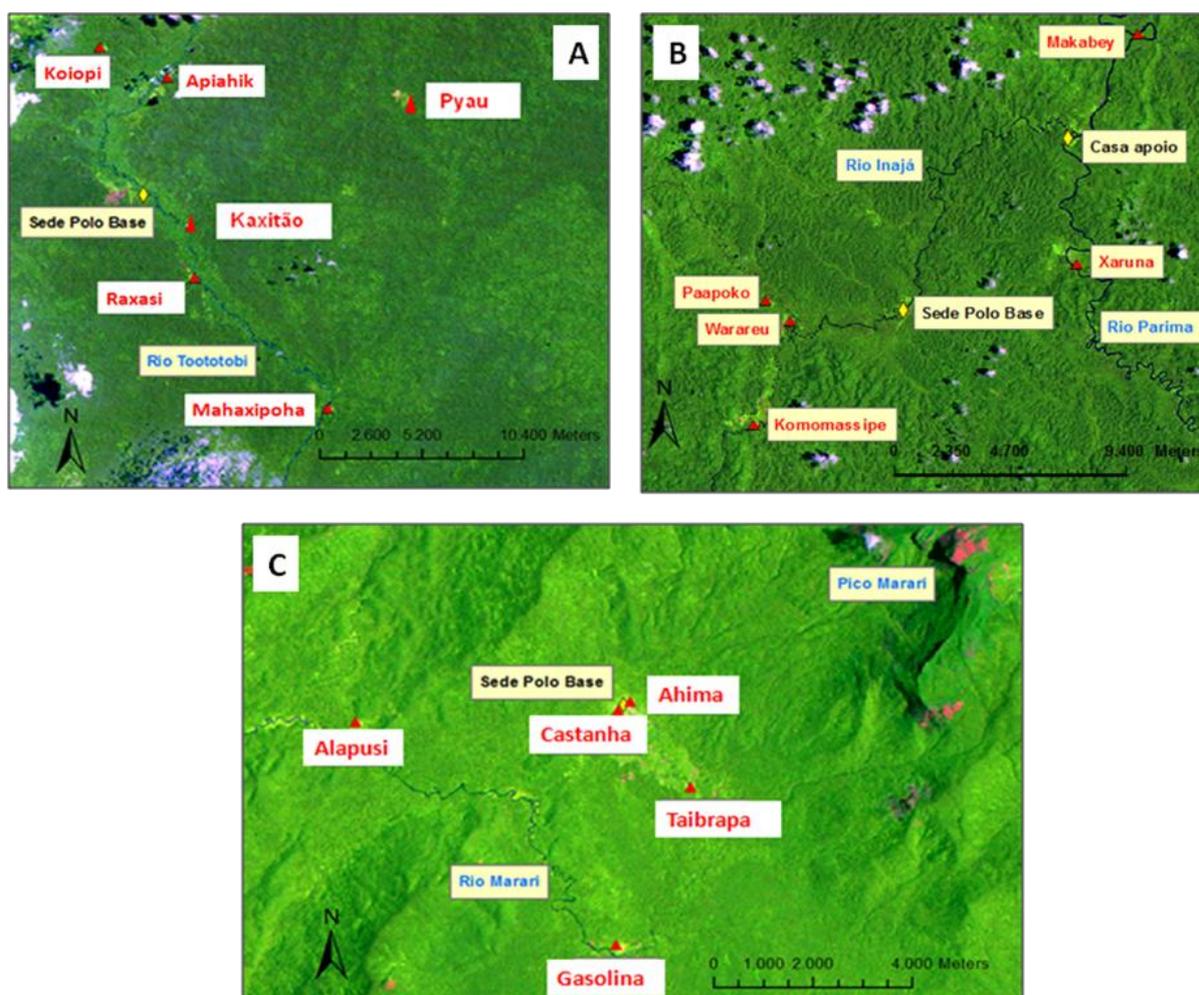


Figura 9. Mapas das três áreas de estudo, ressaltando os principais rios e todas as localidades que conformam os Polos Base. **A** - Toototobi, **B** - Parafuri e **C** - Marari. Nota-se que no caso de Marari, não são mostradas as malocas alternativas do Taibrapa (Taibrapa 2) e do Castanha (Castanha 3), que encontram-se muito distantes descendo pelo rio Marari.

O povo Yanomami constroi e estrutura suas casas grandes coletivas, os *shabonos*, seguindo tipologias diferentes segundo a área geográfica (Fig. 10). As comunidades do Polo Base Toototobi e Marari constroem uma estrutura principal, circular, grande e aberta no meio, feita principalmente de madeira, barro e folhas de palmeira. Nessas construções, as paredes são formadas por barro e varas de madeira, sendo mais compactas e com menos espaços abertos. Na comunidade Koioipi, o *shabono* principal é uma estrutura de 55 metros de diâmetro, circular e aberta centralmente, com um par de casas anexas muito menores. A maioria dos Yanomami desta comunidade moram no interior do *shabono* principal.

No Polo Base Parafuri, as casas são menores e mais espalhadas, normalmente de formato circular, a maioria de padrão fechado, com paredes formadas por troncos de madeira, deixando espaços abertos entre o ambiente intra- e peridomiciliar. Na comunidade de Komomassipe há nove habitações independentes e de formato fechado, cada uma delas habitada por um número reduzido de famílias. Em todos os tipos de construções existem poucos pontos de entrada/saída.





Figura 10. Exemplos dos tipos de *shabono* construídos nas três áreas de estudo. **A** - Toototobi. Comunidade de Mahaxipoha. Os shabonos são construções grandes, de formato circular e contínuas, albergando um grande número de famílias no interior. **B** - Parafuri. Comunidade de komomassipe. Nesta região submontana, as construções dos Yanomami são pequenas e fechadas, onde habitam um número menor de pessoas por unidade habitacional. **C** - Marari. Comunidade de Taibrapa. Igual às comunidades de Toototobi, as comunidades do Marari têm um formato também circular, com uma praça grande central, mas formado por um conjunto de casas ou construções próximas com alguns espaços entre elas. Observa-se o rio de primeira ordem Catanal, passando bem próximo da comunidade, receptivo aos efeitos de pulsos de inundação.

3.3 Características ecológicas da área Yanomami do Brasil.

Os Polos Base de Parafuri, Toototobi e Marari representam diferentes tipos de ecoregiões, com diferentes características geomorfológicas e hidrológicas, que, por sua vez vão influenciar diretamente na dinâmica sazonal dos criadouros e, conseqüentemente, na composição da fauna anofélica e abundância relativa das espécies.

O Polo Base de Parafuri (3.2838N, 63.8506W e 440 metros de altitude) está localizado em uma ecoregião formada principalmente por floresta ombrófila submontana. Esta região caracteriza-se por apresentar um relevo muito irregular, com várias serras menores, que são drenadas por muitos córregos para o rio mais próximo. Existem dois rios principais de baixa ordem em Parafuri, o rio Inajá (de segunda ordem e com uma média de uns 30 metros de largura) e o rio Parima, ainda um rio de baixa ordem (5ª ordem) no ponto

onde estão localizadas as malocas de Makabey e Xaruna, é consideravelmente mais largo que o rio Inajá, com até 90 metros de largura em alguns segmentos.

O Polo Base de Toototobi (1.7652N, 63.6188W e 128 metros de altitude) está localizado a 170 km ao sul de Parafuri, em uma área composta por floresta ombrófila de planície de terras baixas, sem serras, e com elevações menores que 150 metros. Nesta região, o principal rio é o Toototobi, rio de terceira ordem, irrigando as proximidades das comunidades Mahaxipoha, Raxasi, Kaxitão, Apiahik e a sede do Polo Base. Existe um rio menor de segunda ordem que é afluente do rio Toototobi, passando a mais de 1 km da maloca Koiopi, com a origem na área onde encontra-se o Subpolo do Xiroxiobiu.

Foram instaladas estações meteorológicas (Instrutemp^R, estação meteorológica com display touch-screen - TWH1080, São Paulo, SP, Brasil) na sede do Polo Base de Toototobi e Parafuri, pelo período completo em que foram realizadas as coletas (setembro 2012 a julho 2014). No Polo Base Marari, foi operada uma estação meteorológica entre setembro 2014 e março 2015. As estações mediram a temperatura e umidade relativa externas e internas da edificação da sede do Polo Base, a força e direção do vento e a pluviosidade. As informações foram gravadas em uma memória central em intervalos de uma hora, com capacidade de registro de 4.080 entradas. A cada visita bimensal, os dados registrados do período eram transferidos para um laptop, a memória da unidade central liberada e as baterias trocadas. Quando ocorria falha no sistema, os dados de pluviosidade para o Polo Base de Parafuri foram estimados a partir da estação do Polo Base de Surucucu (ANA - Agência Nacional das Águas), a mais próxima (a uns 55 km) e com características ecoregionais semelhantes. Foi calculado um índice mensal entre Parafuri e Surucucu e em seguida a média destes índices. Para os meses que não foram registrados os dados de Parafuri (outubro 2013 a fevereiro 2014), utilizou-se o índice geral para ajustar os dados de pluviosidade de Surucucu, estimando-se os dados perdidos para Parafuri.

3.4 Malária nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari.

Foram compilados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP-Malária) e ajustados por 1.000 habitantes, os dados de

malária nas comunidades onde foram feitas as coletas de anofelinos nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari, no período de 2005 a 2014. Esses dados formam uma série histórica da situação desse agravo nas comunidades estudadas. No Marari, são apresentados apenas os dados de malária entre 2009 e 2014, devido inconsistência sobre a organização das comunidades antes de 2009. Os dados do Taibrapa, Polo Base Marari, foram computados de 2012 a 2014, pois essa comunidade foi criada recentemente (Tabela 2). Nas comunidades de Marari os números de casos de malária registrados correspondem às buscas ativa e passiva sistemática de casos. Entretanto, nas comunidades de Parafuri e Toototobi os números de casos correspondem às buscas ativa e passiva não sistemática de casos e o número total de casos pode não ser real.

Tabela 2. Distribuição anual dos casos de *P. falciparum* e *P. vivax* por comunidade baseado no Índice Parasitário Anual (IPA). Período de 2005 à 2014 para o Toototobi e Parafuri, e no caso do Marari, período de 2009 à 2014. Nota-se que para a comunidade do Taibrapa apresentam-se somente dados de malária de 2012 a 2014. Fonte: SIVEP Malária.

Polo - Comunidade	Ano																				
	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		
	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf	Pv	
TOOTOTOB																					
Mahaxipoha	75	650	0	116,3	25	400	190,5	1000	0	697,7	0	325,6	0	0	0	0	0	0	0	35,7	
Raxasi	31,7	333,3	16,1	371	14,7	88,2	102,9	720,6	14,5	594,2	0	72,5	0	0	0	11,1	0	11,2	0	0	
Apiahik	89,5	149,3	0	214,3	0	13	26,7	546,7	162,5	325	12,3	530,9	0	41,1	63,3	924,1	0	0	0	0	
Koiopi	181,8	333,3	218,8	437,5	0	140,8	67,7	878,4	27,4	137	0	103,9	0	27	0	65,8	0	0	0	0	
PARAFURI																					
Xaruna	0	69	0	51,7	0	0	0	0	0	483,3	0	450	0	88,6	0	0	0	0	0	71,4	
Makabey	0	486,5	0	220	0	0	0	0	0	616,4	0	270,3	18,2	181,8	0	0	0	0	0	0	
Warareu	0	685,7	0	581,4	0	0	0	0	19,2	1307,7	0	250	0	52,6	0	33,3	0	0	0	0	
Komomassipe	0	212,5	0	120,9	0	0	0	10,5	0	1742,6	0	1388,9	0	952,4	0	53,4	0	0	0	0	
MARARI																					
Alapusi	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	42,3	295,8	652,5	1879,4	182,4	364,9	406,5	903,2	354,8	838,7	274	1493,2	
Castanha	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19,3	181,2	804,3	1570,4	218,4	646	127,1	805,1	1050,6	1405,1	184,3	1054,9	
Ahima	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14,9	238,8	740	1900	333,3	686,3	163,6	581,8	339,3	1250	175	750	
Taibrapa	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	79,6	1066,4	277,8	1042,7	431,8	1075,8
Gasolina	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16,2	773	912,2	1534,6	238,3	981,3	287,6	553,1	186,4	1067,8	345,7	1135,8	
NA - Dados não compilados																					
SD - Sem dados																					

Analisando os dados do SIVEP-Malária ao longo dos últimos 10 anos observamos algumas diferenças com relação à espécie plasmodial mais abundante nos três Polos Base. No Polo Base do Toototobi foram diagnosticados 690 casos de malária entre 2005 e 2014, sendo 619 devidos ao

P. vivax (89,7%) e 71 ao *P. falciparum* (10,3%). A transmissão de *P. falciparum* foi constatada nas quatro comunidades de Toototobi sob estudo, mas de forma intermitente. No ano de 2008 houve os maiores IPA para *P. vivax* nas comunidades de Mahaxipoha (1.000), Raxasi (720,6) e Koiopi (878,4). No entanto, o período de transmissão mais intenso no Apiahik foi em 2012 (IPA= 924,1 de *P. vivax*).

No Parafuri, dos 798 casos de malária diagnosticados entre 2005 e 2014 nas quatro comunidades estudadas, somente dois (0,25%) corresponderam ao *P. falciparum*, um na comunidade de Warareu em 2009 e um na comunidade de Makabey em 2011. O demais foram casos de *P. vivax*. Cabe destacar que neste Polo Base não foram diagnosticados casos de malária por gota espessa em 2007 e quase todo 2008. Outro período onde não foram reportados casos de malária no Parafuri foi da metade de 2012 até o início de 2015, com a única exceção de quatro casos de *P. vivax* diagnosticados na comunidade de Xaruna em 2013. Em 2010 foi registrado um IPA na comunidade de Komomassipe de 1.742,6 casos de *P. vivax* por cada mil habitantes, ou seja, de média uma pessoa teria 1,7 episódios de malária ao ano. No mesmo ano os IPA para *P. vivax* foram de 1.307,7, 616,4 e 483,3 casos por 1.000 habitantes no Warareu, Makabey e Xaruna respectivamente.

No Polo Base de Marari foram registrados no total 9.104 casos de malária entre 2009 e 2014, sendo 6.683 (73,4%) de *P. vivax* e 2.421 (26,6%) de *P. falciparum*. Embora o *P. vivax* também predominou nas comunidades do Marari, vimos umas proporções de *P. falciparum* mais elevadas comparados com os Polos Base do Toototobi e Parafuri e até, com a média do DSEI-Y. Em alguns períodos concretos, esta proporção de casos por *P. falciparum* foi ainda mais elevada, como em 2010 na comunidade do Gasolina, onde o *P. falciparum* foi responsável por 36,9% dos casos de malária. O período de maior transmissão no Polo Base foi em 2010, quando foram registrados os seguintes IPA para *P. vivax* e *P. falciparum*; Gasolina (Pv=1.534,6, Pf=912,4), Alapusi (Pv=1.879,4), Pf=652,5), Ahima (Pv=1.900, Pf=740) e Castanha (Pv=1.570,4, Pf=804,3).

Na tabela 3 apresentamos os dados de malária ajustados por 1.000 habitantes por sexo e faixa etária por cada uma das comunidades estudadas. Os anos utilizados para compilar estes dados foram os mesmos que os descritos para a Tabela 2.

Tabela 3. Distribuição dos casos de malária por sexo e faixa etária ajustados por cada 1.000 habitantes nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari. Toototobi e Parafuri dados de 2005-2014, Marari de 2009-2014, comunidade do Taibrapa 2011-2014. Fonte: SIVEP Malária.

Polo - Comunidade	Sexo		Faixa etária					
	Masculino	Femenino	0 - 4	5 - 9	10 - 19	20 - 39	>40	
TOOTOTOBÍ								
Mahaxipoha	415,7	291,3	767,4	453,6	475,3	190,7	162,5	
Raxasi	253,7	216,7	412,1	429,3	291,4	106	91	
Apiahik	313,4	305,9	457,1	588,7	397,2	101,1	72,9	
Koiopi	263,4	260,4	346	565	285,6	135,8	104,7	
PARAFURI								
Xaruna	119,7	124,7	280,6	157,4	153,4	41,1	28,2	
Makabey	232,4	123,8	576,7	334,5	131,4	35,6	6,7	
Warareu	339,8	252,2	439,1	533,9	239,7	175,8	96,4	
Komomassipe	376,5	518,8	558,8	590,6	462,5	292,8	302,1	
MARARI								
Alapusi	1209,6	1212,5	2191,2	2687,2	1214,5	427,2	408,5	
Castanha	1240,7	1244,1	2207,3	2358,6	1299	397,9	313,4	
Ahima	1204,9	1205,3	2143,3	2186,6	1335,1	316,4	320	
Taibrapa	1367,4	1290,5	2651,4	2637,8	1393,9	320,9	125,4	
Gasolina	1400	1364,3	2772,4	2822,3	1100,3	414,5	294	

3.5 Coletas de anofelinos.

Os Polos Bases de Toototobi e Parafuri foram incluídos como áreas de estudo desde o início do projeto, devido ao histórico de transmissão de malária e oncocercose, as duas endemias abordadas no projeto principal aprovado pela Secretaria Especial da Saúde Indígena (SESAI). Portanto, as nossas viagens de campo para as coletas de anofelinos foram integradas com as do grupo das coletas de simúlideos em Toototobi e Parafuri. Posteriormente, foi incluída uma terceira área de estudo, o Polo Base Marari, por apresentar o maior número de casos de malária de todo o DSEI-Y, por vários anos. Para o estudo longitudinal de Parafuri e Toototobi, foram realizadas nove viagens de campo de setembro de 2012 até julho de 2014, com expedições a cada dois meses, cobrindo os cinco períodos no ano (época de chuvas, transição chuvas-seca, primeira e segunda metade da seca e transição seca-chuvas). Os meses de coleta para o Toototobi foram setembro 2012, janeiro/fevereiro 2013, abril 2013, junho/julho 2013, setembro 2013, novembro 2013, janeiro/fevereiro 2014,

abril 2014 e junho/julho 2014. Já para o Polo Base Parafuri as coletas aconteceram em setembro/outubro 2012, fevereiro 2013, abril/maio 2013, julho 2013, setembro/outubro 2013, novembro/dezembro 2013, fevereiro 2014, abril/maio 2014 e julho 2014.

Em Marari, foram feitas duas expedições piloto em 2013, nos meses de março (fim da época seca) e agosto (fim da época das chuvas). Posteriormente, desenhamos um estudo neste Polo Base focado na época seca de 2014 e 2015. Foram realizadas quatro expedições a cada dois meses, de setembro de 2014 (início da época seca) até março de 2015 (fim da época seca). As coletas foram feitas em todas as comunidades deste Polo Base.

Em cada Polo Base, cada expedição teve duração de 15 dias. No caso do Toototobi e Parafuri, foram feitas nove coletas de três dias consecutivos em cada uma das comunidades e três noites intercaladas na sede do Polo Base. Em geral, o cronograma diário de trabalho foi o seguinte: das 7 h às 13 h, foram realizadas as coletas de formas imaturas; de 14 h as 18 h, foi processado o material dos anofelinos adultos coletados na noite anterior, e quando oportuno, coletas adicionais de larvas foram realizadas à tarde; a partir das 18 h, foram realizadas as coletas diárias de anofelinos adultos. Essas coletas eram feitas das 18 h às 22 h ou de 18 h às 6 h (12 horas). Todas as lideranças das comunidades concordaram e autorizaram as coletas e a permanência da nossa equipe na área durante o período de estudo.

O presente trabalho teve a aprovação de: Comitê de Ética em Pesquisa - CEP Fiocruz e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP.

3.6 Coleta de formas adultas de anofelinos: Atração humana protegida - AHP, armadilhas luminosas CDC e aspirador manual intradomiciliar.

Foram utilizados diferentes tipos de armadilhas para a coleta de formas adultas: Armadilhas luminosas tipo CDC, tanto de luz incandescente quanto UV; armadilha baseada no conceito de "atração humana protegida" (AHP) e aspirador manual (Aspirador de Nasci).

Nos Polos Base de Parafuri e Toototobi, as coletas com Atração Humana Protegida foram realizadas simultaneamente em três ambientes distintos: intra-, peri- e extradomiciliar, e por três dias consecutivos em cada comunidade.

Normalmente, no primeiro e no terceiro dia, as coletas foram realizadas no período de 18 h às 22 h, nos três ambientes. Enquanto que no segundo dia era realizada uma coleta de 12 h (das 18 h às 6 h) no peridomicílio. Este cronograma de coletas foi seguido e mantido pelos dois anos consecutivos nesses dois Polos Base.

No Polo Base de Marari foi feita uma modificação desse cronograma de trabalho. O esquema de coletas corresponderam a quatro dias de capturas por campanha nas comunidades de Castanha-Ahima, Taibrapa e Gasolina, e de três dias na comunidade do Alapusi. Eram feitas duas coletas de 12 h (18 h as 6 h): normalmente uma no primeiro dia, no peridomicílio, e outra no terceiro dia, no extradomicílio. No caso das comunidades do Marari com quatro dias de coletas, foram realizadas duas coletas simultâneas no peri- e extradomicílio, de 18 h às 22 h, e no intradomicílio, de 20 h – 00 h. Esta variação para a área de Marari foi motivada pelos resultados preliminares das duas missões piloto nesta área do ano 2013 e pelos dados de coletas de *An. darlingi* no Komomassipe, que revelaram uma atividade mais tardia desta espécie.

As coletas com armadilhas CDC foram realizadas também nos ambientes intra-, peri- e extradomiciliares. Seis armadilhas foram instaladas durante o período de 18 h às 6 h: uma no intradomicílio (dentro do *shabono*), uma no peridomicílio (na parte externa, porém junto ao *shabono*) e quatro no extradomicílio, distribuídas a cada 50 m em direção ao criadouro produtivo mais próximo da habitação indígena, formando um transecto. O principal intuito do uso destas armadilhas foi a de complementar as coletas de alados utilizando a AHP e ampliar a informação sobre a frequência espacial das diferentes espécies. Nem sempre foi possível manter em funcionamento as armadilhas CDC, pela dificuldade de se carregarem as baterias, devido à irregularidade da disponibilidade de energia elétrica na sede dos Polos Base. Nessas situações, uma placa solar foi a única fonte de carga, mas com eficiência diminuída nos períodos de chuvas, além de não conseguir manter a carga das seis baterias (Unipower 6V 12A) em várias ocasiões. Por este motivo, os dados obtidos a partir de armadilhas CDC não foram adicionados às análises de sazonalidade, já que o esforço de coleta não foi homogêneo ao longo das missões de campo. Entretanto, o material obtido aumentou o número de exemplares coletados e a possibilidade de se ter mais registros de ocorrência de espécies em cada uma das localidades. Sua operação ainda

aumentou a possibilidade de coletar anofelinos possivelmente infectados e obter espécimes machos para exame da genitália para análise morfológica.

Finalmente, foram realizadas coletas de alados em repouso dentro das malocas, utilizando-se um Aspirador de Nasci alimentado por uma bateria de 12V 12A (Aspirador manual grande, Horst Armadilhas^R, São Paulo, SP, Brasil). As coletas por esse método foram realizadas às 22 h (00 h no caso do Marari), durante 30 minutos, no interior da habitação onde estava sendo feita a coleta intradomiciliar com AHP. Foram amostradas tanto as paredes principais da maloca até uns 2,5 metros de altura e vários objetos como cestos de palha penduradas, roupas e arcos e flechas colocados nas paredes.

Para todos os tipos de coleta, foi preenchida uma “ficha de campo”, individual por ambiente, contendo os seguintes dados: número da coleta, local, data, horário, tipo de coleta (intra-, peri- ou extradomicílio) e coletor, além de dados abióticos (temperatura, umidade relativa do ar, chuvas, ventos) (Anexo 1). Esses dados ambientais eram obtidos a partir de termo-higrômetros (Termo-higrômetro digital, Incoterm, São Paulo, SP, Brasil), utilizados em todos os pontos de coleta. Os dados eram aferidos a cada hora, durante as coletas. Em cada coleta, os mosquitos eram coletados com capturador de Castro, acondicionados em gaiolas cilíndricas (15 cm) de plástico, com uma tampa de rosca larga e telada. Essas gaiolas recebiam uma etiqueta de identificação com o número da ficha de campo correspondente, data, local, horário de coleta e nome do coletor. A cada hora durante as coletas a gaiola era trocada e os dados abióticos anotados. Após cada coleta, as gaiolas eram colocadas dentro de um saco plástico contendo um chumaço de algodão embebido em éter, para que os mosquitos fossem mortos. Alternativamente, as gaiolas eram deixadas nesse mesmo tipo de saco sem éter e, no dia seguinte os sacos eram pendurados em uma área exposta ao sol, para que os mosquitos morressem.

Assim que os mosquitos morriam eram triados, acondicionados individualmente em microtubos plásticos, com um orifício na tampa, do tipo usado para técnica molecular (PCR). Esses microtubos eram acondicionados em pequenos sacos de papel identificados por comunidade, tipo, data e horário de coleta, sendo armazenados logo após em caixas plásticas retangulares contendo sílica (Sílica Gel B. Herzog) e hermeticamente fechadas, para serem transportados ao laboratório (Fiocruz/IOC), onde eram identificados morfológicamente, com o uso de chaves dicotômicas. Tanto os mosquitos

coletados pelas armadilhas CDC quanto pelo Aspirador de Nasci eram mortos e acondicionados da mesma forma que aqueles coletados em AHP.

Alguns dos mosquitos coletados foram mantidos vivos com alimentação açucarada, na própria gaiola, até o dia seguinte da coleta, para a dissecação do ovário pela técnica de Detinova, com o objetivo de avaliar a paridade das fêmeas. Uma parte dos mosquitos (10%) foi também separada para confirmação molecular das espécies pertencentes a complexo de espécies crípticas, utilizando-se sequenciamento da região *barcoding* do gene Citocromo Oxidase subunidade I.

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

Uma pequena parte das fêmeas de *An. darlingi* (77 no Parafuri) e *An. oswaldoi* s.l. (88 combinando o Parafuri e Toototobi) coletadas com AHP, tiveram seus ovários dissecados para determinação da paridade, pela técnica de Detinova [153]. Escolhemos realizar este teste somente nas principais espécies vetores e encontradas com maior densidade nas áreas. Nesses casos, os mosquitos de coletas da noite anterior foram mantidos vivos com água açucarada e, na manhã seguinte, foram mortos individualmente utilizando-se um morteiro entomológico com o fundo impregnado de éter. As fêmeas foram posicionadas ventralmente em uma lâmina de vidro, onde os últimos segmentos abdominais e os ovários eram tracionados, com o auxílio de um estilete, em direção a uma gota de salina. Logo após, esse material foi coberto com lamínula e examinado ao microscópio x40 para observação do sistema traqueolar, permitindo a clara visualização das traquéias. Para realizar a dissecação dos ovários, o material não pode estar seco e portanto, os espécimes devem ser mortos ou adormecidos logo antes do procedimento. Não obstante, não foi possível realizar avaliação de paridade das fêmeas de forma sistemática e de grande número de indivíduos por dois motivos: indisponibilidade de um microscópio com qualidade suficiente e, principalmente, a falta de tempo nas campanhas onde o número de criadouros demandava uma dedicação quase exclusiva à amostragem de larvas para cumprir com nosso cronograma.

3.8 Identificação morfológica das espécies de anofelinos.

As fêmeas coletadas eram transportadas para o laboratório e identificadas com uso de estereomicroscópio (Stemi 2000 Zeiss), pela observação de seus caracteres morfológicos externos, utilizando-se chaves dicotômicas específicas para o grupo [7, 89]. Com o objetivo de complementar ou esclarecer dúvidas sobre a morfologia de membros pertencentes a complexo de espécies crípticas, foram realizadas montagem e identificação morfológica da genitália masculina. Os machos usados para esse fim foram obtidos através da criação de larvas coletadas nos criadouros mapeados nas áreas estudadas ou coletados em armadilha CDC. As genitálias foram montadas entre lâmina e lamínula e observadas ao microscópio para a identificação utilizando-se as descrições das espécies e chaves dicotômicas específicas [112].

3.9 Confirmação de espécies de anofelinos através da análise de sequências da região *barcoding* do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI PCR).

Dentre os 4.319 anofelinos coletados no Toototobi e Parafuri, alguns dos espécimes danificados ou aquelas pertencentes a complexos de espécies foram escolhidas para realizar diagnóstico molecular. Um total de 483 mosquitos, representando cerca de 10% do total coletado foram assim avaliados. Também foram incluídos alguns poucos exemplares do Polo Base de Marari, os quais ainda deverão ser processados no futuro.

3.9.1 Extração de DNA mitocondrial - Técnica Chelex 100.

Foram utilizadas as pernas médias ou anteriores para a extração do DNA, preservando-se a cabeça e tórax para análise de infectividade por plasmódios. O material foi macerado, com pistilos autoclavados, em microtubos tipo Eppendorf (1,5 ml) contendo 10 µl de NaCl 0,9%, sendo adicionados 10 µl de Chelex 100 (5%) ao microtubo. A amostra foi homogeneizada no vórtex e incubada a 100 °C por 10 min (banho seco Eppendorf, modelo Thermomixer

Comfort). Foi, em seguida, centrifugada (Centrífuga Thermo Scientific, modelo Fresco 17) a 13.000 rpm (5 min) à temperatura ambiente. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante transferido a outro tubo para ser utilizado posteriormente na reação de amplificação por PCR. Neste ponto, as amostras podem ser guardadas no freezer por alguns dias.

3.9.2 Amplificação por PCR convencional para o gene COI e purificação por PEG.

Para a amplificação da região *barcode* do gene COI, foram utilizados os pares de primers universais: LCO1490 (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') e HCO2198 (5' TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3') (Integrated DNA Technologies). O volume final para cada reação de PCR foi de 25 µl, sendo: 2,5 µl de tampão 1x (Invitrogen Brasil, São Paulo), 0,75 µl de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen Brasil, São Paulo), 0,5 µl dNTP (10mM), 0,25 µl (10 µM) de cada um dos iniciadores universais (LCO e HCO), 0,125 µl de *Taq* Polymerase (5U/µl) (Invitrogen Brasil, São Paulo), 18,625 de H₂O ultrapura I e finalmente, 2 µl de do produto de extração de DNA de cada amostra.

As condições da reação de PCR (Termociclador Eppendorf, modelo Martercycler egradient) foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos com as seguintes características: 94 °C por um min, 1 min para pareamento dos oligonucleotídeos a 55 °C e 1 minuto para a extensão da molécula de DNA a 72 °C. Extensão final de 7 minutos a 72 °C. Após a amplificação, as reações foram armazenadas a -20 °C.

Com o objetivo de verificar as condições da amplificação do produto da PCR, 1 µl desse material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. A fim de registrar o tamanho do fragmento amplificado e as condições da PCR, o gel foi fotografado em Sistema de imagem MultiDoc-it (UVP).

Posteriormente, procedeu-se à purificação do produto de amplificação da PCR por PEG (20% *Polyethylene Glycol* - PEG - 8000 2,5 M Na Cl), o que facilita a eliminação de dímeros de iniciadores formados na reação da PCR e também concentra o produto da PCR (de 20 µl iniciais para 10 µl depois da purificação por PEG). Inicialmente, foi adicionado o mesmo volume (20 µl) de PEG ao volume que tinha-se obtida da extração de DNA (20 µl). O produto (40

µl) foi misturado rapidamente por vórtex e incubado a 37 °C por 15 minutos. Centrifugou-se à 13.200 rpm por 15 minutos e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante (centrífuga modelo 5415R Eppendorf). O precipitado transparente resultante foi lavado com 200 µl de etanol 80%, invertendo-se o tubo várias vezes. Se fosse necessário, neste ponto, as amostras poderiam ser guardadas no freezer. Uma vez homogeneizado, o material foi novamente centrifugado à 13.200 rpm por 15 minutos a 4 °C. O etanol foi removido invertendo-se o tubo, e foi feita outra lavagem da amostra com etanol etílico 80%, seguindo-se os mesmos passos acabados de descrever acima. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco no equipamento (concentrador Plus-Eppendorf) com a tampa do tubo Eppendorf aberta, por 10 minutos a 60 °C. O DNA foi ressuspendido com 10 µl de água ultrapura I e homogeneizado no vortex. Depois deste processo de purificação, 1 µl da amostra foi processado em um gel de agarose 1%, para se verificar que não houve perda de DNA ao longo do processo de purificação por PEG.

3.9.3 Sequenciamento e purificação por Sephadex.

Foram realizadas as reações de sequenciamento da fita F da região *barcode* do gene COI utilizando-se o kit de BigDye[®] Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). Os iniciadores para a reação de sequenciamento foram os mesmos que utilizados na reação de PCR anterior. Para cada reação de sequenciamento, obteve-se um volume final de 10 µL; com 2 µL de tampão 5x sequencing (Applied Biosystems[™]), 1 µL (3,6 pmol) do iniciadores F ou R, 0,5 de Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems[™]), 4,5 µl de água ultrapura e 2 µl de DNA (40-50 ng de DNA). As condições da reação de sequenciamento consistiram de 25 ciclos com as seguintes características: 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Antes do envio de cada amostra para sequenciamento, estas foram purificadas por Sephadex, processo que auxilia na eliminação das bases marcadas que não foram incorporadas na reação de sequenciamento. Depois da reação de sequenciamento, as amostras foram cuidadosamente protegidas da luz para evitar a degradação do produto. A solução Sephadex (Sephadex G50 columns, GE Healthcare) deve ser guardada na geladeira até o uso uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, colocam-se 700 ml de resina Sephadex

nas colunas com filtro adequadas, sempre evitando a formação de bolhas. Centrifugou-se a 3.000 rpm, por 2 minutos. Com a Sephadex solidificada dentro da coluna, foram aplicadas as amostras do sequenciamento (os 10 µl), colocando-se o produto na parte central da resina e evitando-se que líquido caia pelas laterais do tubo sem passar através da membrana. Foi realizada uma nova centrifugação a 3.000 rpm, por 2 minutos e o produto filtrado foi secado no concentrador (Eppendorf, modelo 5301) a 60 °C, por 10 minutos, ficando o DNA aderido no fundo do tubo. Os tubos Eppendorf com o produto de sequenciamento purificado foram armazenados em papel de filtro para proteger da luz e, em seguida mandados para sequenciar pelo método Sanger (Applied Biosystems 3130 DNA Analyser - PE Applied Biosystems). As colunas utilizadas para a purificação por Sephadex foram lavadas profusamente com água corrente e com água destilada, sendo esquentadas em micro-ondas à energia média por 1 minuto.

3.9.4 Análise das sequências no BLAST e confirmação molecular.

As sequências foram editadas com o programa livre BioEdit, versão 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). As partes pouco definidas da sequência do início e do final foram normalmente deletadas e, no caso de se encontrar base desconhecida no meio da sequências, estas foram editadas segundo o cromatograma. Em alguns casos abundaram picos duplos ou sequências que foram impossíveis de editar. Essas amostras foram repetidas e, se o resultado foi o mesmo, foi considerada uma amostra que foi contaminada e retirada dos posteriores análises.

Posteriormente, utilizamos a ferramenta BLAST - "nucleotid BLAST" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparação das nossas sequências obtidas com as publicadas livremente no servidor, assim como para verificar que não tinha acontecido nenhum evento de contaminação. Na maioria de casos, o produto de PCR foi sujeito só a sequenciamento unidirecional (fita F). Só com a fita F, já obtimos valores de concordância no BLAST de mais do 98%, linha de corte que estabelecemos para a confirmação molecular a nível de espécie e, portanto, nesses casos achou-se desnecessário os sequenciamento com a fita R.

3.10 Avaliação da infecção dos anofelinos pelo plasmódios.

3.10.1 Acondicionamento dos anofelinos no campo e preparação do material.

Dos anofelinos que tínhamos guardado em caixas estancas com sílica gel à temperatura ambiente, alguns foram testados até dois anos e meio após a coleta no campo. A cabeça e tórax de cada mosquito, já identificado, foi separada do abdômen no ponto de união entre eles com o auxílio de pinça e um estilete entomológico. As asas e pernas foram conservadas para serem utilizadas para confirmar as identificações morfológicas por testes moleculares. A separação da cabeça e tórax do abdome é fundamental para não incluir como positivos anofelinos que apresentem somente oocistos no intestino, já que o mosquito só consegue ser transmissor quando os esporozoítos já chegaram às glândulas salivares.

3.10.2 Extração de DNA genômico.

A cabeça e tórax foram transferidos para tubo de 1,5 ml, tipo Eppendorf contendo 180 µl de PBS (Gibco®), e macerados manualmente por aproximadamente 1 minuto com pistilo de vidro lavados e esfregados com lenço impregnado com álcool. Utilizamos o DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) para a extração de DNA genômico. Acrescentaram-se ao macerado 20 µl de proteinase K (>600 mAU/ml), 200 µl do Buffer BA, com homogeneização por 30 segundos no vórtex, sendo posteriormente, incubados a 56 °C por 10 minutos no Banho Maria (Fisher Scientific modelo Isotemp 202S). Após incubação, foram adicionados 200 µl de etanol 99%, sendo os tubos novamente homogeneizados no vórtex e colocados em colunas agregadas a tubos de coleta de 2 ml do kit. As colunas foram centrifugadas a 8.000 rpm (6.000 g), por 1 min, à temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf, modelo 5417R) sendo posteriormente descartados os tubos contendo filtrados. Novos tubos foram acoplados às colunas, seguindo-se adição de 500 µl de tampão AW1 do kit de extração, para lavagem do DNA,

com centrifugação a 8.000 rpm (6.000 g) por 1 minuto a temperatura ambiente. Foram adicionados 500 µl do Tampão AW2 para a segunda lavagem do material com centrifugação a 14.000 rpm, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Finalmente o DNA foi eluído com 200 µl de água estéril WIFI e em seguida o DNA foi purificado com o intuito de remover os inibidores que possam afetar as reações de PCR.

As amostras de DNA foram purificadas utilizando-se o kit de StrataPrep (Agilent Technologies StrataPrep PCR purification kit). Nas amostras de DNA extraídas, foram adicionados 200 µl da solução de ligação de DNA e após homogeneização foram colocados na coluna. Após centrifugação por 30 s, a 14.000 rpm, a coluna foi lavada com 750 µl de tampão 1X buffer (40 ml de 100% etanol adicionado ao tampão 5x do kit StrataPrep) e novamente centrifugada por 30 s a 14.000 rpm. A última centrifugação foi feita por 30 s, a 14.000 rpm, sem adicionar mais soluções para remover toda a solução de lavagem. O DNA da coluna foi recuperado pela adição de 50 µl de água estéril deionizada WIFI e após repouso por 5 minutos a coluna foi centrifugada por 30 segundos, a 14.000 rpm.

Depois da purificação por StrataPrep, o DNA das amostras foi concentrado utilizando-se o concentrador (Eppendorf, modelo Vacufuge), secando de 50 µl de produto de extração de DNA inicial, até 10 µl de produto final (x5). O produto purificado foi guardado a -8°C graus durante o uso para as análises por PCR, e posteriormente, armazenados no freezer a -40°C.

3.10.3 PET-PCR para avaliação da infectividade dos anofelinos.

Para detecção de *Plasmodium* no anofelino, utilizamos a técnica de PET-PCR, desenvolvida recentemente por Lucchi et al. [154]. Esta técnica foi desenvolvida para o diagnóstico da malária humana em amostras de sangue coletadas em papel de filtro e tem a capacidade de detectar parasitemias de até 3,2 parasitas por µl de sangue em amostras de papel de filtro. Ela foi aqui adaptada neste estudo para a detecção de *Plasmodium* no anofelino. Na técnica de PET-PCR, a extremidade 5' de um dos iniciadores é modificado pela adição de uma cauda do oligonucleotídeo de 17 bases marcado com um fluoróforo em sua extremidade 5'. Na ausência de amplificação, esta cauda

forma um laço permanecendo em uma conformação fechada, resultando em uma supressão da fluorescência devido à proximidade das bases de G-4 e a transferência de elétrons fotoinduzida (PET). Quando há a amplificação de ácidos nucleicos, a estrutura do tronco do laço do iniciador PET se abre aumentando a fluorescência devido ao efeito da supressão dos dois resíduos de guanosina localizados na posição de saliência e também da formação da cadeia de DNA complementar.

A confecção dos iniciadores do PET-PCR segue os mesmos princípios básicos dos iniciadores para as PCR convencionais. Os iniciadores específicos de gênero de *Plasmodium* foram desenhados para amplificar o gene que codifica pelo 18S RNA ribossomal de plasmódio, uma região que é conservada para todas as espécies de plasmódio que infetam o homem. Para o *P. falciparum*, o alvo para amplificação específica para esta espécie foi o gene Pfr364. No caso do gênero, os iniciadores foram modificados e marcados com o fluoróforo FAM e para os iniciadores específicos para *P. falciparum*, foi adicionado o marcador molecular HEX.

Os anofelinos foram testados de forma individual e as reações de PET-PCR foram realizadas na presença de controles positivos (amostras humanas Pf 3D7, Pv Thai 3, and Pm China 1) e negativos (*Master Mix* sem DNA). Os volumes e concentrações dos reagentes, bem como as condições de amplificação da PET-PCR de gênero *Plasmodium* (iniciador direto: GGCCTAACATGGCTATGACG; iniciador inverso: FAM-aggcgcatagcgcctggCTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCT) e de *P. falciparum* (iniciador direto: ACCCCTCGCCTGGTGTTTTT e iniciador inverso: Hex-aggcgcatagcgcctggTCGGGCCCAAAAATAGGAA) foram as mesmas para as duas reações. Cada reação teve um volume final de 20 µl, dos quais 10 µl foram do tampão 2X ABI Taqman buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,5 µl (10 µM) de cada iniciador, 7 µl de H₂O estéril WIFI e 2 µl do produto da extração de DNA (amostras e controles positivos). Foram preparadas bandejas com 92 amostras, mais os três controles positivos e um negativo. As amplificações foram realizadas em termociclador (Agilent technologies, Agilent MX3005P QPCR Systems, Santa Clara, USA). As condições da reação de PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95 °C, por 10 minutos, seguida por amplificação com 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos e 60°C, por 40 s. Os dados foram analisados no Software informático

(MxPro QPCR software) e um valor limite de ciclos térmicos (CT) de 40,5 foi usado para indicar um resultado positivo. Todas as amostras positivas e as amostras no limite de positividade (com CT entre 40,5 e 45) foram testadas por Nested-PCR para confirmação de positividade e confirmação de espécies.

3.10.4 Nested-PCR para confirmação da infectividade e das espécies plasmodiais.

As amostras foram submetidas também a uma Nested-PCR que consta de duas reações de amplificação. Na primeira reação, utilizaram-se os iniciadores gênero específico (referente ao *Plasmodium*) e, posteriormente, os pares de iniciadores para as reações espécie-específicas (referentes *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*). Foram incluídos os mesmos controles positivos e negativos que foram utilizados para a PET-PCR.

Os pares de iniciadores para amplificação na PCR 1 (gênero) foram: rPLU5 (5' CCTGTTGTTGCCTTAACTTC 3') e rPLU6 (5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'). Para o *P. falciparum*, rFAL-1 (5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3') e rFAL-2 (5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3'). Para o *P. vivax* rVIV1 (5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3') e rVIV2 (5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3'). Finalmente, para o *P. malariae* rMAL1 (5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC 3') e rMAL2 (5' AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3').

As condições de volume e concentração dos reagentes utilizados foram: 1 µl de cada iniciador (rPLU5-rPLU6 ambos a 15µM), 2 µl 10x tampão (com 15nM de MgCl₂), 2 µl de DNTPs (2nM), 11,8 µl de água estéril WIFI, 0,2 µl de polimerase de Alta fidelidade (Roche®, 3,5U/µl) e 2 µl do produto da extração de DNA da PCR.

As condições de amplificação para a primeira reação (PCR1) consistiram em desnaturação e extensão inicial a 94°C, por 5 min, 95°C, por 30 segundos, 53°C por 30 segundos seguida por amplificação com 30 ciclos e 68°C, por 1,5 minutos, e uma extensão final a 68°C, por 5 minutos. As condições de amplificação para a segunda reação (PCR 2) foram: desnaturação e extensão inicial a 94 °C, por 5 min, 95 °C por 30 segundos, 53

°C por 30 segundos seguida por amplificação com 30 ciclos e 68 °C, por 1 minuto e uma extensão final a 68 °C, por 5 minutos. Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo esta dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato 1mMEDTA) com adição de 10 mg/ml de brometo de etídio. As amostras foram misturadas em *loading buffer* e a corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal a 110V por aproximadamente 1 hora e meia. O gel foi posteriormente analisado em transiluminador ultravioleta e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital.

Os fragmentos correspondentes as espécies plasmódios foram: *P. falciparum* (205 pares de bases-pb), *P. vivax* (120 pb) e *P. malariae* (144 pb). Para as duas reações de PCR o volume final por individuo foi de 20 µl.

3.11 Coleta de larvas de anofelinos em criadouros naturais.

Seguimos em cada uma das comunidades o mesmo fluxo de trabalho para as coletas de larva. Normalmente, foram investidos dois dias, de 7 às 13 horas, para cobrir a amostragem de todos os criadouros por comunidade. No caso de locais com maior abundância de criadouros (ex: Apiahik, no Toototobi, e Warareu, no Parafuri) ou em épocas do ano com maior disponibilidade destes, expandimos as coletas de larvas pelas tardes, ou incluímos uma porção de um terceiro dia (dia de deslocamento para outra comunidade) para finalizarmos as coletas larvares. Para a amostragem, foi utilizada a concha padrão de 350 ml e 13 cm de diâmetro (BioQuip, Ranch Dominguez, CA, USA). As larvas foram transferidas a tubos de plástico pequenos no próprio local de coleta. Depois das coletas no campo, realizamos uma triagem do material utilizando placas de Petri e álcool. Posteriormente transferimos os espécimes a tubos de plástico contendo álcool 80%, para a posterior identificação no laboratório utilizando as chaves dicotômicas para larvas de anofelinos de Lourenço-de-Oliveira [7] e Forattini [89].

3.11.1 Localizando criadouros até 1 km de distância das malocas Yanomami.

Em cada uma das comunidades Yanomami onde foram realizadas amostragens sistemáticas, representantes de cada grupo social foram

perguntados sobre a localização de todos os corpos de água conhecidos dentro de uma rádio de 1 km a partir da maloca. A partir das respostas, um croquis inicial foi preparado com a posição relativa de cada um dos criadouros. Posteriormente, com o auxílio de um guia Yanomami, todos os criadouros foram encontrados, mapeados com o GPS, sendo todos eles amostrados na maior parte das missões de campo.

Em setembro de 2012, realizamos um estudo piloto nas áreas Yanomami de Toototobi e Parafuri, com os seguintes objetivos: 1) mapear todos os criadouros depois da reunião inicial com a comunidade, 2) estabelecer uma estratégia de amostragem para cada localidade que levasse em consideração as limitações de tempo (tempo necessário para alcançar e completar a amostragem de todos os corpos de água em cada localidade) 3) testar, in-loco, a nova metodologia de coleta de larvas e refinar possíveis erros e 4) obter dados preliminares da composição da fauna anofélica em cada uma das comunidades Yanomami.

3.11.2 Área Efetiva de Criação - AEC e os seus diferentes subtipos.

Estabelecemos que uma unidade de AEC corresponde a 1 m². O total de AEC do perímetro (pAEC) de um criadouro é a soma de todos os m² ao longo da margem do criadouro. Vários relatos da literatura têm identificado associações espécie-específicas entre alguns anofelinos e algumas espécies de macrófitas aquáticas, algas filamentosas e detritos flutuantes [155]. Para caracterizar tais associações em nossa área de estudo, classificamos outros diferentes subtipos de AEC além dos m² assinados a pAEC, os quais estão principalmente associados a áreas de folhas caídas ao longo das margens dos criadouros e em áreas principalmente sombreadas. Classificamos os subtipos de AEC nas seguintes subcategorias adicionais: 1) fAEC para m² com algas filamentosas, 2) eAEC com vegetação emergente, 3) dAEC com detritos flutuantes sombreados, 4) dsAEC com detritos flutuantes expostos ao sol, 5) smAEC com macrófitas submersas tipo *Mayaca sp.*, 6) scAEC com macrófitas submersas tipo *Cabomba sp.*, 7) suAEC com macrófitas submersas tipo *Utricularia sp.* e 8) shAEC com macrófitas submersas tipo *Apalanthe sp.*

Este tipo de amostragem estratificada foi efetuada somente nos Lagos associados aos rios (LAR) que apresentaram diferentes subtipos de AEC e que foram considerados os criadouros mais importantes na paisagem da malária.

O medidor à distância laser (Laser Rangefinder Scout DX 1000 ARC, Bushnell^R, Overland Park, KS, USA) e um pequeno bote inflável (Atlantic 200, Nautika^R, Guarulhos, SP, Brasil) foram utilizados para quantificar e amostrar os AEC dos diferentes tipos de habitat de larvas. O medidor à distância pode mensurar com muita precisão distâncias sob cobertura vegetal densa e em condições de pouca luz. As medições foram realizadas o mais próximo possível das margens dos criadouros para a quantificação do pAEC. Não obstante, o mensurador laser não pode mensurar distâncias menores a 5 metros, as quais foram estimadas visualmente.

Em casos de criadouros que apresentaram áreas onde parte do perímetro não podia ser percorrido ou sem possibilidades de se mensurá-lo a pé ou de bote, utilizamos um abordagem trigonométrica para calcular o pAEC de difícil acesso (Fig. 11). Basicamente, calculamos duas distâncias a cada extremo do segmento que queríamos calcular e, posteriormente, estimamos o ângulo entre as medidas com um portângulos marcado em graus. A distância final do fragmento desconhecido foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$D = \sqrt{A^2 + B^2 - 2AB\cos\alpha_1}$$

Para criadouros de forma circular, depois de se mensurar o diâmetro com o medidor à distância, o pAEC total foi calculado aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{perímetro AEC} = \pi \times \text{diameter}$$

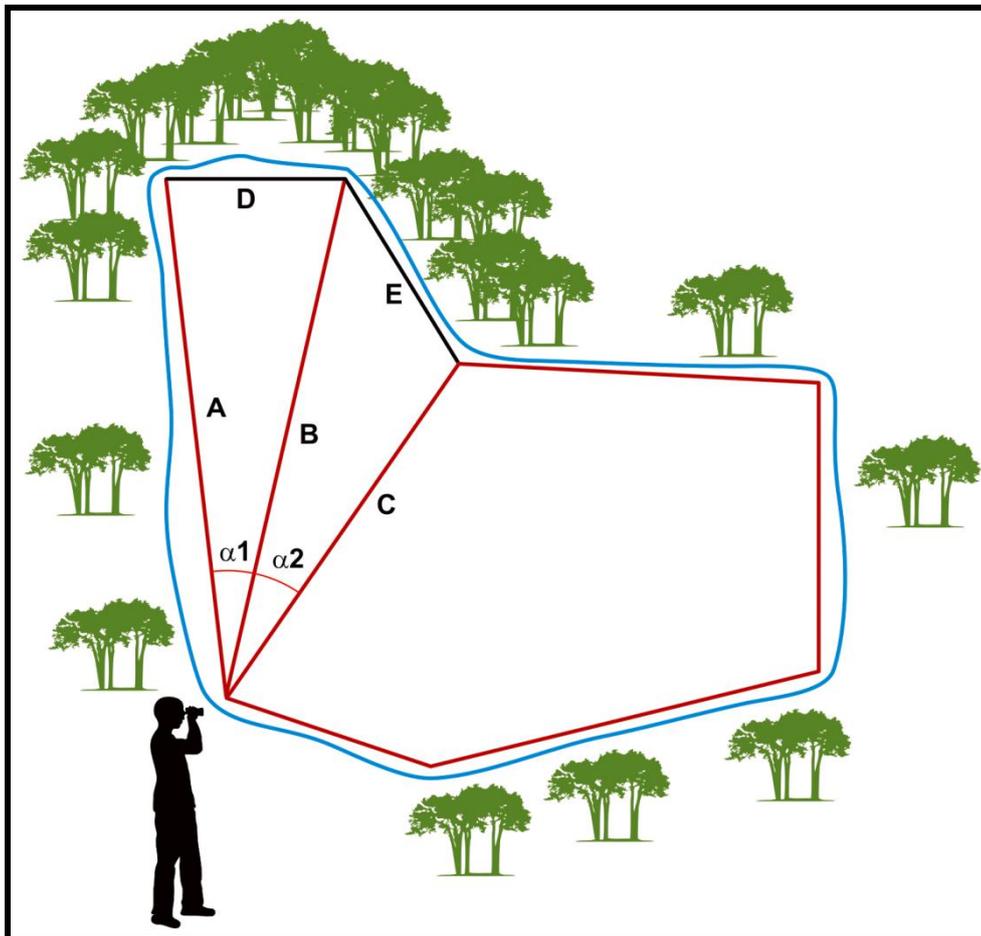


Figura 11. Quantificação da Área Efetiva de Criação. Abordagem esquemático de como calculamos segmentos do perímetro de difícil acesso utilizando o mensurador a distâncias. Por exemplo, o segmento de difícil acesso D é calculado a partir da mensura do segmento A e B com o mensurador laser e a estimativa do ângulo α_1 .

Para grandes U-LAR (=OX - lago oxbow), foi estandardizado que somente seria mensurado o perímetro externo (normalmente o mais acessível tanto a pé quando em barco) e a largura, seguido pela estimativa do perímetro interno do criadouro. Utilizamos esta abordagem principalmente por motivos de restrições de tempo e acessibilidade. Esta foi considerada a melhor abordagem para calcular o pAEC total de um determinado OX, sendo ainda compatível com a programação de trabalho de campo proposto. Cada U-LAR foi quantificado em cada visita seguindo os mesmos parâmetros. A seguinte fórmula para estimar o perímetro interno dos U-LAR foi utilizada:

$$B = 2B_1 + B_2 = 2C_1 + \pi \left(\frac{C_2}{\pi} - A \right)$$

Onde:

B = perímetro interno total, B_1 = segmento linear do perímetro interno, B_2 = segmento curvado do perímetro interno, C_1 = segmento linear do perímetro externo, C_2 = segmento curvado do perímetro externo e A = largura do OX (Fig. 12)

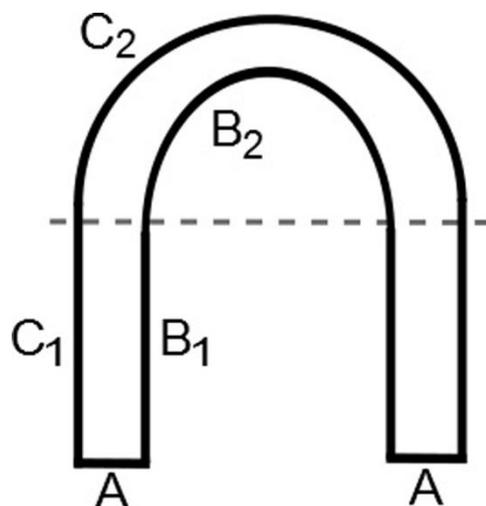


Figura 12. Representação esquemática dos segmentos lineares e curvados de um lago oxbow utilizados para o cálculo do perímetro total de Área Efetiva de Criação.

Se uma U-LAR apresentou uma marcada forma irregular, a abordagem anterior foi aplicada mas fragmentando-se o perímetro externo em várias subunidades, cada uma delas com dois segmentos lineares e um curvo. Finalmente, para esses oxbow que apresentaram formas muito circulares, a fórmula anterior foi simplificada considerando que $C_1 = 0$, resultando em:

$$B = \pi \left(\frac{C_2}{\pi} - A \right)$$

Em alguns criadouros, não foi possível determinar com precisão a AEC, como, por exemplo, grandes Áreas inundadas não associadas aos rios (FANAR) durante o pico da época chuvosa. Nestes casos, atribuímos arbitrariamente o valor de 500 AEC para permitir comparações entre áreas e estações do ano.

Ao longo dos córregos (SFS) e igarapés (MFS), os pontos propícios de proliferação de larvas de anofelino não estão distribuídos de forma uniforme,

concentrando-se principalmente em áreas tipo *microdams*, em áreas nas margens associadas à vegetação emergente, onde a correnteza da água é diminuída, ou em poucos pontos expostos ao sol, onde macrófitas submersas ou algas filamentosas podem proliferar.

Com o intuito de considerar córregos e igarapés no conjunto total de AEC por comunidade, também atribuímos de forma arbitrária o valor de 500 m² AEC, caso esses corpos de água apresentassem parte significativa dos seus cursos de água em um raio de 1 km de uma maloca Yanomami. Para córregos ou igarapés mais curtos ou que estavam localizados a uma distância maior em relação à comunidade, atribuímos o valor de 250 m² AEC. Durante a época seca, as poças formadas no leito de córregos e igarapés foram quantificadas no caso delas somarem menos de 500 m² AEC. Caso contrário, foi atribuído o máximo de 500 unidades (m²) de AEC.

Uma vez calculado o pAEC, acrescentamos em 0%, 10%, 25% ou 50% de AEC adicional considerando o pAEC como referência, quando encontramos nenhuma (0%), pouca abundância (10%), média abundância (25%) ou alta abundância (50%) de AEC adicional além do pAEC encontrado ao longo das margens do criadouro. Este AEC adicional pode corresponder a aglomerados de detritos flutuantes, à vegetação emergente ou submersa ou a pequenas "ilhas" no interior do corpo de água. Ajustando pelo AEC adicional, conseguimos o AEC total (tAEC) para cada tipo de habitat larvar. No caso de LAR, onde diferentes subtipos de AEC são presentes, o total de AEC por cada subtipo de microambiente foi quantificado.

Durante o estudo piloto de 2012, foram detectados altos padrões de agregação das formas imaturas e alguns criadouros foram classificados como positivos quando a maioria do tAEC era amostrado. Portanto, a regra de amostrar 50% do AEC por criadouro foi estabelecida no caso de corpos de água até 200 m² de tAEC. A partir do tAEC calculado, foram determinados o número de conchadas a realizar. Por exemplo, se um habitat larvar contabilizou 110 m² de tAEC, 55 pontos de amostragem foram distribuídos ao longo do criadouro. Para criadouros maiores que 200 unidades (m²) de AEC e para aqueles cujo tamanho não se conseguia mensurar, estabelecemos o máximo de 100 pontos de amostragem, tentando cobrir o máximo possível os diferentes tipos de AEC e superfície do criadouro. No caso de co-ocorrer diferentes subtipos de AEC em um mesmo criadouro, os pontos de amostragem foram

distribuídos de igual forma nas diferentes áreas ecológicas (por exemplo: 60 conchadas por cada subtipo de AEC).

Duas conchadas foram efetuadas por cada unidade/m²/ponto de amostragem de AEC. O número total de larvas por estágio e por conchada foram contabilizados in loco. Amostragens baseadas no tAEC foi escolhida ao invés de amostragens por unidade de tempo, já que foram encontradas níveis de acessibilidade muito diferentes entre os diferentes tipos de criadouros. Esta estratégia melhorou nossa eficiência de coleta. Foram registrados a abundância relativa de culicíneos e o número total de predadores macroinvertebrados, assim como algumas variáveis ambientais: a associação aos pulsos de inundação, a distância às malocas indígenas, o grau de exposição ao sol, a presença de macrófitas e algas filamentosas, turbidez e correnteza da água. Também foram registrados os seguintes parâmetros físicoquímicos: pH + temperatura (aparelho de mensura AK95, AKSO[®], São Leopoldo, RS, Brasil), salinidade + total de sais dissolvidas-TDS + condutividade (condutímetro AK50, AKSO[®], São Leopoldo, RS, Brasil) e oxigênio dissolvido (oxímetro AK84, AKSO[®], São Leopoldo, RS, Brasil). O grau de exposição ao sol foi estratificado em quatro categorias: 0-25% para criadouros profusamente sombreados, 25-75% para criadouros parcialmente expostos ao sol e, finalmente, 75-100% para criadouros expostos ao sol. Em outras palavras, criadouros que caíram nesta última categoria, apresentaram entre 75% e 100% da tAEC exposta ao sol por um período significativo de tempo ao longo das horas de luz. Os criadouros da primeira categoria fazem referência àqueles localizados embaixo de densa cobertura vegetal e quase não tiveram a tAEC exposta à luz ao longo do dia. Durante cada visita, todos os criadouros foram fotografados e identificados com um código único, ressaltando os diferentes subtipos de AEC que podiam estar presentes em cada visita de campo.

O segundo elemento fundamental para a amostragem das LAR foi o uso de um pequeno bote inflável. Este equipamento portátil e leve nos permitiu levar a cabo a amostragem estratificada, cobrindo a maior parte dos subtipos de AEC de cada LAR. O tamanho reduzido do bote nos permitiu grande flexibilidade para navegar em águas muito rasas (de até só 25 cm de profundidade) e alcançar praticamente todos os pontos de interesse dentro de uma LAR. Os pontos de pAEC e eAEC encontradas nas margens dos lagos foram amostradas utilizando-se o bote ou a pé. Além de facilitar a

acessibilidade, o bote inflável conferiu uma enorme segurança contra ameaças letais que podem habitar as LAR, como é o caso do poraquê (*Electrophorus electricus*), uma vez que o bote inflável se mostrou ideal para isolar o pesquisador dos choques elétricos. Quando uma LAR foi amostrada pela primeira vez, quando os níveis da água eram baixos ou em situações de água turva ou meio-turva, foi realizada navegação cuidadosa e foram desenhadas as rotas internas para cada LAR e condição. Esta abordagem nos permitiu amostrar a maior parte de tipos de AEC dos LAR e minimizar a perfuração do bote por objetos submersos. Duas pessoas utilizando botes independentes podem simultaneamente coletar a mesmo LAR, acrescentando a segurança da equipe. O uso de botes de metal ou canoas tradicionais indígenas pode ser inviável na maioria de LAR, especialmente nos que não estão completa e continuamente conectados aos rios. Com este método, conseguimos poupar tempo e recursos humanos.

Amostragens exploratórias foram realizadas ao longo dos três rios de baixa ordem da nossa área de estudo, o rio Toototobi, no polo base Toototobi, e os rios Inajá e Parima, localizados na área montanhosa de Parafuri. As amostragens nos rios foram levadas a cabo até 1 km a partir da comunidade em ambas as direções. Ambientes típicos de proliferação de anofelinos foram procurados ao longo dos rios, como as poças no leito do rio na época seca, as margens onde a correnteza da água é desacelerada pela presença de aglomerados de vegetação emergente, as áreas de vegetação submersa e com algas filamentosas e, finalmente, pequenas barragens naturais ou *microdams*. Para córregos e igarapés, as conchadas foram realizadas em lugares similares, ou seja, áreas onde eram esperados o encontro de larvas de anofelinos como margens com pouca correnteza e aglomerados de detritos flutuantes e vegetação emergente. Também amostramos áreas com algas filamentosas verde e macrófitas submersas nos poucos pontos onde a luz solar atravessou a densa cobertura vegetal e teve acesso à superfície do criadouro.

3.12 Análises estatísticas.

Os dados de formas imaturas e adultas de anofelinos foram introduzidos em bases de dados criados no programa Epi Info versão 3.5.4 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Uma vez completada a entrada de

dados, estes foram checados de novo para a detecção de imprecisões. Posteriormente os dados foram analisados utilizando o programa STATA 10 (College Station, TX, USA), SAS e o pacote informático R.

Utilizamos a correlação de Spearman para determinar a correlação de duas variáveis contínuas. Análises multivariadas por Regressão Binomial Negativa foram escolhidos para a exploração do efeito de variáveis ambientais sobre a ocorrência das seguintes espécies de anophelinos: *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus s.l.*, *An. costai-like*, *An. mattogrossensis* e *An.intermedius/guarao-like*.

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição das espécies de anofelinos adultos nos Polos Base Toototobi, Parafuri e Marari.

Foram realizadas 15 coletas de anofelinos, em 13 comunidades Yanomami, utilizando-se Atrativo Humano Protegido e armadilha CDC, nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari, sendo obtido um total de 6.336 anofelinos adultos, dos quais 1.691 e 2.631 foram coletados nos Polos Base Toototobi (AM) e Parafuri (RR), respectivamente, e 2.014 no Polo Base Marari (AM) (Tabela 4).

Tabela 4. Número absoluto e frequência das espécies de *Anopheles* adultos nos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari.

Espécies	POLO BASE			
	Toototobi	Parafuri	Marari	Total
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	2 (0,1)	1119 (42,5)	435 (21,6)	1556 (24,6)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	800 (47,3)	1281 (48,7)	138 (6,9)	2219 (35)
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	3 (0,2)	0	1105 (54,9)	1108 (17,5)
<i>An. intermedius</i>	537 (31,8)	23 (0,9)	36 (1,8)	596 (9,4)
<i>An. guarao-like</i>	130 (7,7)	5 (0,2)	0	135 (2,1)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	4 (0,2)	89 (3,4)	26 (1,3)	119 (1,9)
<i>An. mattogrossensis</i>	85 (5)	0	21 (1)	106 (1,7)
<i>An. costai/guarao</i>	33 (2)	4 (0,9)	0	37 (0,6)
<i>An. costai-like</i>	7 (0,4)	6 (0,2)	1 (0,05)	14 (0,2)
<i>An. (Kerteszia) sp.</i>	0	10 (0,4)	0	10 (0,2)
<i>An. squamifemur</i>	0	3 (0,1)	0	3 (0,05)
<i>Chagasia bonneae</i>	3 (0,2)	0	0	3 (0,05)
<i>An. sp.</i>	87 (5,1)	91 (3,5)	252 (12,5)	430 (6,8)
Total	1691	2631	2014	6336

N: representa o número total de exemplares em todos os tipos de capturas

O esforço total de captura utilizando atrativo humano protegido foi de 1.296 horas, nos Polos Base de Toototobi e Parafuri, e de 984 horas no Polo Base de Marari. Como resultado desse estudo foram coletadas 11 espécies ou complexos de espécie, de dois gêneros *Anopheles* e *Chagasia*, distribuídas

nos subgêneros *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, *Anopheles* Meigen, 1818, *Kerteszia* Theobald, 1905 e *Lophopodomyia* Antunes, 1937. As seguintes espécies foram identificadas: *Anopheles* (*Nys.*) *oswaldoi* s.l., *An.* (*Nys.*) *darlingi*, *An.* (*Nys.*) *triannulatus* s.l., *An.* (*Nys.*) *nuneztovari* s.l., *An.* (*Ano.*) *intermedius*, *An.* (*Ano.*) *matto grossensis*, *An.* (*Ano.*) *guarao-like*, *An.* (*Ano.*) *costai-like*, *An.* (*Lop.*) *squamifemur*, *An.* (*Ker.*) sp. e *Chagasia bonneae*. Em alguns casos, a utilização dos caracteres morfológicos não foi suficiente para a identificação da espécie, e a análise molecular das sequências nucleotídicas da região *barcode* do gene COI não revelou perfeita correlação com as sequências depositadas no banco de dados genômico (GenBank). Este é o caso dos espécimes identificados como *An.* (*Ano.*) *guarao-like* e *An.* (*Ano.*) *costai-like*, que terão esta identificação provisória até definirmos seu status taxonômico.

Nas Tabelas 5, 6 e 7 estão apresentados os números absolutos e as frequências dos anofelinos coletados, por espécie, nas comunidades dos Polos Base Toototobi, Parafuri e Marari. As espécies mais abundantes durante todo o estudo, considerando-se as três áreas, foram *An. oswaldoi* s.l. e *An. darlingi*, que, juntas, contribuíram com 59,5%. Em Toototobi e Parafuri, *An. oswaldoi* s.l. foi a espécie mais prevalente, representando 47,3% e 48,7%, respectivamente (Tabelas 5 e 6).

No Polo Base Toototobi, as espécies mais prevalentes foram o *An. oswaldoi* s.l. (47,3%), seguido do *An. intermedius* (31,8%), *An. guarao-like* (7,7%) e o *An. matto grossensis* (5%). Outras espécies foram coletadas em menor número, como *An. triannulatus* s.l., *An. nuneztovari* s.l., *An. costai-like* e *Chagasia bonneae*. *An. oswaldoi* s.l. foi a espécie mais abundante em todas as comunidades de Toototobi, com exceção de Apiahik onde *An. intermedius* predominou. Em Raxasi, Mahaxipoha e no Posto, *An. oswaldoi* s.l. representou mais de 60% dos espécimes coletados. Na comunidade Koiopi predominaram *An. oswaldoi* s.l., *An. intermedius* e *An. guarao-like*. O *An. darlingi* só foi coletado (dois exemplares) na comunidade de Apiahik dentre aquelas do Toototobi (Tabela 5).

Tabela 5. Número absoluto e frequência das espécies de *Anopheles* adultos coletados nas comunidades de Toototobi no período de setembro 2012 a julho de 2014.

Espécies	POLO BASE TOOTOTOBÍ					Total
	Raxasi	Apiahik	Mahaxipoha	Koiopi	Posto	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	0	2(0,3)	0	0	0	2(0,1)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	119(66,5)	112(18,7)	320(84,6)	138(39,2)	111(62,0)	800(47,3)
<i>An. intermedius</i>	18(10,1)	379(62,8)	5(1,3)	104(29,6)	31(17,3)	537(31,8)
<i>An. guarao-like</i>	10(5,6)	10(1,6)	16(4,2)	80(22,7)	14(7,8)	130(7,7)
<i>An. mattogrossensis</i>	4(2,2)	65(10,8)	12(3,3)	3(0,8)	1(0,5)	85(5,0)
<i>An. costai/guarao</i>	11(6,2)	5(0,8)	8(2,1)	3(0,8)	6(3,4)	33(1,9)
<i>An. costai-like</i>	1(0,5)	2(0,3)	0	1(0,3)	3(1,7)	7(0,4)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	1(0,5)	1(0,2)	0	2(0,6)	0	4(0,2)
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	0	3(0,5)	0	0	0	3(0,2)
<i>Chagasia bonneae</i>	0	1(0,2)	0	2(0,6)	0	3(0,2)
<i>An. sp.</i>	15(8,4)	23(3,8)	17(4,5)	19(5,4)	13(7,3)	87(5,1)
Total	179	603	378	352	179	1691

N: representa o número total de exemplares em todos os tipos de capturas

No Polo Base Parafuri, *An. oswaldoi s.l.* (48,7%) e *An. darlingi* (42,5%) foram as espécies mais frequentes e abundantes, seguidas de *An. triannulatus s.l.* (3,4%) e *An. intermedius* (0,9%). As demais espécies, como *An. (Kerteszia) sp.*, *An. squamifemur*, *An. costai-like* e *An. guarao-like* foram menos frequentes e capturadas em baixa densidade ao longo do estudo (Tabela 6). *An. darlingi* foi coletado em todas as comunidades e no Posto de Parafuri, porém foi mais abundante em Komomassipe, representando 91,4% do total coletado. Nas comunidades de Makabey, Warareu e Xaruna o *An. oswaldoi s.l.* foi a espécie predominante. Já o *An. nuneztovari s.l.*, *Chagasia bonneae* e *An. mattogrossensis* não foram observados em nenhuma das comunidades de Parafuri.

Tabela 6. Número absoluto e frequência das espécies de *Anopheles* adultos coletados nas comunidades de Parafuri, no período de setembro 2012 a julho de 2014.

Espécies	POLO BASE PARAFURI					Total
	Warareu	Komomassipe	Xaruna	Makabey	Posto	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	43(12,2)	1042(91,4)	2(0,6)	9(1,2)	23 (57,5)	1119(42,5)
<i>An. oswaldoi s.l</i>	207(58,8)	66(5,8)	273(82,2)	723(94,6)	12 (30,0)	1281(48,7)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	67(19,0)	4(0,3)	4(1,2)	11(1,4)	3 (7,5)	89(3,4)
<i>An. intermedius</i>	7(2,0)	1(0,1)	13(3,9)	2(0,3)	0	23(0,9)
<i>An. (Kerteszia) sp.</i>	8(2,3)	0	0	1(0,1)	1 (2,5)	10(0,4)
<i>An. costai-like</i>	2(0,6)	0	0	4(0,5)	0	6(0,2)
<i>An. guarao-like</i>	5(1,4)	0	0	0	0	5(0,3)
<i>An. costai/guarao</i>	2(0,6)	0	1(0,3)	1(0,1)	0	4(0,1)
<i>An. squamifemur</i>	0	3(0,3)	0	0	0	3 (0,1)
<i>An.sp</i>	11(3,1)	27(2,4)	39(11,7)	13(1,7)	1 (2,5)	91(3,5)
Total	352	1143	332	764	40	2631
N: representa o número total de exemplares em todos os tipos de capturas						

No Polo Base Marari, as espécies predominantes foram *An. nuneztovari s.l.*, *An. darlingi* e *An. oswaldoi s.l.* Entretanto, nas comunidades, *An. darlingi* foi a espécie mais frequente em Gasolina, Alapusi e Taibrapa, *An. oswaldoi s.l.* em Castanha/Ahima e *An nuneztovari s.l.* em Taibraba 2. A alta densidade de *An. nuneztovari s.l.* (N=1.101) em Taibraba 2 corresponde quase que exclusivamente a quatro dias de coleta em setembro de 2014. Nas outras comunidades, esta espécie foi ausente ou representada por poucos exemplares, como em Castanha (N=1) e Gasolina (N=3). *An. intermedius* esteve presente em todas as comunidades, exceto em Taibrapa 2. Em contraste, *An. triannulatus s.l.* e *An. mattogrossensis* estiveram presente quase que exclusivamente na comunidade Taibrapa 2 (Tabela 7).

Tabela 7. Número absoluto e frequência das espécies de *Anopheles* adultos coletados nas comunidades de Marari no período de março de 2013 a março de 2015.

Espécies	POLO BASE MARARI					Total
	Alapusi	Castanha/Ahima	Gasolina	Taibrapa	Taibrapa 2	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	123(85,4)	8(11,4)	197(79,1)	99(56,6)	8(0,6)	435(21,6)
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	0	1(1,4)	3(1,2)	0	1101(80,0)	1105(54,9)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	6(4,2)	34(48,6)	13(5,2)	58(33,2)	27(2,0)	138(6,8)
<i>An. intermedius</i>	13(9,0)	7(10)	14(5,6)	2(1,1)	0	36(1,8)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	1(1,4)	0	0	25(1,8)	26(1,3)
<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	0	0	21(1,5)	21(1,0)
<i>An. costai-like</i>	0	0	1(0,4)	0	0	1(0,1)
<i>An. sp.</i>	2(1,4)	19(27,1)	21(8,4)	16(9,1)	194(14,0)	252(12,5)
Total	144	70	249	175	1376	2014

N: representa o número total de exemplares em todos os tipos de capturas

4.2 Confirmação molecular das espécies de anofelinos por COI barcode.

Foram avaliados 483 anofelinos para a região *barcode* do gene COI. Dentre estes, obtivemos 53 sequências únicas que serão utilizadas em análises filogenéticas, destinadas à identificação das possíveis novas espécies coletadas na região. Foram feitas as duas fitas de sequenciamento para 43 amostras, obtendo-se acima de 650 pares de bases (bp) para estes exemplares. Nos restantes 440 exemplares, foi avaliada somente a fita F, obtendo-se um segmento menor da região de 658 bp alvo do gene COI. Estas sequências foram utilizadas para a inferência ao nível de espécie em exemplares muito danificados e que eram especialmente de interesse (Ex: espécimes coletados no ambiente intradomiciliar ou que pertencem a complexos de espécies onde a identificação morfológica não é suficiente).

Foram encontrados resultados compatíveis com as espécies *An. darlingi* (16), *An. oswaldoi* B (24), *An. oswaldoi* A-like (141), *An. intermedius* (18), *An. nuneztovari* (4), *An. goeldii* (2) e *An. triannulatus s.s.* (3). Adicionalmente, encontramos exemplares que tiveram suas sequências nucleotídicas com menos de 98% de semelhança com alguma sequência reconhecida de COI disponibilizada no GenBank. Estes exemplares foram agrupados provisoriamente nos seguintes grupos: *An. oswaldoi* A, com 97% de

concordância com a sequência tipo (164), *An. homunculus* (5), *An. punctimacula* (24), *An. rangeli* (1), *An. malefactor* (19), *An. fluminensis* (1), *An. calderoni* (16), *An. mattogrossensis* (2) e *An. costai* (14) e dois anofelinos indeterminados. A confirmação da posição taxonômica das espécies analisados está ainda em andamento.

4.3 Sazonalidade das espécies de anofelinos adultos mais abundantes nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.

A densidade populacional de anofelinos adultos diminuía a praticamente zero durante a segunda metade da época seca (janeiro a março).

Em Raxasi, *An. oswaldoi s.l.* predominou nos meses de chuvas (junho), de transição chuva-seca (setembro) e durante a primeira metade da época seca (novembro), com um pico de densidades em junho/2014 (chuvas). No caso da comunidade de Apiahik, *An. intermedius* predominou com um pico único de densidade muito acentuado em setembro/2012. A comunidade do Apiahik foi a única onde coletamos, no mês de setembro/2013, dois exemplares de *An. darlingi* (Fig. 13).

Na comunidade de Mahaxipoha, o *An. oswaldoi s.l.* foi a espécie predominante com um pico único de densidade no período de transição seca-chuva (abril/2013) e outro pico menor na época chuvosa (junho/2014). As outras espécies registradas ao longo do ano nesta comunidade foram *An. intermedius*, *An. mattogrossensis* e *An. guarao-like*, ocorrendo principalmente na época de chuvas e nos períodos de transição chuva-seca (setembro). A comunidade de Koiopi foi a que apresentou a maior diversidade e abundância de espécies ao longo do ano. *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius* e *An. guarao-like* foram predominantes. *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius* tiveram um incremento importante nos meses de abril e junho/2013, que se estendeu nos meses seguintes de época chuvosa (junho/2013), transição chuva-seca (setembro/2013) e na primeira metade da época seca (novembro/2014). Cabe destacar que *An. guarao-like* foi também coletado em abundância nesta comunidade nos meses de junho a novembro, com um pico de densidade acentuado na primeira metade da época seca (novembro/2013). Em janeiro (segunda metade da seca) e abril de 2014, não foram coletadas formas adultas

de nenhuma espécie, exceto um único exemplar de *An. oswaldoi s.l.*, em janeiro de 2014 (Fig. 13).

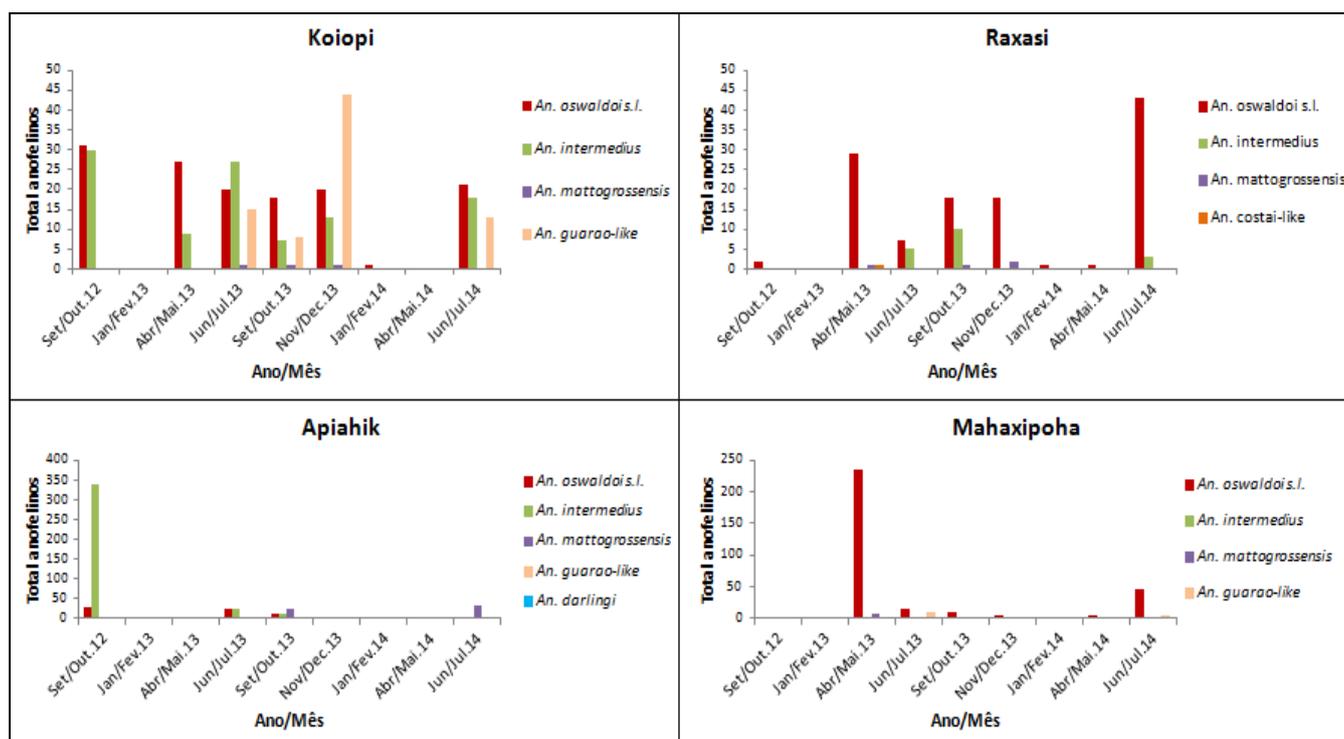


Figura 13. Dinâmica sazonal das espécies mais abundantes de anofelinos adultos em Toototobi, nas comunidades de Koiopi, Raxasi, Apiahik, e Mahaxipoha no período de setembro de 2012 a julho 2014.

Os resultados na Figura 14 mostram os dados sazonais das espécies mais abundantes coletadas nas comunidades de Parafuri, que foram *An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus s.l.* e *An. darlingi*. Na comunidade Warareu, houve predominância do *An. oswaldoi s.l.* em todas as coletas com uma sazonalidade irregular e picos de densidade diferentes entre 2013 (janeiro e setembro) e 2014 (junho). Essa espécie apresentou dois picos de maior intensidade na primeira metade da época seca (setembro/2013) e no período de transição chuvas-seca (junho/2014). *An. triannulatus s.l.* também foi coletado o ano todo, com um único pico de densidade em setembro/2013. Warareu foi a segunda comunidade na área de Toototobi e Parafuri onde coletamos maior número de *An. darlingi*, com maior densidade na época de transição de chuva para seca nesta região (junho/julho de 2013 e 2014). A maioria dos exemplares de *An. (Kerteszia) sp.* foram coletados no Warareu, ocorrendo de forma irregular ao longo do período de estudo. Em Komomassipe, *An. darlingi* foi a espécie predominante em quase todas as coletas com dois picos maiores de densidade no período de transição chuvas-

seca (julho de 2013 e 2014). Em Xaruna e Makabey o *An. oswaldoi* s.l. predominou em todas as coletas do ano, com um pico de densidade em maio 2013 (chuvas), em Makabey, e em setembro de 2003 (primeira metade dos meses de seca), em Xaruna.

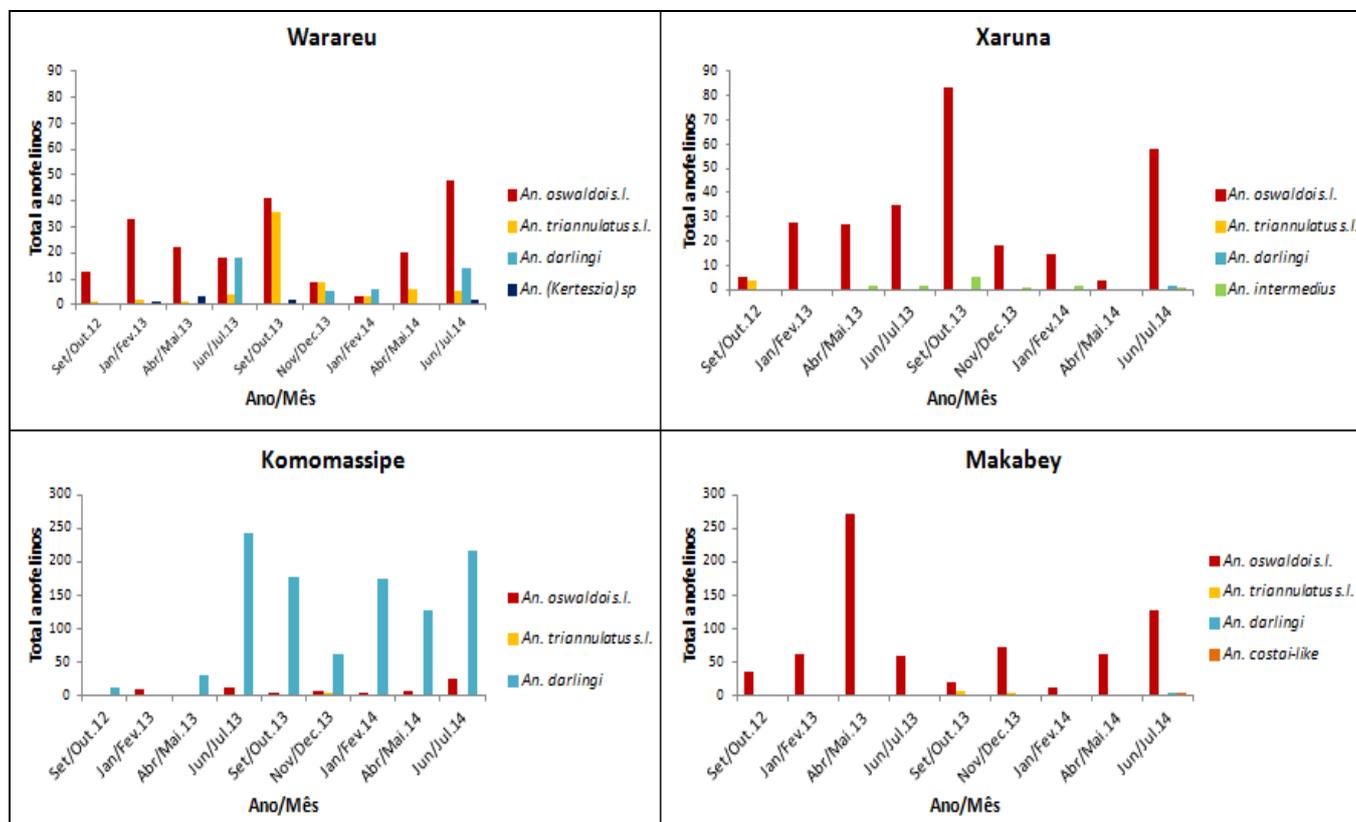


Figura 14. Dinâmica sazonal das espécies de anofelinos adultos mais abundantes em Parafuri nas comunidades de Warareu, Xaruna, Komomassipe e Makabey no período de setembro 2012 a julho 2014.

4.4 Distribuição das espécies de anofelinos por ambiente de captura nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.

Os resultados das coletas de anofelinos, por ambiente de coleta e por comunidade no Toototobi, Parafuri e Marari, estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente. Para esta análise, só foram consideradas as capturas de 4 horas (18 – 22 horas), feitas com Atrativo Humano Protegido (AHP). Porém, no caso do Marari, as capturas de 4 horas feitas nas quatro últimas campanhas foram realizadas no horário de 20 às 00 horas no intradomicílio, além daquelas no peridomicílio e extradomicílio (18-22 horas). Embora sempre tenhamos encontrado uma ocorrência predominante das espécies nos ambientes peridomiciliares e extradomiciliares, algumas diferenças entre as comunidades por Polo Base merecem destaque.

Nas comunidades de Koiopi e Mahaxipoha, do Toototobi, encontramos maiores densidades da maioria das espécies no ambiente extradomiciliar quando comparado com o peridomiciliar. Adicionalmente, no Koiopi, encontramos o dobro de diversidade de espécies no extradomicílio (oito espécies) que no peridomicílio (quatro espécies). Já no caso do Apiahik e Raxasi, ainda no Toototobi, encontramos a situação oposta: a densidade no ambiente peridomiciliar foi maior que no extradomicilio (com alguma exceção notável, como o caso do *An. mattogrossensis*, no Apiahik, onde 93,6% dos espécimes foram coletados no extradomicílio) (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio, nas comunidades de Toototobi.

Comunidade	Espécies	Intradomicílio	Peridomicílio	Extradomicílio
		N (%)	N (%)	N (%)
Raxasi	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	46 (62,2)	34 (61,8)
	<i>An. intermedius</i>	0	15 (20,3)	3 (5,5)
	<i>An. costai/guarao</i>	0	3 (4,1)	8 (14,5)
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	3 (5,5)
	<i>An. costai-like</i>	0	0	1 (1,8)
	<i>An. guarao-like</i>	0	5 (6,8)	4 (7,3)
	<i>An. sp.</i>	0	5 (6,8)	2 (3,6)
	Total	0	74 (57,3)	55 (42,6)
Mahaxipoha	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	43 (89,6)	195 (86,7)
	<i>An. intermedius</i>	0	1 (2,1)	0
	<i>An. costai/guarao</i>	0	2 (4,2)	4 (1,8)
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	1 (2,1)	11 (4,9)
	<i>An. guarao-like</i>	0	1 (2,1)	13 (5,8)
	<i>An. sp.</i>	0	0	2 (0,9)
	Total	0	48	225
Apiahik	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	41 (17,4)	30 (21,4)
	<i>An. intermedius</i>	3 (75)	178 (77,4)	51 (36,4)
	<i>An. costai/guarao</i>	0	1 (0,4)	3 (2,1)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	1 (0,7)
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	3 (1,3)	44 (3,4)
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	0	2 (0,9)	1 (0,7)
	<i>Chagasia bonneae</i>	0	1 (0,4)	0
	<i>An. costai-like</i>	1 (25)	1 (0,4)	0
	<i>An. guarao-like</i>	0	1 (0,4)	7 (5)
	<i>An. sp.</i>	0	2 (0,9)	3 (2,1)
	Total	4 (1,1)	230 (61,5)	140 (37,4)
Koiopi	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	13 (43,3)	59 (34,5)
	<i>An. intermedius</i>	0	13 (43,3)	27 (15,8)
	<i>An. costai/guarao</i>	0	1 (3,3)	2 (1,2)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	2 (1,2)
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	2 (1,2)
	<i>Chagasia bonneae</i>	0	0	2 (1,2)
	<i>An. costai-like</i>	0	0	1 (0,6)
	<i>An. guarao-like</i>	0	3 (10)	76 (44,4)
	<i>An. sp.</i>	1 (100)	0	0
	Total	1 (0,5)	30 (14,9)	171 (84,77)

No caso das comunidades do Parafuri, constatamos que houve também diferenças entre as coletas no peridomicílio e extradomicílio segundo a comunidade e que *An. darlingi*, embora em baixa densidade, foi a única espécie detectada dentro das habitações indígenas. Por exemplo, no Warareu, encontramos maiores densidades relativas no ambiente extradomiciliar (68,5%), para todas as espécies, menos para *An. darlingi*, que não foi coletado com AHP na proximidade do rio Inajá, mas sim nas coletas peridomiciliares. Dois *An. darlingi* foram os únicos anofelinos coletados dentro das habitações indígenas dessa comunidade. No caso do Komomassipe, encontramos uma marcada diferença quanto às coletas de *An. darlingi*, sendo a maioria encontrada no peridomicílio (82,7%) e em números muito menores no intra- (5%) e extradomicílio (12,3%). Tanto no Makabey, quanto no Xaruna, os anofelinos predominaram no peridomicílio, onde *An. oswaldoi* s.l. claramente dominou também no peri- e no extradomicílio. Cabe destacar que, nestas duas últimas comunidades, devido à característica das habitações Yanomami, a diferenciação entre os ambientes peri- e extradomiciliares foi menos evidente que nas outras comunidades (Tabela 9).

Foram também vistas, entre as comunidades do Marari, variações na prevalência de anofelinos por ambiente (fora das habitações indígenas) (Tabela 10). Um exemplo contrastante foi encontrado na comunidade de Taibrapa 2, onde somente três anofelinos foram coletados nas imediações da comunidade (peridomicílio), contra 800 no extradomicílio (à aproximadamente 400 metros do *shabono*), onde os indígenas tomam banho, inclusive nos horários crepusculares. Estas numerosas coletas foram predominadas por *An. nuneztovari* s.l.. Nos casos de Gasolina e Taibrapa, foram coletados mais *An. darlingi* no extradomicílio. O caso contrário aconteceu no Alapusi e Castanha. As coletas que renderam mais *An. darlingi* foram as feitas próximo aos principais criadouros produtivos identificados por comunidade.

Tabela 9. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio, nas comunidades de Parafuri.

Comunidade	Espécie	Intradomicílio	Peridomicílio	Extradomicílio
		N (%)	N (%)	N (%)
Warareu	<i>An. darlingi</i>	2 (100)	6 (8,5)	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	58 (81,7)	94 (59,1)
	<i>An. intermedius</i>	0	1 (1,4)	0
	<i>An. costai/guarao</i>	0	1 (1,4)	1 (0,6)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	2 (2,8)	57 (35,8)
	<i>An. (kerteszia) sp.</i>	0	0	3 (1,9)
	<i>An. costai-like</i>	0	1 (1,4)	1 (0,6)
	<i>An. guarao-like</i>	0	1 (1,4)	3 (1,9)
	<i>An. sp.</i>	0	1 (1,4)	0
Total		2 (0,9)	71 (30,6)	159 (68,5)
Komomassipe	<i>An. darlingi</i>	19 (95)	304 (92,4)	22 (44,9)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	24 (7,3)	25 (51)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	2 (4,1)
	<i>An. sp.</i>	1 (5)	1 (0,3)	0
Total		20 (5)	329 (82,7)	49 (12,3)
Xaruna	<i>An. darlingi</i>	0	0	1 (1,5)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	91 (94,8)	65 (95,6)
	<i>An. intermedius</i>	0	5 (5,2)	1 (1,5)
	<i>An. costai/guarao</i>	0	0	1 (1,5)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	0
Total		0	96 (58,5)	68 (41,5)
Makabey	<i>An. darlingi</i>	1 (100)	0	1 (0,5)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	307 (98,4)	178 (90,8)
	<i>An. intermedius</i>	0	1 (0,3)	1 (0,5)
	<i>An. costai/guarao</i>	0	1 (0,3)	0
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	1 (0,3)	10 (5,1)
	<i>An. (kerteszia) sp.</i>	0	0	1 (0,5)
	<i>An. costai-like</i>	0	0	2 (1)
	<i>An. sp.</i>	0	2 (0,6)	3 (1,5)
Total		1 (0,2)	312 (61,3)	196 (38,5)

Tabela 10. Frequência de anofelinos capturados em Atrativo Humano Protegido (AHP), nos ambientes intradomicílio, peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Marari.

Comunidade	Espécie	Intradomicílio	Peridomicílio	Extradomicílio
		N (%)	N (%)	N (%)
Alapusi	<i>An. darlingi</i>	2 (100)	10 (71,4)	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	0	1 (33,3)
	<i>An. intermedius</i>	0	4 (28,6)	2 (66,6)
Total		2 (10,5)	14 (73,7)	3 (15,8)
Castanha	<i>An. darlingi</i>	0	3 (60)	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	2 (40)	1 (100)
Total		0	5 (83,3)	1 (16,7)
Gasolina	<i>An. darlingi</i>	2 (100)	8 (100)	27 (87,1)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	0	1 (3,2)
	<i>An. intermedius</i>	0	0	3 (9,7)
Total		2 (4,8)	8 (19)	31 (73,8)
Taibrapa	<i>An. darlingi</i>	3 (100)	8 (53,3)	22 (88)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	7 (46,7)	2 (8)
	<i>An. intermedius</i>	0	0	1 (4)
Total		3 (7)	15 (34,9)	25 (58,1)
Taibrapa 2	<i>An. darlingi</i>	0	0	1 (0,1)
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	0	20 (2,5)
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	21 (2,6)
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	16 (2)
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	1 (100)	3 (100)	647 (80,9)
	<i>An. sp.</i>	0	0	95 (11,9)
Total		1 (0,1)	3 (0,3)	800 (99,5)

Calculamos também as densidades das principais espécies de anofelinos por horário de coleta (Tabela 11 - Toototobi, 12 - Parafuri e 13 - Marari). No caso do Komomassipe, coletamos a maior quantidade de *An. darlingi* no ambiente peridomiciliar no horário de 21 às 22 horas. De fato, constatamos que as maiores densidades de *An. darlingi* corresponderam essencialmente ao último horário (21 - 22 horas), independentemente do ambiente de coleta (peridomicílio ou extradomicílio) em cada comunidade. Na maioria de comunidades o *An. oswaldoi s.l.* foi mais comum nos dois primeiros horários de coleta seja perto ou longe das habitações, menos na comunidade de Mahaxipoha, onde o 57,1% de todas os *An. oswaldoi s.l.* foram coletados no horário de 21 às 22 horas. Este fato foi devido, exclusivamente, às coletas feitas no pico de densidade populacional deste vetor, ocorrida no mês de abril de 2013. Registramos maior densidade de *An. intermedius*, em setembro de 2012, na comunidade de Apiahik, quando o pico horário ocorreu de 19 - 20 horas, no peridomicílio.

Tabela 11. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Toototobi (coletas de 18 - 22 horas).

Comunidade	Espécies	Peridomicílio				Extradomicílio			
		18-19h	19-20h	20-21h	21-22h	18-19h	19-20h	20-21h	21-22h
Raxasi	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	14	18	8	6	8	12	9	5
	<i>An. intermedius</i>	11	1	2	1	0	2	0	1
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	2
	<i>An. guarao-like</i>	1	3	0	1	1	2	1	0
Mahaxipoha	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	10	14	7	12	16	29	14	136
	<i>An. mattogrossensis</i>	1	0	0	0	0	5	3	3
	<i>An. guarao-like</i>	0	1	0	0	6	5	0	2
Apiahik	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	9	18	9	5	3	19	5	3
	<i>An. intermedius</i>	4	122	38	14	5	22	19	5
	<i>An. mattogrossensis</i>	2	1	0	0	11	10	14	9
	<i>An. guarao-like</i>	0	1	0	0	1	2	4	0
Koiopi	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	1	0	5	7	19	15	10	15
	<i>An. intermedius</i>	1	3	4	5	18	3	2	4
	<i>An. guarao-like</i>	0	1	1	1	29	23	14	10
	Total	54	183	74	52	117	150	95	195

Tabela 12. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Parafuri (coletas de 18 - 22 horas).

Comunidade	Espécies	Peridomicílio				Extradomicílio			
		18-19h	19-20h	20-21h	21-22h	18-19h	19-20h	20-21h	21-22h
Warareu	<i>An. darlingi</i>	0	1	0	5	0	0	0	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	16	25	13	4	20	47	16	11
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	1	1	0	0	9	29	8	11
Komomassipe	<i>An. darlingi</i>	56	43	59	146	4	6	8	4
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	7	9	3	5	4	14	5	2
Xaruna	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	34	33	8	16	5	39	17	4
	<i>An. intermedius</i>	1	2	2	0	0	0	0	1
Makabey	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	85	133	53	36	52	66	32	28
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	1	0	2	8	0	0
Total		200	247	139	212	96	209	86	61

Tabela 13. Distribuição das espécies mais abundantes de anofelinos adultos por horário de atividade de picada no peridomicílio e extradomicílio nas comunidades de Marari (coletas de 18 - 22 horas).

Comunidade	Espécies	Peridomicílio				Extradomicílio			
		18-19h	19-20h	20-21h	21-22h	18-19h	19-20h	20-21h	21-22h
Alapusi	<i>An. darlingi</i>	0	2	5	3	0	0	0	0
	<i>An. intermedius</i>	2	1	1	0	1	0	1	0
Castanha	<i>An. darlingi</i>	0	0	1	2	0	0	0	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	0	2	0	0	1	0	0
Gasolina	<i>An. darlingi</i>	0	2	1	5	6	5	6	10
	<i>An. intermedius</i>	0	0	0	0	1	1	1	0
Taibrapa	<i>An. darlingi</i>	1	1	3	3	0	3	6	13
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	2	3	2	0	1	0	1
Taibrapa 2	<i>An. darlingi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	0	0	0	0	15	3	1	1
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	0	0	0	12	6	2	1
	<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	0	0	1	8	6	1
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	0	3	0	0	377	219	41	10
Total		3	11	16	15	413	248	64	37

4.5 Distribuição das espécies mais abundantes por horários de hematofagia nas capturas de 12h.

As figuras 15, 16 e 17 mostram os resultados da atividade hematofágica das espécies mais abundantes ao longo da noite nas comunidades dos três Polos Base nas áreas de estudo.

An. darlingi apresentou um comportamento hematofágico semelhante entre as comunidades do Parafuri e Marari, onde foi capturado em maior densidade próximo à meia noite (Fig. 15). No Parafuri, o *An. darlingi* apresentou atividade ao longo de toda a noite, mas com um maior pico de atividade entre as 00 e 01 horas, no Komomassipe, e um pico bem menor entre

as 00 e 02 horas, no Warareu. Interessante notar que houve atividade reduzida desta espécie nas primeiras horas da noite. Nas comunidades de Taibrapa, Gasolina e Alapusi, no Marari, o horário de maior ocorrência desta espécie foi entre 23 h - 00 h. Este padrão de pico monomodal foi ligeiramente diferente no Alapusi, onde um número considerável de *An. darlingi* foi visto picando nos primeiros horários da noite (19 - 22 horas).

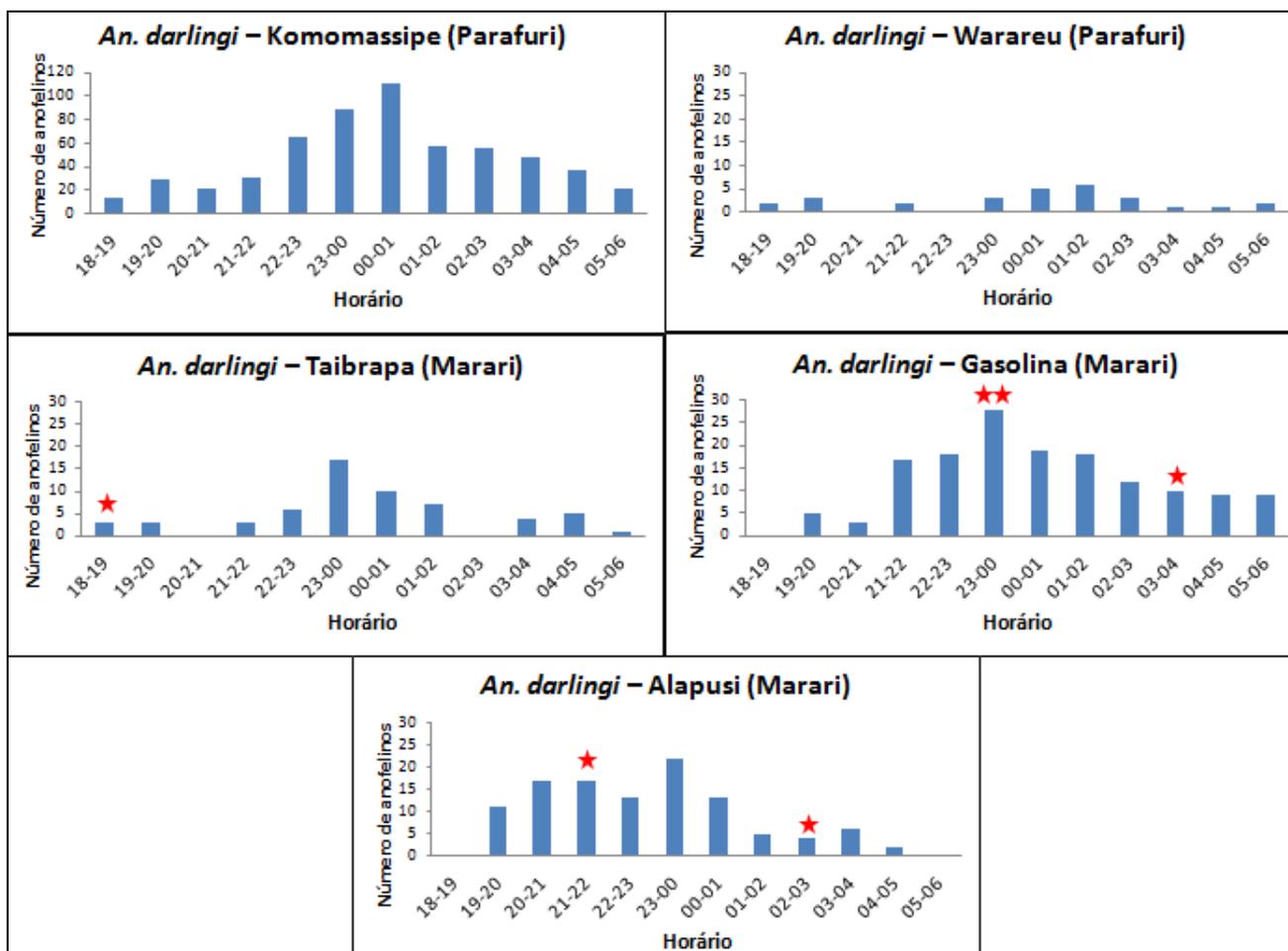


Figura 15. Frequência de *An. darlingi* nas comunidades do Polo Base Parafuri (Komomassipe e Warareu) e Marari (Taibrapa, Gasolina e Alapusi), por horário de captura (a partir das coletas de 12 horas). Cada ★ indica um exemplar de *An. darlingi* encontrado infectado com *P. vivax* durante as coletas de 12 horas. Adicionalmente, encontramos um *An. darlingi* infectado com *P. vivax* no Taibrapa, no horário de 20-21 durante as coletas de 18-22 horas (4 horas).

O *An. oswaldoi* s.l. apresentou atividade hematofágica durante toda a noite nas quatro comunidades de Toototobi e Parafuri, com um pico ao redor das 19-20 horas (Fig. 16). Em Raxasi, Apiahik e Koiopi foi observado também um segundo pico, entre 21-22 horas, mas de menor intensidade. Em Xaruna, *An.*

An. oswaldoi s.l. apresentou o horário de maior atividade entre 03 e 04 horas. Nas comunidades de Marari, coletamos, 22 *An. oswaldoi s.l.*, sendo 88,8% entre as 18 e 22 horas.

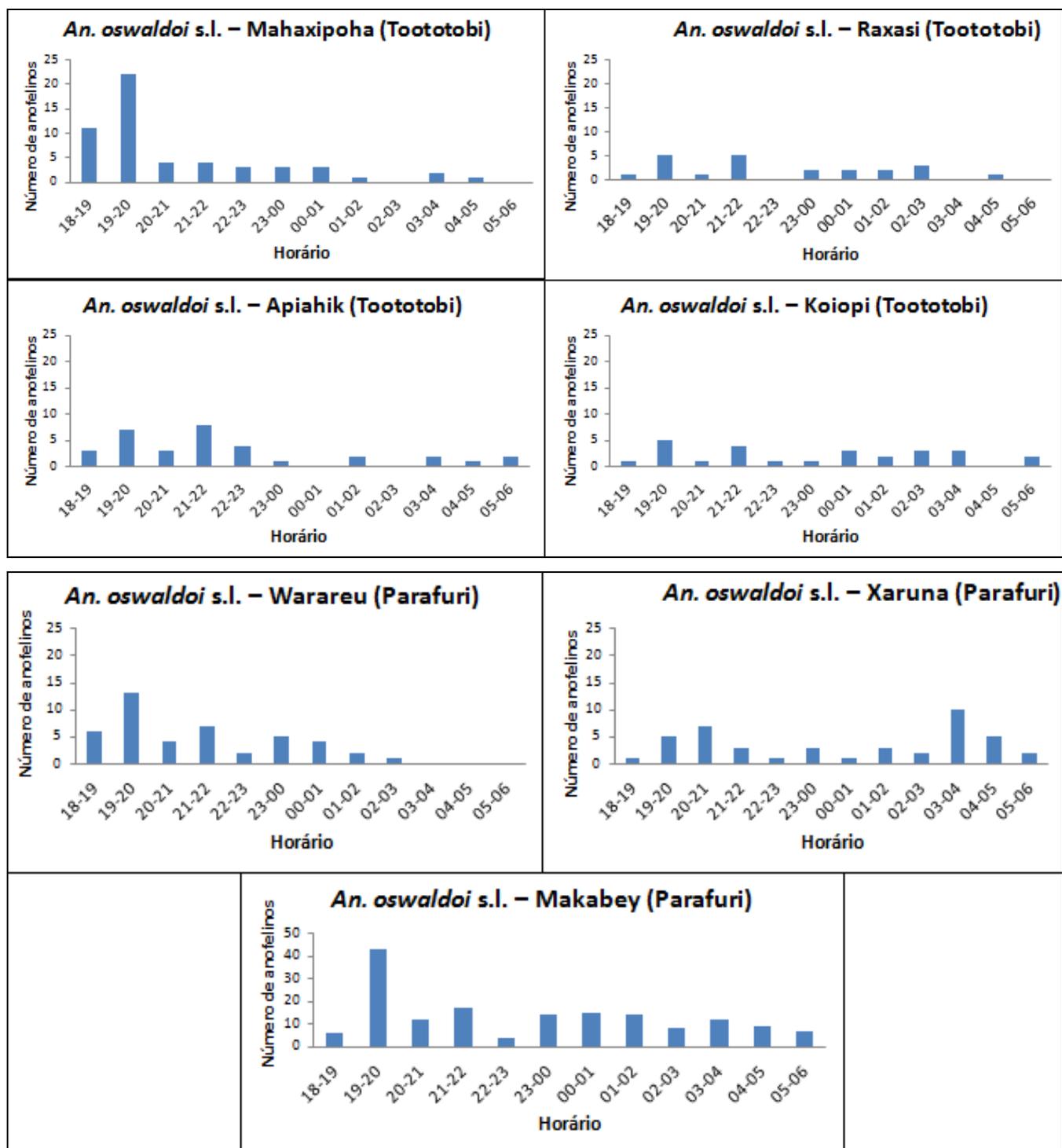


Figura 16. Frequência de *An. oswaldoi s.l.* nas comunidades do Polo Base Toototobi (Mahaxipoha e Raxasi, Apiahik e Koiopi) e Parafuri (Warareu, Xaruna e Makabey), por horário de captura (coletas de 12 horas).

Para outras espécies, obtivemos um número menor de exemplares, o que não permitiu determinar os picos de atividade. No entanto, houve algumas exceções. A atividade observada para *An. intermedius* na comunidade de Apiahik, no Toototobi mostrou um padrão bastante constante ao longo da noite com um pico principal das 21-22 horas e outro secundário entre as 01 e 02 horas (Fig. 17). Os dados referentes à atividade de picada de *An. nuneztovari s.l.* em Taibrapa 2, Marari, apontam um pico monomodal muito marcado para as duas primeiras horas da noite (entre às 18 e 20 horas). Depois deste pico, a atividade de *An. nuneztovari s.l.* caiu bruscamente até desaparecer no último horário da noite. Este pico acentuado de picada de *An. nuneztovari s.l.* coincide no espaço e tempo com aqueles do banho ou coleta de água na beira do rio Marari pelos Yanomami. Os dados apresentados para *An. nuneztovari s.l.* devem ser tomados com cautela, já que correspondem a uma única coleta de 12 horas no extradomicílio em setembro de 2014 (início da época seca) (Fig. 17).

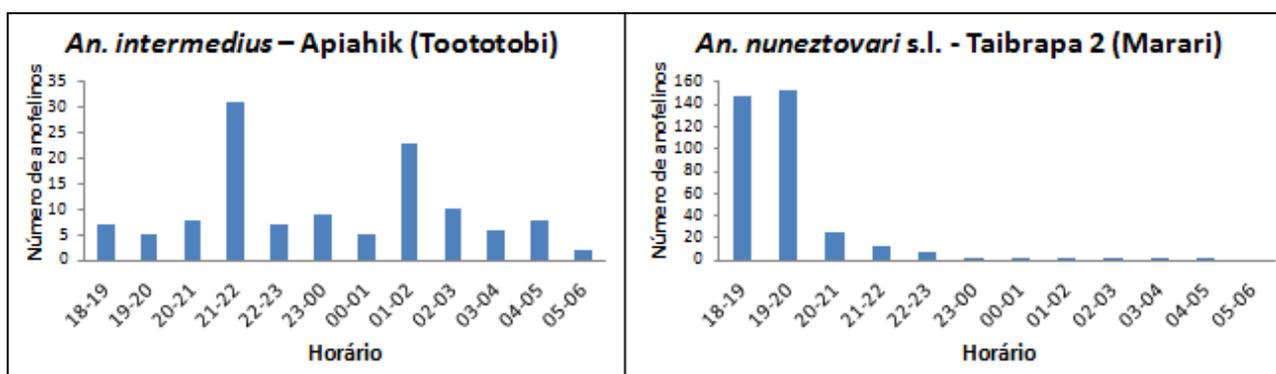


Figura 17. Frequência de *An. intermedius* e *An. nuneztovari s.l.* Nas comunidades de Apiahik (Toototobi) e Taibrapa 2 (Marari) respectivamente, por horário de captura (coletas de 12 horas).

4.6 Taxa de Picada Homem/Noite no peridomicílio em Toototobi e Parafuri.

Com base nos dados das coletas de 12 horas, no peridomicílio, foram calculadas as Taxas de Picada Homem por Noite (TPHN), sendo os resultados estratificados por espécie de mosquito e comunidade (Tabela 14). No Polo Base Parafuri, *An. darlingi* apresentou uma enorme heterogeneidade, desde comunidades com pouca atividade hematofágica deste vetor, até comunidades como, por exemplo, Komomassipe, onde foi calculada uma média de 64,3

picadas/pessoa/noite ao longo do período de estudo. A comunidade do Warareu foi a segunda com maior taxa para *An. darlingi* (TPHN = 3,1) no Parafuri. A taxa de picadas calculada para *An. oswaldoi s.l.* variou entre as comunidades desse mesmo Polo Base, desde 1,6 em Komomassipe até 17,9 picadas/homem/noite em Makabey. No Polo Base de Toototobi, a comunidade de Mahaxipoha apresentou a maior TPHN para *An. oswaldoi s.l.* (6,1) e a de Apiahik maior para *An. intermedius* (13,4). Considerando-se todas as espécies, as comunidades de Komomassipe (66,1) e Apiahik (18,6), dos Polos Base Parafuri e Toototobi, respectivamente, apresentaram as maiores taxas de picadas/homem/noite. Não foram realizadas capturas de 12 horas nos ambientes intradomiciliares, por isso não foi calculada a TPHN para esse ambiente.

Tabela 14. Taxa de Picada Homem/Noite - TPHN, calculada a partir das capturas de 12 horas, no ambiente peridomiciliar no Toototobi e Parafuri, de setembro de 2012 a julho de 2014.

Polo Base	Toototobi					Parafuri				
Comunidade	Mahaxipoha	Raxasi	Apiahik	Koiopi	Subtotal	Xaruna	Makabey	Warareu	Komomassipe	Subtotal
Homem-noite	9	9	9	9	36	9	9	9	9	36
<i>An. darlingi</i>	0	0	2	0	2	0	7	28	579	614
<i>An. darlingi</i> TPHN	0	0	0,2	0	0,2	0	0,8	3,1	64,3	17,1
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	55	22	33	27	137	43	161	44	14	262
<i>An. oswaldoi s.l.</i> TPHN	6,1	2,4	3,7	3	3,8	4,8	17,9	4,9	1,6	7,3
<i>An. intermedius</i>	0	0	121	19	140	2	0	3	1	6
<i>An. intermedius</i> TPHN			13,4	2,1	3,9	0,2		0,3		0,2
<i>An. triannulatus s.l.</i>	0	1	0	0	1	0	0	5	1	6
<i>An. triannulatus s.l.</i> TPHN								0,6		0,2
<i>An. mattogrossensis</i>	0	0	12	1	13	0	0	0	0	0
<i>An. mattogrossensis</i> TPHN			1,3		0,4					
Todas espécies TPHN	6,1	2,5	18,6	5,2	8,1	5	18,6	8,8	66,1	24,6

No Polo Base Marari, a avaliação da TPHN dos mosquitos coletados no peri- e extradomicílio revelaram os maiores índices para *An. darlingi* nas comunidades do Alapusi (11) e do Gasolina (10,57), enquanto que essa taxa para *An. nuneztovari s.l.* foi de 180 na comunidade Taibrapa 2. A menor TPHN foi observada na comunidade Castanha, de somente 0,42 picadas/homem/noite para o *An. darlingi* (Tabela 15).

Tabela 15. Taxa de Picada Homem/noite - TPHN, calculada a partir das capturas de 12 horas, no ambiente peridomiciliar e extradomiciliar no Polo Base Marari, no período de março 2013 a março de 2015.

Comunidade	Marari					Subtotal
	Alapusi	Castanha	Taibrapa	Taibrapa 2	Gasolina	
Homem-noite	10	12	9	2	14	47
<i>An. darlingi</i>	110	5	59	3	148	325
<i>An. darlingi</i> TPHN	11	0,42	6,55	1,5	10,57	6,91
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	1	5	5	4	4	19
<i>An. oswaldoi s.l.</i> TPHN		0,42	0,55	2	0,29	0,4
<i>An. intermedius</i>	7	1	1	0	9	18
<i>An. intermedius</i> TPHN	0,7				0,64	0,38
<i>An. nuneztovari s.l.</i>	0	0	0	360	0	360
<i>An. nuneztovari s.l.</i> TPHN				180		7,66
Todas espécies TPHN	11,8	0,92	7,2	183,5	11,5	15,35

4.7 Avaliação da paridade das fêmeas adultas.

Os resultados da dissecação dos ovários das fêmeas de anofelinos para determinação do estado de paridade estão apresentados na Tabela 16. Foram processados, 77 *An. darlingi* do Polo Base Parafuri (6,9% do total), todos da comunidade de Komomassipe, e 75 *An. oswaldoi s.l.* coletados em Parafuri (50) e Toototobi (25), que correspondem às espécies mais abundantes nestes Polos Base. Os exemplares de *An. oswaldoi s.l.* avaliados foram coletados nas quatro comunidades dos dois Polo Base.

Os nossos dados mostram que a taxa de paridade para o *An. darlingi* de Parafuri foi de 62,4% e para o *An. oswaldoi s.l.* de 54,2% e 50% no Toototobi e Parafuri, respectivamente. Nos horários de maior atividade do *An. darlingi*, esta taxa de paridade aumentou até um máximo de 80% (horário de 00-01). Encontramos taxas de paridade muito semelhantes nos picos de atividade do *An. oswaldoi s.l.* (entre as 18 e 22 horas), entre os dois Polos Base (50% no Parafuri e 47,2% no Toototobi). Estes resultados devem ser considerados com prudência devido ao tamanho amostral pequeno.

Tabela 16. Número absoluto de fêmeas paridas e nulíparas de *An. darlingi* em Parafuri e *An. oswaldoi s.l.* em Toototobi e Parafuri, de setembro 2012 a julho 2014.

	Nulíparas			Paridas			Nº total		
	Toototobi	Parafuri		Toototobi	Parafuri		Toototobi	Parafuri	
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	<i>An. darlingi</i>
18-19	3	7	1	2	7	0	5	14	1
19-20	4	9	1	3	3	1	7	12	2
20-21	1	3	1	2	6	1	3	9	2
21-22	2	4	1	2	9	3	4	13	4
22-23	0	0	3	0	1	3	0	1	6
23-00	0	1	6	1	0	6	1	1	12
00-01	0	0	4	2	0	16	2	0	20
01-02	0	0	3	1	0	3	1	0	6
02-03	1	0	3	1	0	8	2	0	11
03-04	0	0	2	0	0	3	0	0	5
04-05	0	0	2	0	0	1	0	0	3
05-06	0	0	2	0	0	3	0	0	5
Total(%)	11 (44)	24 (48)	29(37,6)	14 (56)	26 (52)	48 (62,4)	25	50	77

4.8 Infectividade para plasmódios - Resultados de PET-PCR + Nested PCR.

Foram processados um total de 2.475 anofelinos para a detecção de esporozoítos nas glândulas salivares, através das técnicas de PET-PCR e Nested-PCR. Foram incluídos todos os anofelinos coletados no Polo Base Marari ou seja, 2.014 anofelinos e 461 (27,3%) anofelinos coletados no Polo Base Toototobi, nas comunidades de Apiahik e Koiopi. Devido a limitações de tempo, só foram avaliados os anofelinos destas duas comunidades do Toototobi. Os resultados de infectividade e Taxas de Inoculação Entomológica para os anofelinos coletados no Marari, por comunidade e espécie são apresentados na Tabela 17. Somente os exemplares que apresentaram valores médios de CT (limiar de corte dos ciclos de amplificação) igual ou menores a 40,5 na PET-PCR foram considerados positivos. Foram realizados quatro painéis de PET-PCR e dois para Nested-PCR, nos 46 exemplares que tinham dado resultado com valor de CT abaixo de 45 na varredura inicial utilizando-se primers gênero específicos. Em sete dos oito exemplares de *An. darlingi* encontrados infectados pelo método da PET-PCR, foi possível determinar a espécie de plasmódio infectante. Obtivemos resultados positivos para Nested-PCR, sendo que, em todos os casos, as infecções eram devidas ao *P. vivax* (*Pv*). Num exemplar, a Nested-PCR deu negativa, mas tivemos resultados

positivos com a PET-PCR utilizando *primers* específicos para *P. vivax* (*Pv*). Em termos gerais, obtivemos valores de CT mais elevados utilizando os primers específicos para *Pv*, que quando utilizamos aqueles para a detecção de gênero de plasmódio com esta técnica.

As taxas de infectividade por *P. vivax* encontradas para o *An. darlingi* foram de 1,63%, 1,52% e 2,02% nas comunidades Alapusi, Gasolina e Taibrapa, do Polo Base Marari, respectivamente. Os *An. darlingi* infectados com *P. vivax* foram coletados principalmente no ambiente peridomiciliar (6) e um no extradomicílio próximo. Os horários de ocorrência destes anofelinos infectados variou desde às 18 até às 03 horas.

As Taxas de Inoculação Entomológica (TIE) indicam o número de picadas infectantes que uma pessoa pode receber por unidade de tempo (normalmente expressado por mês ou por ano). Calculamos a Taxa de Inoculação Entomológica para o *An. darlingi*, o único anofelino que confirmamos infectado na região do Marari. Este parâmetro é calculado como o produto da Taxa de Picada no Homem por Noite (TPHN) e a Taxa de Infecção (TI) por esporozoítos dos anofelinos capturados. Quando se quer expressar a TIE por ano (TIEA), multiplica-se este produto por 365 dias. Obtivemos umas TIEA de 65,4, 58,6 e 48,3 picadas infectantes por pessoa por ano nas comunidades de Alapusi, Gasolina e Taibrapa respectivamente.

Adicionalmente, encontramos um *An. darlingi* e um *An. nuneztovari* s.l. infectados com *Plasmodium sp.* coletados no intradomicílio e extradomicílio no Gasolina e Taibrapa 2 respectivamente. Dos anofelinos processados na primeira campanha do Toototobi, foram encontrados quatro *An. intermedius* infectados com *Plasmodium sp.*, dois na comunidade de Apiahik e dois no Koiopi. No entanto, tampouco foi possível a confirmação da espécie de plasmódio infectando estes exemplares por Nested-PCR ou com primers específicos de espécie plasmodial na PET-PCR.

Tabela 17. Espécies de anofelinos positivos por comunidade do Polo Base Marari. Taxa de Infectividade (%) e Taxa de Inoculação Entomológica anual.

Comunidade	Espécie	Número de vetores testados	Número de positivos Pv (TI*)	Densidade Média	Taxa de Inoculação Entomológica Anual
Castanha	<i>An. darlingi</i>	8	0		
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	34	0		
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	1	0		
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	1	0		
	<i>An. intermedius</i>	7	0		
	<i>An. sp.</i>	19	0		
Alapusi	<i>An. darlingi</i>	123	2 (1,63%)	11	65,4
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	6	0		
	<i>An. intermedius</i>	13	0		
	<i>An. sp.</i>	2	0		
Gasolina	<i>An. darlingi</i>	197	3 (1,52%)	10,57	58,6
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	13	0		
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	3	0		
	<i>An. intermedius</i>	14	0		
	<i>An. costai- like</i>	1	0		
	<i>An. sp.</i>	21	0		
Taibrapa	<i>An. darlingi</i>	99	2 (2,02%)	6,55	48,3
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	58	0		
	<i>An. intermedius</i>	2	0		
	<i>An. sp.</i>	16	0		
Taibrapa 2	<i>An. darlingi</i>	8	0		
	<i>An. nuneztovari s.l.</i>	1101	0		
	<i>An. oswaldoi s.l.</i>	27	0		
	<i>An. mattogrossensis</i>	21	0		
	<i>An. triannulatus s.l.</i>	25	0		
	<i>An. sp.</i>	194	0		
Total		2014	7 (0,38%)		
* Taxa de Infecção					

4.9 Nova proposta de classificação de criadouros de anofelinos Amazônicos.

A classificação dos criadouros naturais foi baseada em três parâmetros ambientais principais: a conexão com os pulsos de inundação, a temporalidade dos corpos de água e o grau de exposição ao sol. Foram mantidas as siglas em inglês de acordo com o artigo (Anexo X).

Os criadouros naturais de anofelinos foram classificados nos sete tipos seguintes: 1. Lagos associados aos rios (LAR), subdivididos em 1.1. Lagos tipo *oxbow* ou em ferradura (OX) e 1.2. Lagos não *oxbow* ou sem forma de ferradura (NOX); 2. Áreas inundadas associadas aos rios (FAAR); 3. Áreas inundadas não associadas aos rios (FANAR); 4. Poças de Chuva (RP); 5. Córregos (SFS); 6. Igarapés (MFS) e 7. Rios (RIV) (Fig. 18).

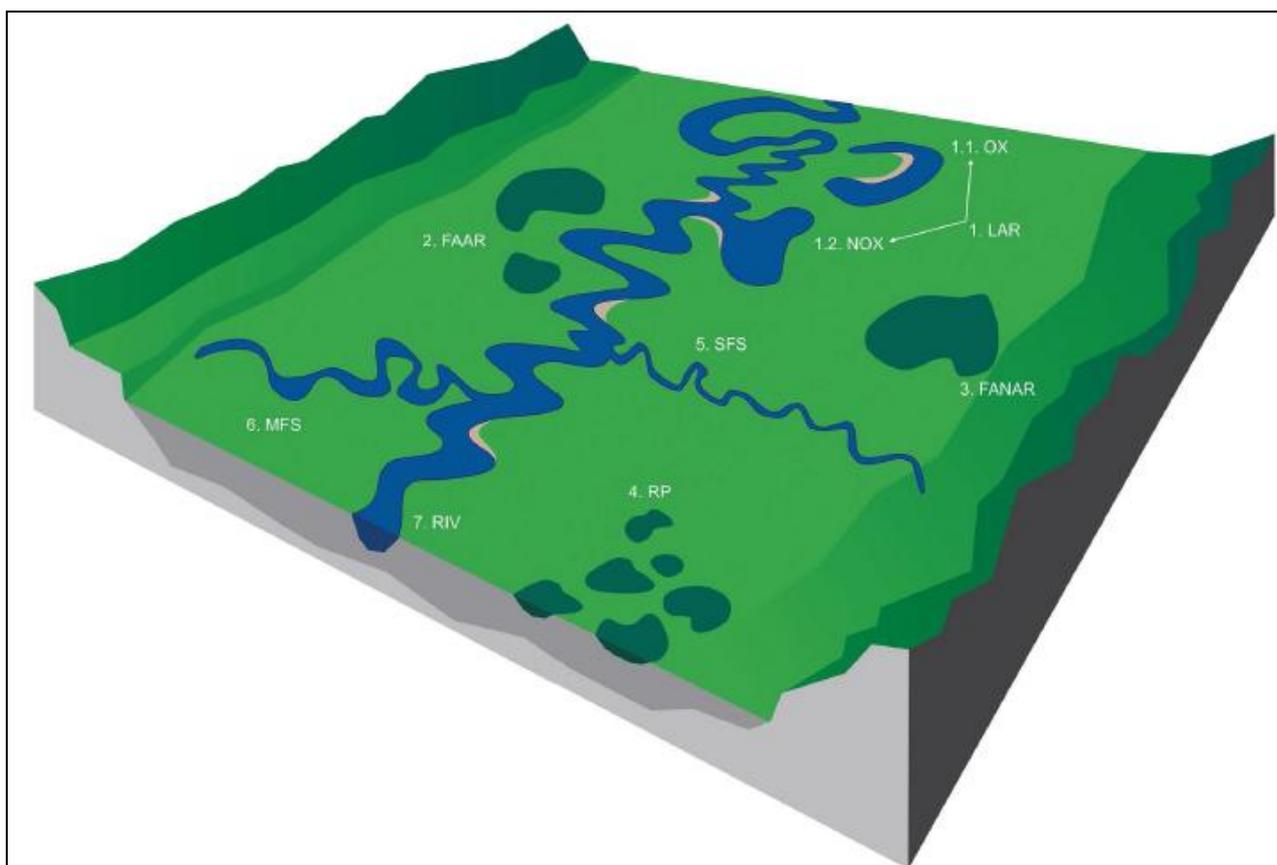


Figura 18. Classificação dos diferentes criadouros propostos e a sua associação com os pulsos de inundação dos rios de baixa ordem na área Yanomami do Brasil.

1. Lagos associados aos rios (LAR) - Todos os criadouros localizados na planície aluvial estão diretamente associados às flutuações dos níveis dos rios. Este fenômeno acontece porque os criadouros se inundam quando o rio transborda. Quando a inundação retrocede, águas estagnadas são mantidas nas depressões do terreno gerando esses tipos de criadouros [156]. LAR podem apresentar fases de isolamento variáveis durante as épocas de chuva e seca, oscilando no tempo segundo a frequências dos pulsos de inundação. Durante a fase de isolamento dos LAR, outras fontes de água podem manter o lago, como são a contribuição de SFS que drenam a floresta vizinha, influxo de águas subterrâneas e chuva. Por outro lado, forças de evaporação tendem a diminuir os níveis de água nos lagos [157]. De acordo com a forma, origem geomorfológica e abundância, os LAR podem ser separados em: 1.1. Lagos tipo *oxbow* (OX) e 1.2. Lagos não *oxbow* (NOX).

1.1. Lagos tipo *oxbow*, ou em ferradura (OX) - Os OX são antigos cursos dos rios e apresentam uma forma em tipo de U (U-LAR). Estes lagos são gerados a partir do isolamento de um meandro de rio através das forças de erosão e sedimentação ao longo das margens dos rios [158]. Os tamanhos dos OX podem variar dependendo da porção antiga do rio que foi isolada do canal do rio ativo. Nas três áreas Yanomami, foi amostrado um total de 31 OX, sendo todos eles permanentes, inclusive nos meses mais secos do ano. A maioria deles estava parcial ou bem expostos ao sol. Na Figura 19, são apresentadas duas imagens LANDSAT que ilustram dois diferentes segmentos do rio Parima que cruza parte da área Yanomami de Parafuri. Enquanto a comunidade de Makabey está localizada num segmento do rio mais sinuoso e, portanto, que formou maior número de lagos do tipo OX, a comunidade de Xaruna está localizada rio acima, num segmento onde não existe nenhuma OX nas proximidades. O OX 1 e 2 de Makabey foram amostrados no estudo, e foram positivos para larvas de anofelinos. O Oxbow 3 não foi amostrado porque se encontrava a mais de 1 km das habitações Yanomami. O OX 1 corresponde a uma U-LAR que está permanentemente conectada a um pequeno tributário do rio Parima, enquanto o Oxbow 2 foi um segmento antigo do Rio Parima que está atualmente bem desconectado do curso principal do rio e apresenta uma grande abundância de vegetação emergente e macrófitas submersas. Somente pulsos de inundação extremos do rio Parima alimentam este OX.

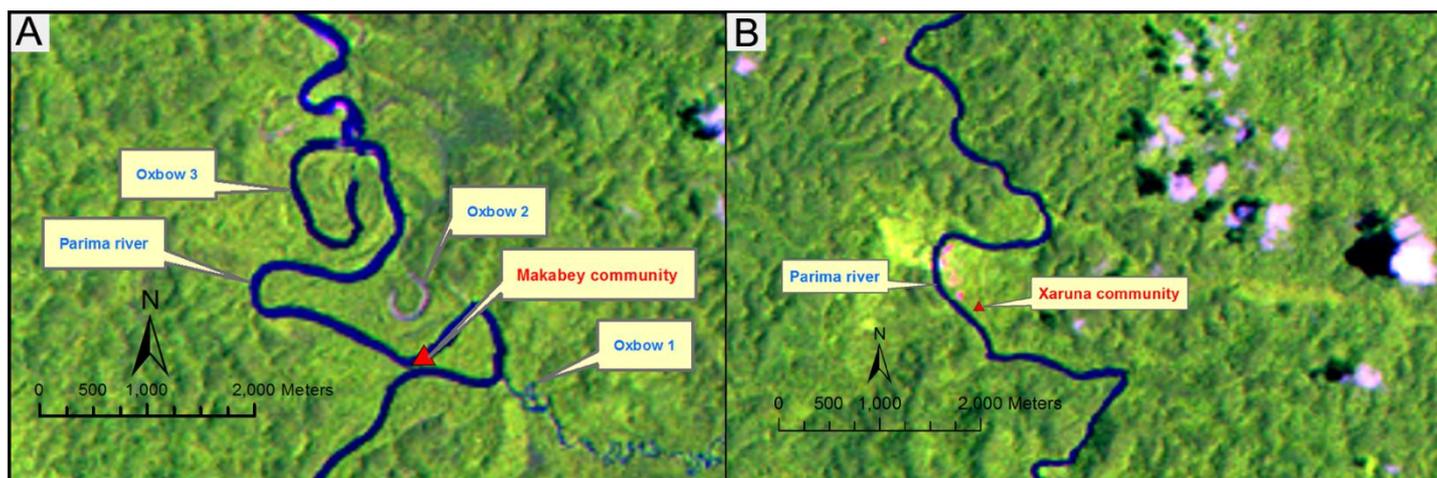


Figura 19. Imagens LANDSAT (projeto PRODES 2011) mostrando a localização da comunidade de Makabey (A) e Xaruna (B) ao longo do rio Parima, na área de Parafuri.

1.2. Lagos não oxbow, ou sem forma de ferradura (NOX) - Este tipo de lagos são também corpos de água permanentes e estão normalmente parcialmente ou bem expostos ao sol. Os NOX encontrados nas áreas de estudo eram geralmente menores que os OX. Classificamos como NOX alguns pequenos corpos de água de menos de 200 m², baseados na temporalidade do criadouro (sempre permanentes) e a associação com as flutuações dos níveis de água dos rios. Estes tipos de lagos podem ser mais importantes como criadouros em regiões sob influência de grandes rios, onde os típicos U-LAR são mais escassos [159].

Existem diferentes níveis de conectividade entre os OX e NOX e os rios que os alimentam. Baseado em Junk et al. [73], os níveis de conectividade hidrológica foram classificados em: a) alta conectividade: quando o lago está sempre conectado ao rio, até mesmo nas situações de mais baixo nível de água durante a época seca; b) conectividade intermédia: lagos alimentados quando o rio está em níveis altos de água; c) baixa conectividade: LAR que somente são conectadas ao rio depois de pulsos de inundação extremos e constituem corpos de água permanentes mais isolados do rio principal.

2. Áreas inundadas associadas aos rios (FAAR) - As FAAR são criadouros temporários cuja principal fonte de água também provem dos Pulsos de Inundação (PI). As FAAR têm tamanhos muito variáveis e diferentes graus de

exposição ao sol. Os pulsos de inundação ocorrem com maior frequência durante a época das chuvas, embora alguns pulsos de inundação imprevisíveis, que levam a alagamentos das planícies de inundação adjacentes, podem também ocorrer durante os meses da seca nas áreas associadas aos rios de baixa ordem [160]. As FAAR são tipos de criadouro comuns nas áreas Yanomami, e devido aos seus diferentes graus de exposição ao sol, as FAAR aumentam a densidade de larvas e diversidade de espécies de anofelinos de forma sazonal. Como para as LAR, o local onde o rio alimenta cada um deste tipo de criadouro foi identificado. As FAAR permanecem vários meses secos e não possuem macrófitas submersas. Porém, algas filamentosas verdes podem proliferar nos casos em que estão profusamente expostas ao sol.

3. Áreas inundadas não associadas aos rios (FANAR) - Estes tipos de corpos de água são quase sempre sombreados, distantes e desconectados dos rios. Sua origem está associada ao incremento das chuvas durante os meses mais chuvosos do ano. As FANAR apresentaram tamanhos variáveis, desde vastas áreas no pico da estação chuvosa à corpos de água pequenos ou totalmente secos durante os meses mais secos do ano. Em consequência, a maioria das FANAR são temporárias e não apresentaram macrófitas submersas ou algas filamentosas. Anofelinos que preferem criadouros totalmente sombreados proliferaram mais facilmente neste tipo de criadouro.

4. Poças de Chuva (RP) - As RP são criadouros temporários que ocorrem em depressões pequenas, rasas e bem definidas no solo da floresta, sendo, portanto, dependentes das chuvas e não dos rios. Por isso, as RP apresentam algumas características semelhantes as FANAR, já que elas não são associadas aos PI e estão normalmente em áreas muito sombreadas. No entanto, as RP são criadouros mais efêmeros que as FANAR. Na área Yanomami, as RP foram encontradas no interior de mata Amazônica preservada e portanto, totalmente sombreados. RP expostas ao sol foram também encontradas depois de eventos de desmatamento para a criação de áreas de cultivo próximas às comunidades. Como no caso das FANAR, as espécies de anofelinos que preferem os habitat sombreados prevaleceram nas RP.

5. Córregos (SFS) - São criadouros que têm ≤ 5 metros de largura e são normalmente sombreados, pois drenam as áreas interiores da floresta para os rios ou MFS mais próximos. Muitos SFS interconectam outros tipos de criadouros. Por exemplo, uma FANAR distante pode estar conectada através de um SFS com uma FAAR, a qual recebe também água diretamente dos pulsos de inundação. Muitos SFS secam durante a metade da época seca. Gradualmente, os SFS tenderam a formar poças mais cedo durante a época seca, potencialmente favorecendo o incremento da densidade de certas espécies de anofelinos durante este período.

6. Igarapés (MFS) - Os MFS são corpos de água entre 5 e 10 metros de largura, quase sempre sombreados e drenando áreas de floresta para o rio mais próximo. Na área submontana de Parafuri, a maior parte dos SFS e MFS, independentemente da sua largura, tiveram certa correnteza, inclusive nos meses mais secos do ano. Os MFS formam poças mais frequentemente no final da época seca nas áreas de floresta ombrófila de planície de terras baixas. Diferentes espécies de anofelinos serão favorecidas, dependendo do grau de correnteza e do número e qualidade de poças formadas no leito dos MFS.

7. Rios (RIV) - Todos os rios que encontramos em nossas áreas de estudo podem ser classificados como rios de baixa ordem [160]. Adicionalmente, classificamos os rios de baixa ordem em subtipos segundo a sua largura, em três categorias: pequenos (5 a 15 metros), médios (15 a 100 metros) e grandes (mais de 100 metros). Embora alguns MFS e rios pequenos possam coincidir na sua largura entre os 5 e 10 metros, a principal característica que os diferencia nas áreas de floresta ombrófila de planície de terras baixas é o caráter permanente dos rios e o temporário dos MFS (formam poças ou secam completamente). Os tamanhos e larguras das LAR, especialmente dos OX, seguiram os tamanhos dos rios correspondentes. As características dos grandes rios Amazônicos diferem dos rios pequenos, afetando a dinâmica dos potenciais criadouros naturais associados a estes rios. Apresentamos um exemplo de cada tipo de criadouro na Figura 20.

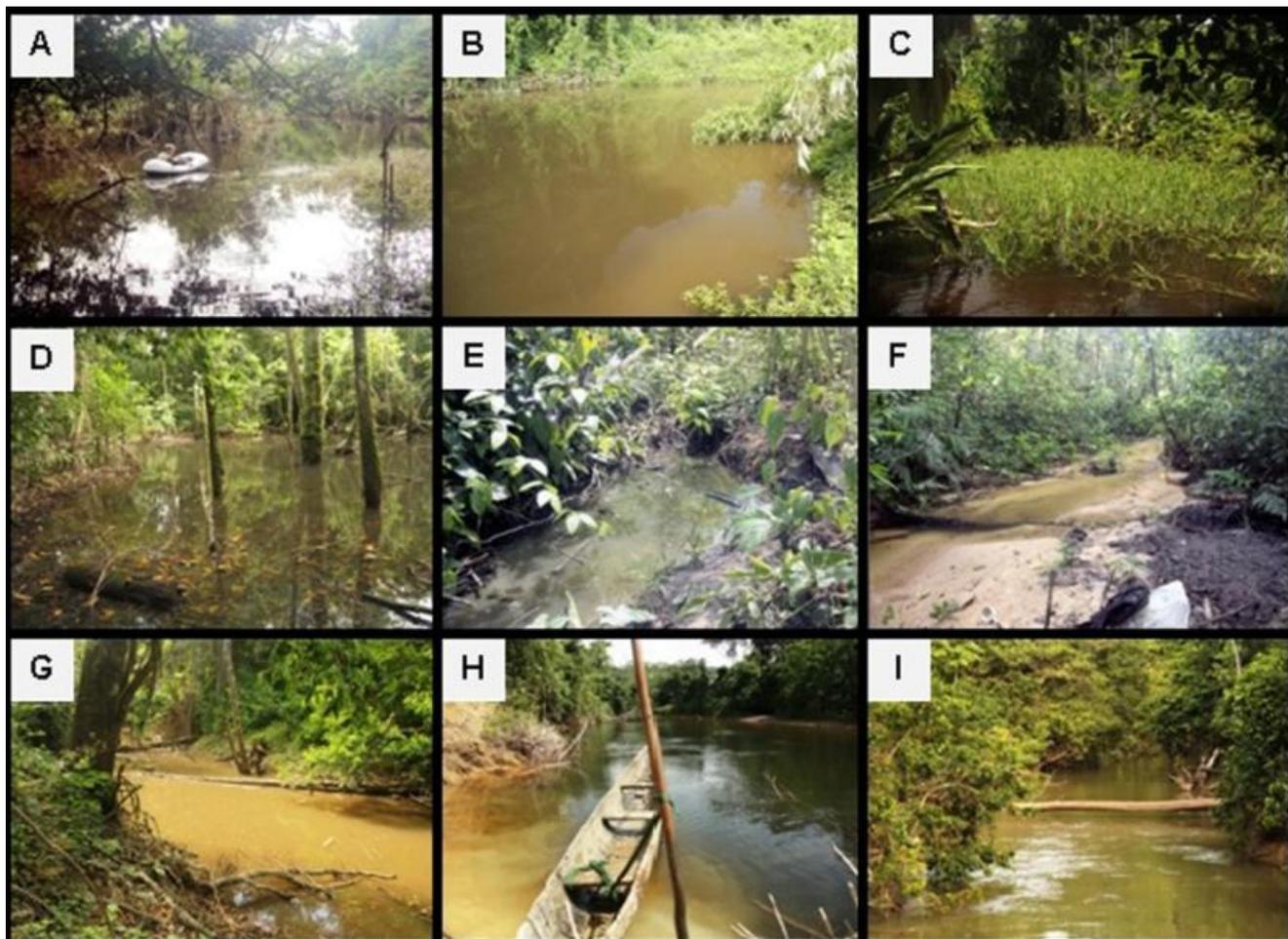


Figura 20. Criadouros naturais de anofelinos nas áreas estudadas. **A.** Lago tipo *oxbow* ou de ferradura (OX) em Komomassipe - Parafuri; **B.** Lagos não *oxbow* (NOX) com forma circular em Alapusi – Marari; **C.** Áreas inundadas associadas aos rios (FAAR) em Apiahik – Toototobi; **D.** Áreas inundadas não associadas aos rios (FANAR) em Apiahik – Toototobi; **E.** Poças de Chuva (RP) expostas ao sol em Komomassipe – Parafuri; **F.** Exemplo de córrego (SFS) em Warareu – Parafuri; **G.** Exemplo de igarapé (MFS) em Koioipi – Toototobi; **H e I.** rios (RIV) de baixa ordem de tamanho médio Inajá e Toototobi, encontrados nas áreas de Toototobi e Parafuri, respectivamente.

4.10 Tipos de criadouros de anofelinos encontrados em Toototobi, Parafuri e Marari.

Foram identificados 160 criadouros entre os três Polos Base (Tabela 18). No Toototobi e Parafuri, foram incluídos no estudo um total de 54 e 53 criadouros amostrados ao longo das oito campanhas, entre janeiro de 2013 e julho de 2014, respectivamente. Já para Marari, o número total de criadouros mapeados foi de 53. Em termos gerais, os criadouros tipo LAR-OX foram mais abundantes no Marari, onde representaram 30,2% do total amostrados. Os LAR-OX só representaram 14,8% e 13,2% dos criadouros no Toototobi e

Parafuri, respectivamente. Os criadouros tipo LAR-NOX foram mais abundantes no Parafuri e Marari, sendo encontrado um só deste criadouro no Toototobi. Em contraste, os criadouros tipo FANAR foram muito mais abundantes no Toototobi (31,5%) que no Marari (7,5%).

As espécies de anofelinos mais frequentes na floresta como *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius* ou *An. costai-like*, foram mais frequentes nas regiões onde os criadouros sombreados, como os MFS ou as FANAR foram abundantes. A área de planície cercada pelas altas serras do Marari, apresentou um número maior de rios em relação ao Parafuri e Toototobi. No entanto, as comunidades de uma região podem estar vinculadas ao mesmo rio. Em questão de cursos de água de floresta menores, como SFS e MFS, a região submontana do Parafuri foi a que apresentou um maior número. Os SFS e MFS drenam para os rios mais próximos às abundantes serras desta região.

A disponibilidade dos diferentes tipos de criadouros também foi muito variável entre comunidades próximas de um mesmo Polo Base. Por exemplo, a comunidade Koiopi, no Polo Base de Toototobi, encontra-se distante de rio de baixa ordem próximo e, por conta disso, não encontramos criadouros associados ao rio (OX, NOX e FAAR) em um raio de 1 km desta comunidade. Pelo contrário, os criadouros tipo FANAR, constituíram 71,4% dos corpos de água passíveis de se tornarem criadouros próximos ao Koiopi. As outras três comunidades deste Polo Base se encontram próximas ao rio Toototobi. Em consequência, apresentam um número variável de criadouros dependentes dos PI. A comunidade de Apiahik foi a que apresentou um número maior de criadouros (18).

No caso do Polo Base de Parafuri, foi mapeado um maior número de NOX. O número máximo de LAR por comunidade foi de oito (quatro OX e quatro NOX) no caso do Warareu, e de só um NOX, no caso do Xaruna. Em contraste, foram encontrados cinco SFS e quatro MFS em um raio de 1 km do Xaruna, enquanto somente dois SFS foram encontrados nas proximidades do Warareu. No Polo Base Marari também houve uma marcada heterogeneidade entre as diferentes comunidades, com sete LAR encontrados na região da comunidade do Alapusi, contrastando com só uma OX em um raio de 1 km da comunidade do Gasolina.

Tabela 18. Número absoluto e percentual dos tipos de criadouros encontrados em Toototobi, Parafuri e Marari.

Polo Base / Comunidade		LAR-OX N(%)	LAR-NOX N(%)	FAAR N(%)	FANAR N (%)	RP N(%)	SFS N(%)	MFS N(%)	RIV N(%)	TOTAL N(%)
Toototobi	Mahaxipo	2 (20)	0	2 (20)	3 (30)	0	1 (10)	1 (10)	1 (10)	10
	Raxasi	2 (16,7)	0	3 (25)	2 (16,7)	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	1 (8,3)	12
	Apiahik	4 (22,2)	1 (5,6)	6 (33,3)	2 (11,1)	0	2 (11,1)	2 (11,1)	1 (5,6)	18
	Koiopi	0	0	0	10 (71,4)	0	1 (7,1)	3 (21,4)	0	14
subtotal		8 (14,8)	1 (1,9)	11 (20,4)	17 (31,5)	1 (1,9)	5 (9,3)	8 (14,8)	3 (5,6)	54
Parafuri	Xaruna	0	2 (13,3)	0	3 (20,0)	0	5 (33,3)	4 (26,7)	1 (6,7)	15
	Makabey	1 (10)	0	1 (10)	4 (40)	0	1 (10)	2 (20)	1 (10)	10
	Warareu	4 (23,5)	4 (23,5)	3 (17,6)	2 (11,8)	0	2 (11,8)	0	2 (11,8)	17
	Komomas	2 (18,2)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)	3 (27,3)	1 (9,1)	1 (9,1)	11
Subtotal		7 (13,2)	7 (13,2)	5 (9,4)	10 (18,9)	1 (1,9)	11 (20,8)	7 (13,2)	5 (9,4)	53
Marari	Alapusi	3 (21,4)	4 (28,6)	1 (7,1)	1 (7,1)	1 (7,1)	1 (7,1)	1 (7,1)	2 (14,3)	14
	Castanha	5 (45,5)	0	1 (9,1)	0	1 (9,1)	3 (27,3)	0	1 (9,1)	11
	Taibrapa	4 (40)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	0	1 (10)	0	2 (20)	10
	Taibrapa 2	3 (33,3)	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	1 (11,1)	2 (22,2)	1 (11,1)	9
	Gasolina	1 (11,1)	0	4 (44,4)	1 (11,1)	0	1 (11,1)	0	2 (22,2)	9
Subtotal		16 (30,2)	6 (11,3)	7 (13,2)	4 (7,5)	2 (3,8)	7 (13,2)	3 (5,7)	8 (15,1)	53
TOTAL		31 (19,4)	14 (8,8)	23 (14,3)	31 (19,3)	4 (2,5)	23 (14,4)	18 (11,3)	16 (10)	160

As características intrínsecas dos diferentes criadouros e dentro de um mesmo tipo de criadouro foram variáveis. Na Tabela 19, mostramos um resumo das principais características destes. Os parâmetros principais para descrevermos os criadouros foram a associação com os Pulsos de Inundação dos rios, a temporalidade dos corpos de água e o grau de exposição ao sol. Outras variáveis secundárias foram a presença de vegetação submersa ou emergente, a frequência de algas filamentosas verdes e os graus de correnteza. Todas as características foram classificadas numa escala de frequências de 0 (característica ausente), 1 (baixa frequência), 2 (frequência média) e 3 (alta frequência).

No caso dos OX, para a variável "Exposição ao sol" foram dados valores entre 0 e 3, o que significa que encontramos alguns lagos OX que foram totalmente sombreados (valor 0) e outros que estavam muito expostos ao sol (valor 3). Para as características de temporalidade, observamos que todas os LAR foram classificados como permanentes (valor 3), todas as FAAR e RP secaram por algum tempo do ano (valor 0) e alguns poucos habitats, como as FANAR, MFS e SFS apresentaram variabilidade nesta característica (valor 0 a 1). Por exemplo, das 31 FANAR incluídas neste estudo, somente cinco (16,2%)

tinham água em todas as coletas, e portanto, podem ser considerados corpos de água permanentes. Finalmente, os dois tipos de LAR e todas as FAAR (valor 3) são formados principalmente pelo efeito dos PI, enquanto as FANAR e RP tiveram suas origens principalmente a partir das águas das chuvas (valor 0). Os cursos menores localizados dentro de floresta, como os SFS e MFS, experimentaram um influxo variável de água proveniente do rio quando a cota dos rios principais aumenta significativamente.

Tabela 19. Principais características ambientais dos criadouros nas áreas de estudo associados aos rios de baixa ordem.

Tipo de criadouro	Pulsos de inundação	Permanente	Exposição ao sol	Macrófitas submersas	Vegetação emergente	Algas filamentosas	Correnteza
LAR-OX	3	3	0-3	0-3	2	0-3	0
LAR-NOX	3	3	0-3	0-3	2	0-3	0
FAAR	3	0	0-3	0	2	0-3	0
FANAR	0	0-1	0-1	0	0-1	0	0
RP	0	0	0-1	0	0-1	0-1	0
SFS	1	0-1	0-1	0-1	1	0-1	2
MFS	1	0-1	0-1	0-1	1	0-1	1
RIV	3	3	2	0	1	0	3

As características ambientais dos criadouros foram ordenadas em: 0=ausente, 1=baixa, 2=média e 3=alta frequência.

4.11 Características dos rios em Toototobi, Parafuri e Marari.

Todas as comunidades nas áreas estudadas estão vinculadas a segmentos de rios de baixa ordem, classificados segundo Stralher [69], com exceção da comunidade de Koiopi, do Toototobi, que não está próxima a nenhum rio. A Tabela 20 descreve as características dos rios de cada comunidade.

Tabela 20. Características dos rios das comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.

Polo Base	Comunidades	Rios	Ordem	Largura média (m)
Toototobi	Mahaxipoha	Toototobi	3	34
	Raxasi	Toototobi	3	18
	Apiahik	Toototobi	3	18
	Koiopi	Nenhum		
Parafuri	Xaruna	Parima	5	53
	Makabey	Parima	5	71
	Warareu	Inajá/Tributário Inajá	3/2	22/11
	Komomassipe	Inajá	3	30
Marari	Alapusi	Marari/Bacati	2/1	25/10
	Castanha - Ahima	Xirinita	1	5
	Taibrapa	Catanal/Taibrapa	1/1	9/8
	Taibrapa 2	Marari	3	35
	Gasolina	Marari/Catanal	2/1	28/10

4.12 Área Efetiva de Criação (AEC) por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi e Parafuri.

Os dados da Figura 21, ilustram a heterogeneidade dos diferentes tipos de AEC nas comunidades de Parafuri e Toototobi. Os dados correspondem ao período de transição chuva-seca em Toototobi (setembro/2013) e Parafuri (julho/2013). Durante este período, os criadouros permanentes tendem a estabilizar os seus tamanhos e a maioria dos criadouros temporários ainda contêm água. Além disto, situações de floresta alagada de alguns criadouros associados aos rios e FANAR muito grandes que são impossíveis de mensurar com precisão durante a época chuvosa, não se encontram mais. Amostramos dados de AEC para o Parafuri de uma campanha anterior, já que este Polo Base teve o início da época seca antecipado em comparação com o Toototobi. De fato, alguns criadouros de Parafuri durante a campanha de setembro de 2013 já estavam secos e outros já tinham o seu AEC máximo muito retraído (especialmente para os criadouros tipo FANAR).

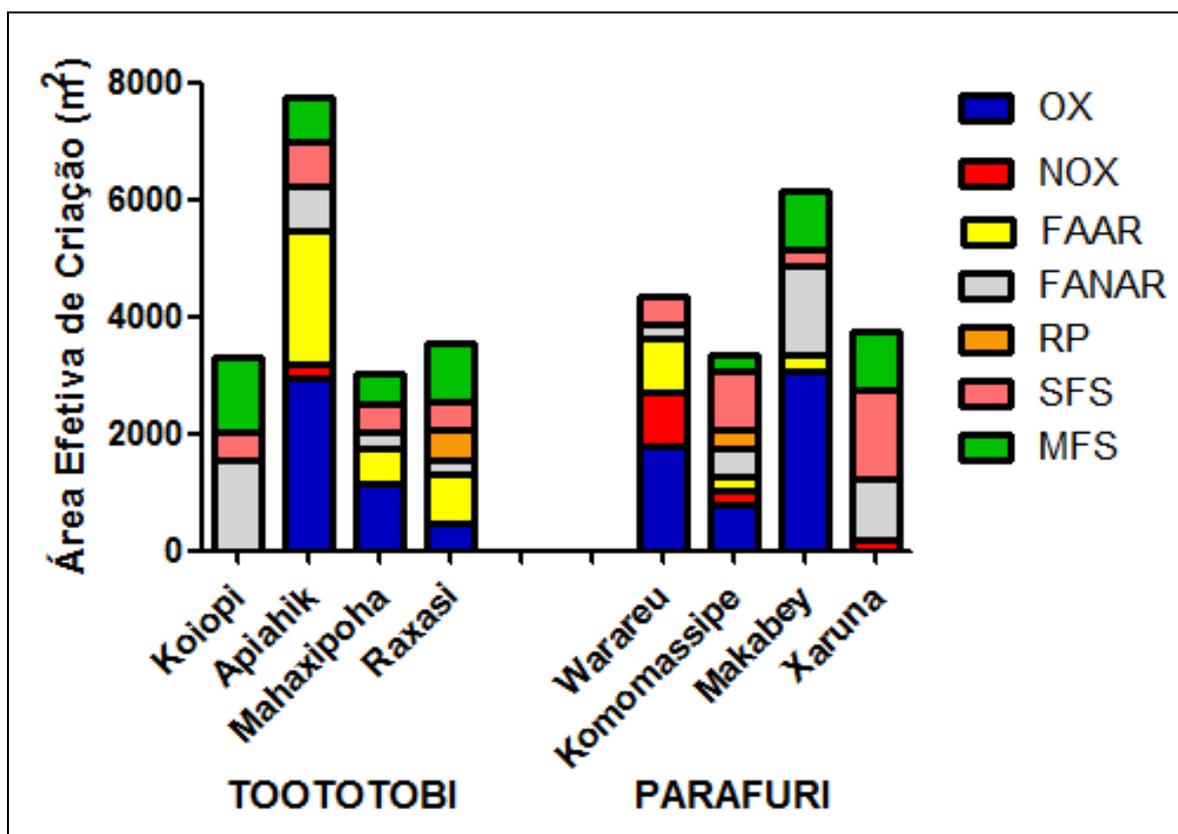


Figura 21. Total da AEC por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi e Parafuri, na época de transição entre o período de chuva e a seca.

4.13 Localização dos criadouros nas comunidades de Toototobi, Parafuri e Marari.

Mostramos, na Figura 22, a localização exata dos criadouros encontrados em um raio de 1 km e que foram identificados nas comunidades do Toototobi. Todas as comunidades, exceto Koiopi, estão próximas ao rio de baixa ordem, ou seja, o rio Toototobi. No Koiopi só foram identificados criadouros não associados aos PI (FANAR, SFS e MFS), enquanto que nas outras comunidades encontramos criadouros tanto sob a influência dos PI do rio Toototobi quanto sob a influência principal das chuvas.

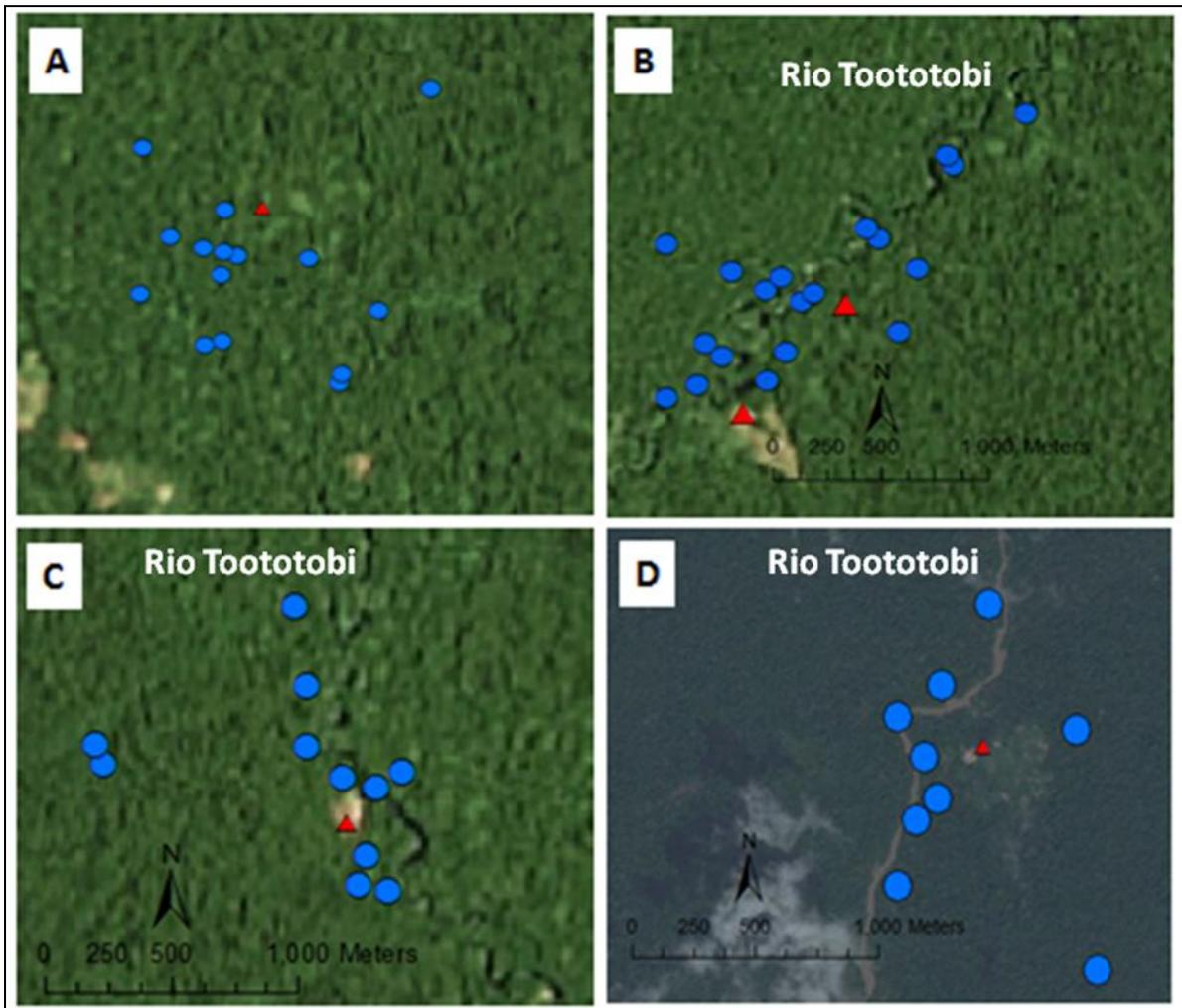


Figura 22. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) do Polo Base de Toototobi. **A.** Koioipi; **B.** Apiahik; **C.** Raxasi e **D.** Mahaxipoha. Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery.

A localização exata dos criadouros num radio de 1 km das comunidades do Parafuri estão representados na Figura 23. A maioria dos criadouros de Parafuri se encontram próximos ao rio Parima, nas comunidades de Xaruna e Makabey, ao rio Inajá, nas comunidades de Komomassipe e Warareu e a um afluente do rio Inajá na comunidade de Warareu. Também estão representadas na Figura 23 as comunidades do Parafuri, formadas por várias edificações menores numa área geográfica próxima, constituindo um núcleo comunitário unido.

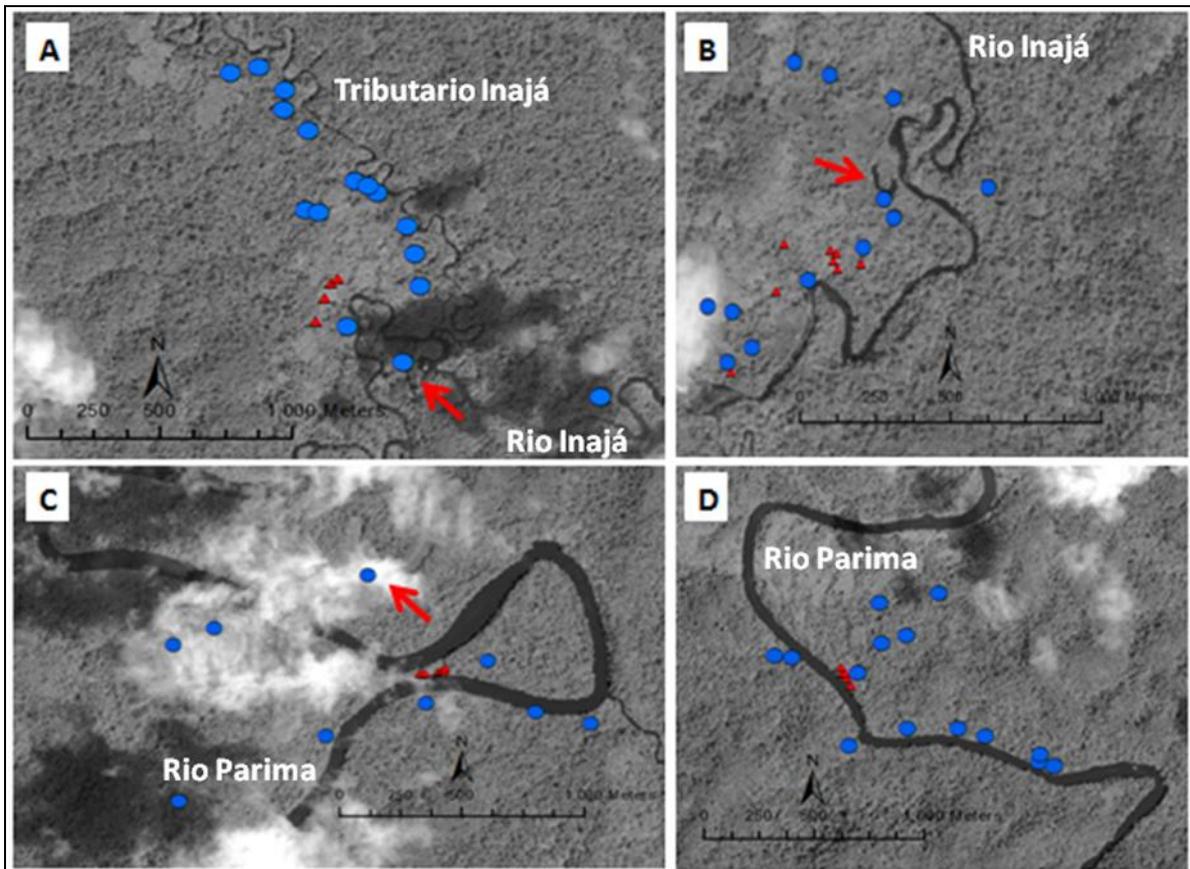


Figura 23. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) no Polo Base Parafuri. **A.** Warareu; **B.** Komomassipe; **C.** Makabey e **D.** Xaruna. As setas em vermelho indicam os principais criadouros (OX). Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery.

A Figura 24 mostra a localização exata dos criadouros em um raio de 1 km das comunidades do Polo Base Marari. As comunidades de Alapusi (A) e Gasolina (D) encontram-se muito próximas do rio de segunda ordem Marari, onde criadouros associados aos PI predominam. A comunidade do Castanha e Ahima (B), se encontram próximas do rio de primeira ordem Xirinita e a comunidade do Taibrapa (C) está próxima de dois rios de primeira ordem, o rio Catalan e o rio Taibrapa. Na Figura 25 observa-se quatro criadouros do tipo lago OX na comunidade de Taibrapa 2.

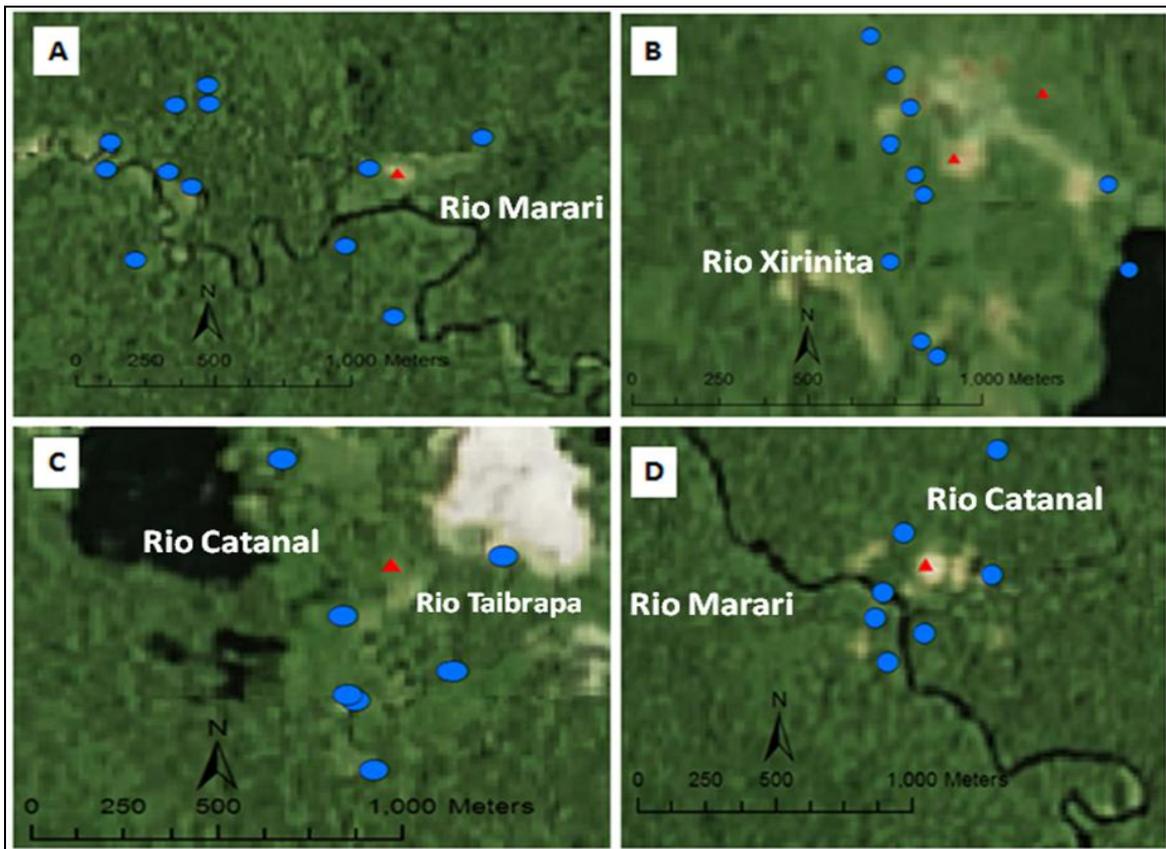


Figura 24. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (círculos azuis) mapeados próximos as comunidades (triângulos vermelhos) no Polo Base Marari. **A.** Alapusi; **B.** Castanha; **C.** Taibrapa e **D.** Gasolina. Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery. Note-se a dificuldade de visualizar os rios de primeira ordem Xirinita, Catanal e Taibrapa na imagem LANDSAT.



Figura 25. Mapas com a distribuição de todos os criadouros (marcadores azuis) mapeados próximos a comunidade Taibrapa 2 (marcador vermelho) no Polo Base Marari. A imagem de satélite é antiga e mostra a localização anterior da comunidade (uns 340 metros ao noroeste da posição atual). Fonte: DigitalGlobe - Google Earth.

Diferentemente do que ocorre com os rios de baixa ordem próximos às comunidades de Toototobi e Parafuri, nos rios Toototobi, Parima e Inajá onde as coletas exploratórias não renderam nenhuma larva de anofelino, os rios do Marari (rios Marari, Catanal e Taibrapa) albergaram algumas larvas, inclusive de *An. darlingi*, nos poucos microhabitat produtivos do canal do rio. Alguns exemplos desses tipos de microhabitats encontrados positivos nos rios de baixa ordem do Marari são apresentados na Figura 26. Tratam-se dos *microdams*, detectamos tanto nos rios quanto nos córregos (SFS). Este tipo de microhabitat não foi encontrado no canal dos rios Parima e Inajá do Parafuri ou no rio Toototobi. Na Figura 26 a foto (A) exemplifica um *microdam* correspondente a um córrego (SFS) próximo à comunidade do Castanha - no Marari. Observa-se acúmulo de detritos flutuantes na área anterior à barragem, onde o fluxo de água está bloqueado. Foram mapeados sete *microdams* com estas características ao longo deste SFS. Alguns deles, como o *microdam* mostrado na imagem, estavam bem expostos ao sol, onde foram coletadas algumas larvas de anofelinos. Ao longo das seis campanhas do Marari foram coletadas 11 larvas de *An. darlingi* nas áreas expostas ao sol e associadas ao *microdams* deste SFS, próximo às habitações indígenas. Na fotografia B observamos um *microdam* lateral, com acúmulo de detritos flutuantes, e exposto ao sol, encontrado no rio de primeira ordem, o rio do Catanal, próximo à comunidade de Taibrapa. No percurso do rio Catanal, 1 km acima e abaixo da comunidade, só foram encontrados dois *microdams* como o mostrado na fotografia e positivos para anofelinos. Foram coletadas algumas larvas em áreas laterais do rio, protegida da correnteza e muito expostas ao sol, onde proliferaram algas filamentosas verdes e larvas de anofelinos (foto C).

No total foram coletadas 122 larvas nos rios do Polo Base do Marari (três no rio Xirinita, 20 no rio Catanal, 42 no rio Marari, 12 no rio Bacati e 45 no rio Taibrapa). Quase não foram encontradas larvas nos microhabitats dos canais dos rios em período chuvoso ou posterior a um PI. Em microambientes dentro do canal do rio, coletamos larvas de anofelinos nas margens com vegetação emergente e correnteza diminuída, em poças no leito do rio na época seca, áreas protegidas da correnteza e com proliferação de algas filamentosas verdes e *microdams*. Dentre todas os espécimes coletados nos rios, somente sete foram *An. darlingi*, sendo três coletados em poças dos rios

(rio Taibrapa), dois em áreas de algas filamentosas verdes (rio Catanal) e três em *microdams* nos rios Catanal e Taibrapa.

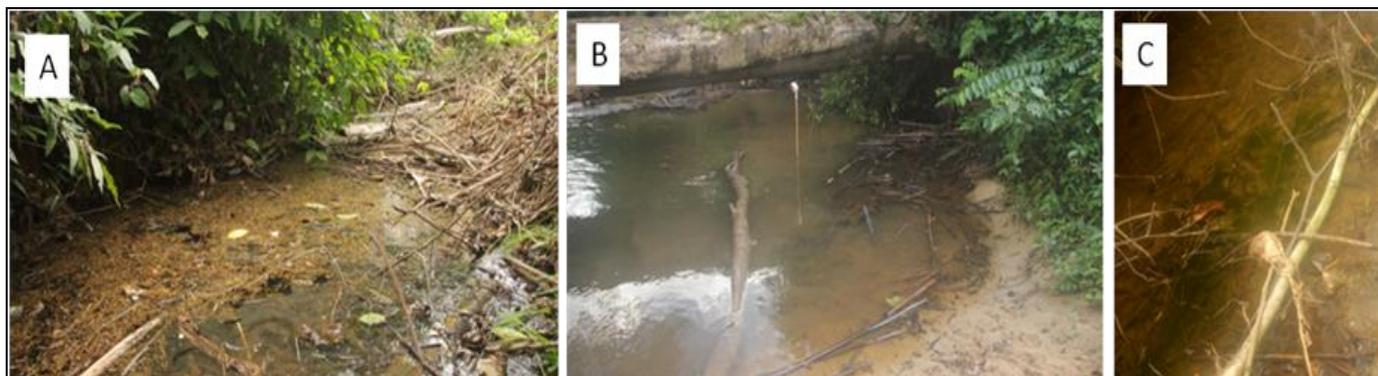


Figura 26. Exemplos de microhabitats encontrados no canal dos rios de baixa ordem ou nos córregos (SFS) no Polo Base do Marari. **A.** Microdam no SFS na comunidade Castanha, Marari; **B.** Microdam lateral no rio de primeira ordem Catanal na comunidade Taibrapa, Marari; **C.** Acúmulo de algas filamentosas verdes no lateral do rio Catanal numa área exposta ao sol e com correnteza muito diminuída na comunidade Taibrapa, Marari.

4.14 Capturas de larvas de anofelinos por criadouro em Toototobi, Parafuri e Marari.

No caso dos Polos Base de Toototobi e Parafuri, foram coletadas 6.295 larvas no período de janeiro de 2013 a julho de 2014 (Tabela 21 e 22). Deste total de larvas, 40,4% (2.545) foram capturadas no Toototobi e o restante 59,6% (3.750) no Parafuri. É importante ressaltar que um grande número de larvas (3.892) não pôde ser identificado até espécie, principalmente por estarem nos estágios iniciais de desenvolvimento. Portanto, as frequências apresentadas na tabela correspondem ao total de larvas que conseguimos identificar: 655 no Toototobi e 1.748 no Parafuri.

O *An. darlingi* correspondeu a 22,2% do total das larvas coletadas e a 58,2% das identificadas até espécie. Em Toototobi, na comunidade de Mahaxipoha, só foram coletadas duas larvas de *An. darlingi* ao longo dos 18 meses de trabalho de campo, durante a primeira metade da época seca. As espécies mais abundantemente coletadas nos Polos Base Toototobi e Parafuri foram o *An. oswaldoi* s.l. (48,7%) e o *An. darlingi* (79,9%), respectivamente (Tabela 21).

O *An. oswaldoi s.l.* foi a espécie cujas larvas foram mais amplamente distribuídas em todas as comunidades dessas duas áreas de estudo, com exceção da comunidade Xaruna. Em Toototobi, larvas de *An. oswaldoi s.l.* foram as mais abundantes na comunidade de Koioipi, onde representou o 41,2% do total dos *An. oswaldoi s.l.* coletados e, no Parafuri, foi mais abundante na comunidade de Warareu (63,6%). Larvas de *An. triannulatus s.l.* ocorreram em todos os pontos de coleta do Parafuri, variando de 94 exemplares (coletados no Warareu) a um exemplar (coletado no Xaruna e Makabey). Em Toototobi, só foram coletadas larvas desta espécie nas comunidades do Apiahik e Mahaxipoha. Confirmou-se também a ausência de larvas (igual aos adultos) de *An. mattogrossensis* em todas as comunidades de Parafuri. Já no caso de Toototobi, esta espécie esteve amplamente distribuída com uma maior abundância na comunidade Apiahik, onde foram coletadas 80 larvas (79,2% do total de larvas coletadas desta espécie).

As espécies identificadas como *An. costai-like* e *An. intermedius/ An. guarao-like* também estiveram distribuídas ao longo dos dois Polos Base. Larvas de *An. costai-like* foram mais abundantes na comunidade Xaruna, em Parafuri, onde predominaram criadouros dos tipos SFS e MFS e corpos de água não associados aos rios sombreados.

Foram coletadas amostras nas bromélias da região submontana do Parafuri, mas nenhuma larva de *An. (Kerteszia) sp.* foi encontrada. A densidade de bromélias foi muito baixa e a maioria delas se encontrava em locais muito altos na copa das árvores.

Larvas de algumas espécies minoritárias foram coletadas na região do Toototobi, como *An. kompi* (n=4) e *Chagasai bonneae* (n=6). No Parafuri, conseguimos algumas larvas de *An. squamifemur* (n=9), *An. kompi* (n=1), *An. thomasi* (n=1) e *Chagasia bonneae* (n=14) (principalmente nos SFS da comunidade de Warareu).

Foram coletadas 1.361 larvas de *An. darlingi* na comunidade de Komomassipe, no Parafuri, correspondendo ao 97,4% de todas as larvas dessa espécie. No Parafuri também foram coletadas algumas larvas de *An. darlingi* no Warareu 26 (1,9%) e em dois LAR da região do Posto de Saúde 10 (0,7%).

Tabela 21. Número total de larvas por espécie nas comunidades de Toototobi no período de setembro 2012 a julho 2014.

Espécies	POLO BASE TOOTOTOBÍ					Total
	Raxasi	Apiahik	Mahaxipoha	Koiopi	Posto	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	0	0	2 (1,2)	0	0	2 (0,3)
<i>An. oswaldoi s.l</i>	57 (55,3)	64 (34,4)	66 (38,8)	132 (68,8)	0	319 (48,7)
<i>An. mattogrossensis</i>	4 (3,9)	80 (43)	11 (6,5)	6 (3,1)	0	101 (15,4)
<i>An. intermedius/guarao</i>	21 (20,4)	7 (3,8)	46 (27,1)	23 (12)	4 (100)	101 (15,4)
<i>An. costai</i>	21 (20,4)	11 (5,9)	24 (14,1)	30 (15,6)	0	86 (13,1)
<i>An. triannulatus s.s.</i>	0	23 (12,4)	13 (7,6)	0	0	36 (5,5)
<i>Chagasia bonneae</i>	0	1 (0,5)	4 (2,4)	1 (0,5)	0	6 (0,9)
<i>An. kompi</i>	0	0	4 (2,4)	0	0	4 (0,6)
Total	103	186	170	192	4	655

Não foram incluídas na tabela 1890 larvas de *An. sp.*

Tabela 22. Número total de larvas por espécie nas comunidades de Parafuri no período de setembro 2012 a julho 2014.

Espécies	POLO BASE PARAFURI					Total
	Warareu	Komomassipe	Xaruna	Makabey	Posto	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>An. darlingi</i>	26 (12,4)	1361 (98,1)	0	0	10 (13,9)	1397 (79,9)
<i>An. triannulatus s.s.</i>	94 (45)	8 (0,6)	1 (2,4)	1 (2,7)	59 (81,9)	163 (9,3)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	49 (23,4)	9 (0,6)	0	16 (43,2)	3 (4,2)	77 (4,4)
<i>An. costai</i>	2 (1)	4 (0,3)	33 (78,6)	11 (29,7)	0	50 (2,9)
<i>An. intermedius/guarao</i>	19 (9,1)	5 (0,4)	5 (11,9)	7 (18,9)	0	36 (2,1)
<i>Chagasia bonneae</i>	12 (5,7)	1 (0,1)	0	1 (2,7)	0	14 (0,8)
<i>An. squamifemur</i>	7 (3,3)	0	2 (4,8)	0	0	9 (0,5)
<i>An. kompi</i>	0	0	0	1 (2,7)	0	1 (0,1)
<i>An. thomasi</i>	0	0	1 (2,4)	0	0	1 (0,1)
Total	209	1388	42	37	72	1748

Não foram incluídas na tabela 2002 larvas de *An. sp.*

No Polo base Marari, foram coletadas 3.199 larvas, das quais, somente 268 foram identificáveis. Larvas de *An. darlingi* foram coletadas em todas as comunidades do Marari e, na maioria das vezes, foram achadas em criadouros tipo LAR e FAAR, associadas aos rios Marari, Catanal, Taibrapa e Xirinita. Adicionalmente, neste Polo Base, coletamos larvas desta espécie em segmentos de SFS com água parada e expostos ao sol e alguns microambientes na época de seca dos rios de baixa ordem (especificamente os de primeira ordem) da região.

4.15 Distribuição das larvas das espécies de anofelino por tipo de criadouro em Toototobi e Parafuri.

Os dados da Tabela 23 e 24 mostraram que o *An. darlingi* e *An. oswaldoi s.l.* foram as espécies mais abundantes na maioria dos criadouros em Parafuri e Toototobi, respectivamente. Em Parafuri, o *An. darlingi* foi a espécie predominante nos LAR (96,9%) e, em Toototobi, só foi encontrada, num LAR-OX (N=2). Os criadouros LAR-OX, FAAR, FANAR, SFS e MFS foram os mais produtivos e nenhuma espécie foi encontrada no RIV, tanto em Toototobi quanto em Parafuri.

Outras espécies como o *An. oswaldoi s.l.*, apresentou uma distribuição muito mais ampla entre os diferentes tipos de corpos de água, desde OX (32,1%) até MFS (15,2%). *An. triannulatus s.l.* ocorreu sempre em criadouros associados aos PI: OX e FAAR em Toototobi e OX e NOX em Parafuri. *An. mattogrossensis* foi encontrado associado aos PI: OX, NOX, FAAR e também, em MSF no Toototobi. Em contraste, nenhum exemplar desta espécie foi encontrado em Parafuri. Os exemplares identificados como *An. intermedius/An. guarao-like* tiveram uma distribuição muito ampla entre todos os tipos de criadouros. É importante ressaltar que os exemplares classificados como *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius/guarao* podem ser duas ou mais espécies diferentes com comportamentos ecológicos distintos.

Tabela 23. Número e porcentagem das espécies das larvas de anofelinos por tipo de criadouro em Toototobi.

Espécies	Tipos de criadouro								Total
	LAR								
	OX	NOX	FAAR	FANAR	RP	SFS	MFS	Rios	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>An. darlingi</i>	2 (1,2)	0	0	0	0	0	0	0	2 (0,3)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	69 (39,9)	0	86 (49,7)	79 (43,6)	0	25 (55,5)	60 (74,1)	0	319 (48,7)
<i>An. mattogrossensis</i>	48 (27,7)	1 (100)	45 (26)	4 (2,2)	0	0	3 (3,7)	0	101 (15,4)
<i>An. intermedius/guarao</i>	32 (18,5)	0	23 (13,3)	30 (16,6)	0	3 (6,7)	13 (16)	0	101 (15,4)
<i>An. costai</i>	1 (0,6)	0	4 (2,3)	64 (35,4)	1 (100)	12 (26,7)	4 (4,9)	0	86 (13,1)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	21 (12,1)	0	15 (8,7)	0	0	0	0	0	36 (5,5)
<i>Chagasia bonneae</i>	0	0	0	0	0	5 (11,1)	1 (1,2)	0	6 (0,9)
<i>An. kompi</i>	0	0	0	4 (2,2)	0	0	0		4 (0,6)
Total	173(26,4)	1(0,2)	173(26,4)	181(27,6)	1(0,2)	45(6,9)	81(12,4)	0	655

Não foram incluídas na tabela 1890 larvas de *An. sp.* coletadas em Toototobi. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

Tabela 24. Número e porcentagem das espécies de larvas de anofelinos por tipo de criadouro em Parafuri.

Espécies	Tipos de criadouro								Total N (%)
	LAR								
	OX N (%)	NOX N (%)	FAAR N (%)	FANAR N (%)	RP N (%)	SFS N (%)	MFS N (%)	Rios N (%)	
<i>An. darlingi</i>	1176 (84,5)	178 (84,3)	7 (31,8)	3 (6,4)	33 (89,2)	0	0	0	1397 (79,9)
<i>An. triannulatus s.l.</i>	154 (11,1)	9 (4,3)	0	0	0	0	0	0	163 (9,3)
<i>An. oswaldoi s.l.</i>	58 (4,2)	6 (2,8)	10 (45,5)	3 (6,4)	0	0	0	0	77 (4,4)
<i>An. costai</i>	3 (0,2)	1 (0,5)	1 (4,5)	28 (59,6)	0	5 (18,5)	12 (92,3)	0	50 (2,9)
<i>An. intermedius/guarao</i>	0	16 (7,6)	3 (13,6)	10 (21,3)	4 (10,8)	3 (11,1)	0	0	36 (2,1)
<i>Chagasia bonnea</i>	0	1 (0,5)	1 (4,5)	0	0	11 (40,7)	1 (7,7)	0	14 (0,8)
<i>An. squamifemur</i>	0	0	0	1 (2,1)	0	8 (29,6)	0	0	9 (0,5)
<i>An. kompi</i>	0	0	0	1 (2,1)	0	0	0	0	1 (0,1)
<i>An. thomasi</i>	0	0	0	1 (2,1)	0	0	0	0	1 (0,1)
Total	1391 (79,6)	211 (12,1)	22 (1,3)	47 (2,7)	37 (2,1)	27 (1,5)	13 (0,7)	0	1748

Não foram incluídas na tabela 2002 larvas de *An. sp.* coletadas em Parafuri. OX - lago *oxbow*, NOX - Lago não *oxbow*, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

4.16 Focos de Refúgio Estival.

Os Focos de Refúgio Estival (FRE) são fases específicas dos criadouros que servem para manter as populações das diferentes espécies de anofelinos nos meses mais secos do ano, quando a Área Efetiva de Criação total, considerada no raio de 1 km ao redor de cada comunidade, está retraída no seu máximo. Os FRE serão, portanto, os núcleos das diferentes Unidade de Sanfona (UdS) que coexistirão e estarão sobrepostas ao longo do espaço. Uma UdS é formada pelo núcleo que corresponde ao FRE espécie-específicos e aos criadouros satélites temporários. As populações de cada espécie vão se expandir a partir do FRE, devido ao efeito dos Pulsos de Inundação (PI) e/ou às chuvas intensas. Na Figura 27 são mostrados alguns exemplos de focos de refúgio estival. A foto Fig. 27-A corresponde às últimas poças de um MFS próximo à comunidade do Raxasi - Toototobi. Encontraram-se larvas em abundância nestes pequenos remanescentes de água muito turva, sendo a maioria identificada como *An. oswaldoi s.l.* A foto B mostra um OX próximo (287 metros) à comunidade de Gasolina - Marari. Em períodos de isolamento prolongados durante a época seca, entre pulsos de inundação, os OX associados ao rio Marari entram numa fase em que a água fica muito turva. Este é o FRE de *An. darlingi* que mantém a população o ano todo no entorno da comunidade de Gasolina do Marari, e a partir da qual os criadouros temporários próximos são colonizados na época de chuva ou nos períodos pós

PI da época seca. Nas proximidades da comunidade Koiopi (Fig. 27-C), uma poça no leito de um MFS, formada na segunda metade da época seca e com água viscosa e turva, foi identificada como FRE de *An. oswaldoi s.l.* A foto D mostra um FRE parecido com o anterior, numa FANAR que não seca, na comunidade de Gasolina - Marari, onde foram detectadas altas densidades de *An. intermedius/ An.guarao-like*.

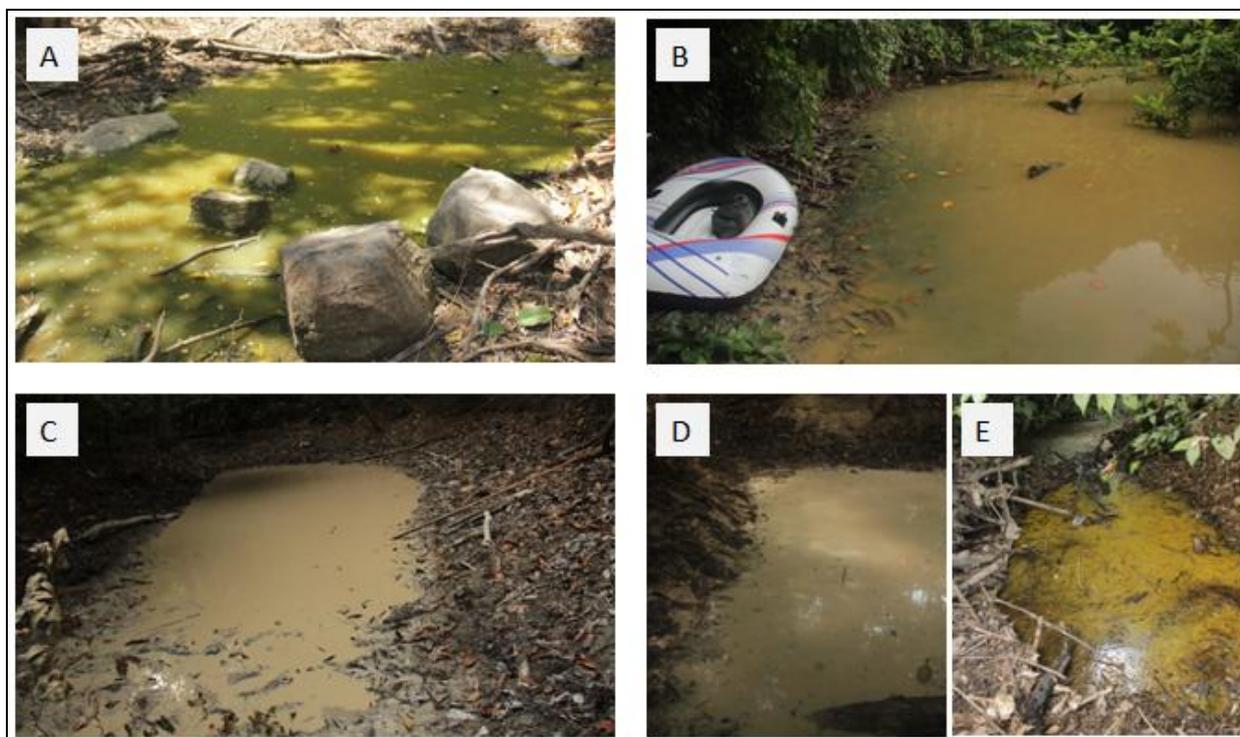


Figura 27. Focos de Refúgio Estival (FRE) nas áreas estudadas durante as estações de estiagem: **A.** Poças formadas no leito de um MFS, Raxasi, Toototobi; **B.** OX em fase de secagem, Gasolina, Marari; **C.** Poça num leito de MFS, Koiopi, Toototobi; **D.** Remanescentes numa FANAR, Gasolina, Marari e **E.** OX em fase de secagem e água muito turva, Castanha, Marari.

Os principais FRE explorados pelas diferentes espécies de anofelinos mais abundantes variam. Por exemplo, os FRE do *An. darlingi* se concentraram principalmente nas LAR (tanto OX quanto NOX), embora na área de Marari esta espécie tenha sido encontrada explorando alguns criadouros do canal dos rios de baixa ordem desta região em períodos inter PI, durante a época seca. Já o *An. oswaldoi s.l.* foi encontrado explorando FRE muito mais variados, desde LAR até criadouros não associados aos PI, como FANAR, SFS e MFS. Devido a esta característica, *An. oswaldoi s.l.* pode se manter nos períodos de pico da estação seca em áreas com diferentes características daquelas nas quais o *An. darlingi* se manteve. *An. oswaldoi s.l.* se manteve em algumas comunidades, principalmente em FRE do tipo poças, nos MFS ou SFS. *An.*

triannulatus s.l. se manteve mais em FRE parecidos aos do *An. darlingi*, principalmente em OX e NOX.

4.17 Fatores ambientais determinantes da distribuição das principais espécies de anofelinos.

Foi realizado uma análise multivariada utilizando o modelo Binomial Negativo para determinar a associação entre as seguintes variáveis ambientais: 1. Associação com os PI; 2. Temporalidade; 3. Exposição ao sol; 4. Correnteza; 5. Natureza da água; 6. Macrófitas submersas e 7. Distância às habitações mais próximas indígenas e as seis espécies de anofelinos mais abundantes: *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus s.l.*, *An. mattogrossensis*, *An. costai-like* e *An. intermedius/An. guarao-like*. Como variável dependente utilizamos o número de larvas coletado, ajustado pelo número de conchadas (variável *offset*). Estas análises só foram realizadas incluindo os exemplares coletados nos Polos Base de Parafuri e Toototobi. Futuramente, com a identificação dos espécimes coletados na área de Marari, estes também serão incluídos para obtermos o modelo final de variáveis ambientais e sua influência na ocorrência das diferentes espécies de anofelinos no território Yanomami do Brasil. Para evitar a falha dos modelos de análises Binomial Negativo, nos casos em que não foi coletada nenhuma larva e a variável seria zero (0), a variável desta categoria foi excluída no modelo final. Como todos os espécimes de *An. darlingi* foram coletados em criadouros de correnteza nula, a variável correnteza foi excluída da análise multivariada para esta espécie. Nestes casos, na tabela da análise GEE (*Generalized Estimating Equation*), foi indicado que todas as larvas foram coletadas somente em uma das categorias dessa variável, desta forma, não sendo incluída nas análises (Tabela 25).

Na Tabela 25, apresentam-se os resultados da análise multivariada para as espécies *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. triannulatus s.l.* Houve uma relação estatisticamente significativa entre os criadouros associados aos pulsos de inundação e a ocorrência de *An. darlingi*, indicando que esta espécie prefere utilizar corpos de água que estão vinculados à dinâmica dos rios ($P < 0,05$). Somente escassas larvas de *An. darlingi* colonizaram alguns criadouros na época chuvosa não associados aos rios, como poças de chuva e FANAR,

parcialmente ou expostas ao sol. *An. triannulatus s.l.* apresentou um comportamento muito parecido ao *An. darlingi*, já que todas as larvas desta espécie foram coletadas em criadouros associados aos PI. Ao contrário, não houve diferenças significativas nas categorias desta variável e o *An. oswaldoi s.l.*, já que esta espécie foi encontrada proliferando numa ampla gama de criadouros associados aos rios e do interior da floresta. Nenhuma destas três espécies teve uma associação significativa com a temporalidade dos corpos de água. Por exemplo, todos os FRE e principais criadouros do *An. darlingi* são as LAR permanentes. Esta espécie também colonizou criadouros temporários gerados pelos PI (FAAR) ou pelas chuvas intensas (poças, SFS expostos ao sol).

Tanto o *An. darlingi* quanto o *An. triannulatus s.l.* apresentaram diferenças significativas quanto ao grau de exposição ao sol. Por exemplo, houve 0,004 de chance de encontrar larvas de *An. darlingi* em criadouros sombreados comparados com esses expostos ao sol ($P < 0,05$). Todas as larvas de *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.* foram encontradas em criadouros sem nenhum tipo de correnteza. Com relação à natureza da água, houve diferenças significativas para *An. oswaldoi s.l.*, que preferiu proliferar em águas turvas ou meio turvas em comparação com as águas límpidas ($P < 0,05$). Finalmente, é importante ressaltar que houve uma correlação significativa entre a distância das habitações indígenas e o número de larvas de *An. darlingi*. Em criadouros mais próximos às moradias dos Yanomami em comparação com os criadouros mais distantes, foi encontrada maior densidade desta espécie antropofílica. Ao contrário, larvas de espécies consideradas menos antropofílicas como o *An. oswaldoi s.l.* e o *An. triannulatus s.l.* foram coletadas em altas densidades também em criadouros distantes das comunidades ($P > 0,05$).

Tabela 25. *Generalized Estimating Equation* (GEE) análises para fatores associados às densidades de larvas de anofelinos de *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. triannulatus s.l.*

Variáveis explicatórias	<i>An. darlingi</i>		<i>An. oswaldoi s.l.</i>		<i>An. triannulatus s.l.</i>	
	RC (95% CI)	p-valor	RC (95% CI)	p-valor	RC (95% CI)	p-valor
Associação com Pulso Inundação						
Não	0,05 (0,008-0,39)	<0,05	1,34 (0,61-2,91)	0,4547	---	
Sim	1		1		Todas larvas	
Temporalidade						
Permanente	0,78 (0,15-4,12)	0,7783	0,44 (0,19-1,03)	0,059	---	
Temporário	1		1		---	
Exposição ao sol						
Sombreado	0,004 (0,000-0,02)	<0,05	1,80 (0,63-5,13)	0,2686	---	
Parcialmente exposto	0,04 (0,011-0,16)	<0,05	3,19 (1,38-7,34)	<0,05	0,06 (0,02-0,18)	<0,05
Exposto	1		1		1	
Correnteza						
Fraca	---		---		---	
Moderada	---		---		---	
Nula	Todas larvas		---		Todas larvas	
Natureza						
Límpida	---		0,28 (0,15-0,5)	<0,05	0,44 (0,11-1,78)	0,2529
Meio turva	---		1,56 (0,76-3,21)	0,2211	0,41 (0,11-1,51)	0,1793
Turva	---		1		1	
Macrófitas submersas						
Presente	0,68 (0,17-2,64)	0,5832	3,12 (1,54-6,32)	<0,05	---	
Ausente	1		1		---	
Distância à maloca						
	0,995 (0,992-0,998)	<0,05	1,0003(0,999-1,001)	0,423	1	0,5483

* RC (95% CI) - Razão de chances com o 95% dos intervalos de confiança. Os resultados são apresentados na forma de Razão de Chances (RC) com o intervalo de confiança do 95%, indicando se houve diferenças significativas na ocorrência das diferentes espécies entre as diferentes categorias das variáveis explicatórias (P <0,05).

No caso de *An. mattogrossensis*, não houve diferenças significativas entre o número de larvas coletadas em relação aos PI ou à temporalidade dos criadouros (Tabela 26). No entanto, nesta espécie ao igual que o *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.*, encontramos diferenças significativas entre os diferentes graus de exposição ao sol, com preferência para os criadouros expostos (P<0.05). Todas as larvas de *An. mattogrossensis* foram coletadas em criadouros sem correnteza e não houve diferenças significativas entre os tipos de água e a ocorrência desta espécie. No caso do *An. costai-like* houve uns resultados opostos às espécies anteriores. Houve 9,21 vezes mais chance de encontrar larvas de *An. costai-like* em criadouros não associados aos rios que naqueles com vínculo direto com os PI (P<0,05). Também houve diferenças significativas para a variável temporalidade, com uma preferência clara desta espécie pelos criadouros temporários não associados aos rios (P<0,05).

Embora tenham sido coletadas larvas desta espécie em SFS e MFS com correnteza moderada, não houve diferenças significativas com o coletado em criadouros sem correnteza. Finalmente, não houve nenhuma correlação entre a distância das comunidades e o número de larvas coletadas ($P > 0,05$). Nenhuma variável teve alguma característica associada à ocorrência de *An. intermedius*/*An. costai*-like (Tabela 26), indicando caráter generalista deste grupo, colonizando uma ampla variedade de criadouros com condições ambientais diferentes. É importante lembrar que tanto neste grupo quando dentro de *An. oswaldoi* s.l., existe a possibilidade de se encontrar duas ou mais espécies.

Tabela 26. *Generalized Estimating Equation* (GEE) análises para fatores associados às densidades de anofelinos de *An. mattogrossensis*, *An. costai*-like e *An. intermedius/guarao*-like.

Variáveis explicatórias	<i>An. mattogrossensis</i>		<i>An. costai</i> -like		<i>An. intermedius/guarao</i> -like	
	RC (95% CI)	p-valor	RC (95% CI)	p-valor	RC (95% CI)	p-valor
Associação com Pulso Inundação						
Não	0,23 (0,04-1,29)	0,0956	9,21 (3,95-21,48)	<0,05	1,01(0,36-2,85)	0,9773
Sim	1		1		1	
Temporalidade						
Permanente	0,29 (0,04-1,79)	0,1846	0,21 (0,11-0,37)	<0,05	0,91(0,4-2,09)	0,8393
Temporario	1		1		1	
Exposição ao sol						
Sombreado	0,01 (0,003-0,06)	<0,05	---		8,31(0,62-109,8)	0,1077
Parcialmente exposto	0,18(0,07-0,48)	<0,05	---		1,31(0,11-14,56)	0,8249
Exposto	1		---		1	
Correnteza						
Fraca	---		---		0,16(0,01-1,51)	0,1123
Moderada	---		0,94 (0,44-1,99)	0,881	0,37 (0,12-1,15)	0,0867
Nula	Todas larvas		1		1	
Natureza						
Límpida	2,43 (0,64-9,12)	0,1868	---		1,23(0,36-4,15)	0,7281
Meio turva	0,69 (0,2-2,37)	0,5597	---		2,84 (0,75-10,74)	0,1226
Turva	1		---		1	
Macrófitas submersas						
Presente			1,45 (0,39-5,36)	0,577	---	
Ausente			1		Todas larvas	
Distância à maloca						
	1,002(1,001-1,003)	<0,05	1,0004 (0,999-1,001)	0,428		0,0945

* RC (95% CI) - Razão de chances com o 95% dos intervalos de confiança. Os resultados são apresentados na forma de Razão de Chances (RC) com o intervalo de confiança do 95%, indicando se houve diferenças significativas na ocorrência das diferentes espécies entre as diferentes categorias das variáveis explicatórias ($P < 0,05$).

4.18 Lagos Associados aos Rios (LAR). Pulsos de Inundação e associação de anofelinos com macrófitas submersas.

Os LAR foram o tipo de criadouro que apresentou uma maior diversidade e abundância de subtipos de AEC, constituindo-se, em alguns casos, em complexos mosaicos de diferentes condições que as fêmeas de anofelinos podem escolher como locais de oviposição. Dentro dos LAR foram encontrados diferentes tipos de macrófitas emergentes, que não foram identificadas até gênero ou espécie, e macrófitas submersas. Dentre esta última categoria, identificamos até nível de gênero ou espécie cinco tipos de macrófitas submersas principais encontradas na área: *Mayaca sp.*, *Cabomba sp.*, *Apalante sp.*, *Utricularia sp.* e *Eichornia diversifolia*. Outros subtipos de AEC onde encontramos grande número de anofelinos associados dentro das LAR, foram as áreas com algas filamentosas verdes e detritos flutuantes, principalmente nas expostas ao sol. A Figura 28, mostra alguns dos principais subtipos de AEC em LAR onde foram coletadas larvas de anofelinos. Algumas das fitoassociações mais importantes detectadas foram entre *An. darlingi* com *Mayaca sp.* e entre *An. triannulatus s.l.* com *Cabomba sp.*, na região de floresta submontana do Parafuri. Dentre todos os *An. darlingi* coletados no Parafuri, 1.120 espécimes (80%) foram encontrados em LAR com ocorrência concomitante de *Mayaca sp.* No caso de *An. triannulatus s.l.*, 47,7% dos 198 exemplares desta espécie foram capturados em LAR com ocorrência de *Cabomba sp.* Em termos gerais, não foi associado nenhuma espécie de anofelino com tapetes de macrófitas submersas de *Apalante sp.*, encontrados em LAR dos três Polos Base.

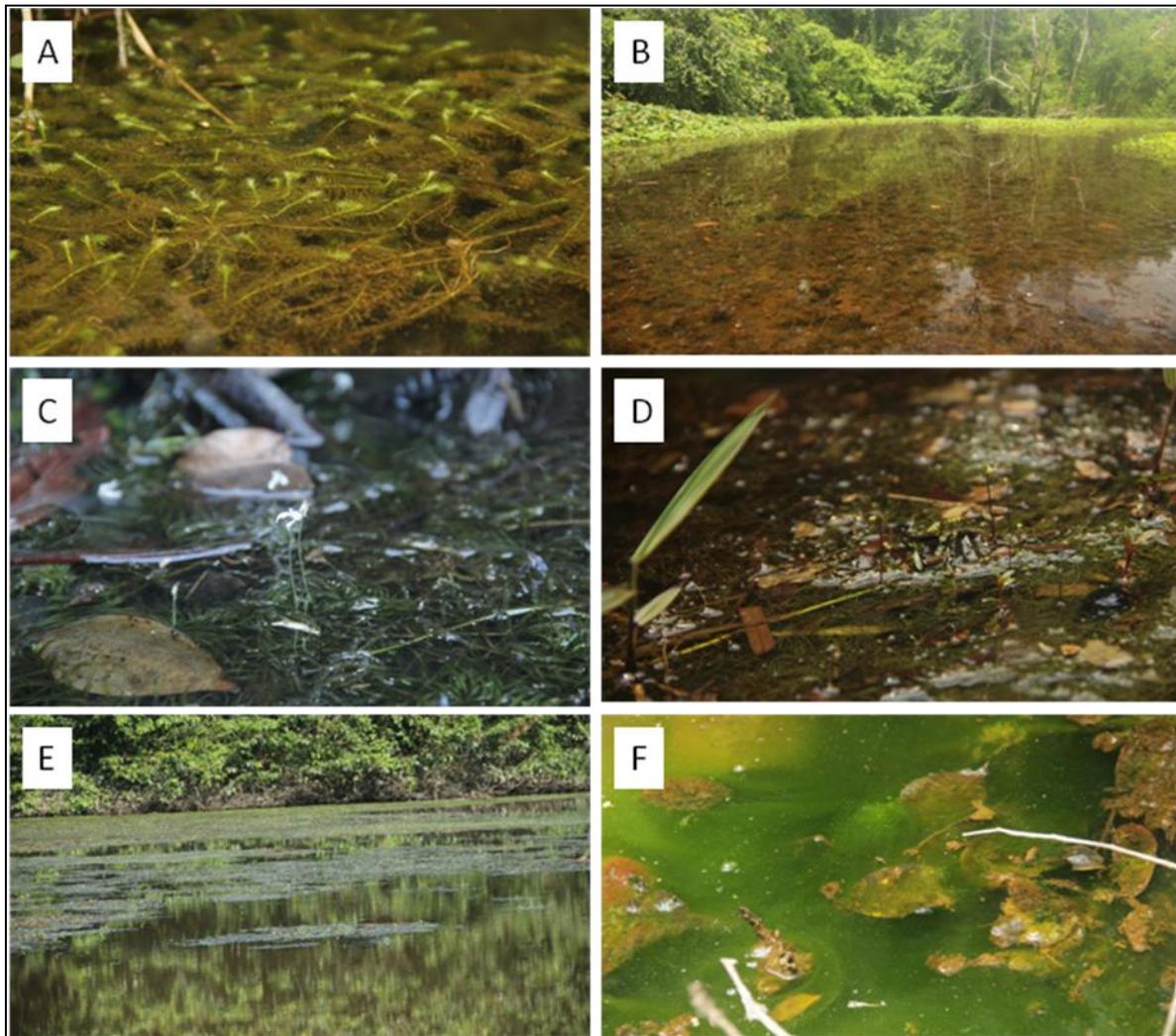


Figura 28. Exemplos de subtipos de AEC onde foram coletadas larvas em abundância no interior de LAR: **A.** *Mayaca* sp. encontrado numa OX com densidades muito elevadas de *An. darlingi*, associadas nos espaços de intersecção da macrófita submersa, Komomassipe, Parafuri; **B.** OX com grande expansão da macrófita submersa *Cabomba* sp., onde foram coletados grande número de *An. triannulatus* s.l., Warareu, Parafuri; **C.** *Apalanthe* sp., macrófita submersa pouco associada as larvas de anofelinos, Taibrapa 2, Marari; **D.** *Utricularia* sp., a maioria destes subtipos de AEC afastados das margens das LAR, não poderiam ter sido amostrados sem o uso do bote inflável, Makabey, Parafuri; **E.** *Eichornia diversifolia* em OX, Taibrapa 2, Marari e **F.** Aglomerados de algas filamentosas verdes em áreas expostas ao sol em OX a 628 metros da comunidade do Castanha, Marari. Neste subtipo de AEC foram capturadas bastantes larvas de *An. darlingi*.

As três principais fases em que podemos encontrar as LAR em relação aos Pulsos de Inundação (PI) são: 1. Fase de Enchente – é a fase sob o efeito dos PI e, portanto, de renovação de água dos LAR, acompanhado por um efeito de lavagem de diferente grau das larvas dentro das LAR. 2. Fase Intermediária – é a fase onde os níveis de água dos LAR irão se reduzindo de forma gradual devido ao efeito principal das evaporações. Esta última é a fase

das LAR de maior produtividade para algumas espécies de anofelinos como o *An. darlingi*. 3. Fase Secagem – é nesta fase que os níveis da água dos LAR estão muito baixos e as águas turvas, mas podem representar um pico de densidade para espécies que preferem águas mais turvas, como é o caso do *An. nuneztovari* s.l. O exemplo ilustrado na Figura 29 é de um OX da comunidade do Komomassipe, em Parafuri. Aqui são destacadas as três fases deste OX. Este é o principal criadouro em 1 km raio da comunidade, sendo o núcleo da Unidade de Sanfona (UdS) que acontece nesta microrregião. A fase da foto A corresponde a Fase de Secagem durante a segunda metade da época seca, quando o OX teve os níveis de água muito diminuídos, devido ao longo tempo de isolamento do rio e a ação da evaporação. Neste caso, boa parte dos tapetes de *Mayaca* sp. (indicadas pela seta em vermelho) encontra-se fora do remanescente de água do OX. A qualidade da água também está modificada nesta fase, com tendência a estar mais turva e menos oxigenada.

Durante a campanha de novembro de 2013, conseguimos documentar o efeito de um PI nesta OX do Komomassipe. A foto B corresponde ao OX logo depois de receber um PI do rio Inajá. O OX aumentou consideravelmente seu volume de água (entre 50 cm e 1 metro) num período muito curto de tempo (em questão de poucas horas). Como consequência, os tapetes de *Mayaca* sp. que estavam fora da água foram alagados e alguns daqueles que estavam dentro da LAR foram reestruturados. Registramos que alguns aglomerados de *Mayaca* sp. que ainda estavam dentro da água na Fase anterior ao PI foram arrancados e se encontravam flutuando livremente dentro do OX. Também passaram a existir bastantes aglomerados de detritos flutuantes, como resultado da entrada da água do rio no OX, arrastando detritos durante esse processo. Na foto C pode ser vista a situação de Fase Intermediária (que corresponde à fase mais produtiva). Ao longo desta fase, o nível de água descerá de forma gradual, dependendo das características internas de cada LAR. Esse é o período mais favorável para a expansão populacional das diferentes espécies de anofelinos (ex: *An. darlingi*, *An. triannulatus* s.l. e *An. oswaldoi* s.l.). Durante a Fase Intermediária da OX do Komomassipe, as comunidades de *Mayaca* sp. estavam reestabelecidas na superfície de água da OX, gerando o microhabitat ideal para a proliferação do *An. darlingi*.

A duração da Fase Intermediária dependerá em grande medida do nível de chuvas locais entre PI e de características intrínsecas da LAR, como o grau

de exposição ao sol ou profundidade. Por exemplo, a OX do Komomassipe ainda estava em Fase Intermediária em 12 fevereiro de 2014 (2,5 meses depois do PI documentado nesta localidade no 27 de novembro de 2013). Quando comparamos o total de anofelinos adultos capturados no Komomassipe, vimos que em novembro de 2013 (em Fase Secagem) foi coletado um total de 73 *An. darlingi*. Já em fevereiro de 2014 (Fase Intermediária), foram coletados 183 *An. darlingi*.

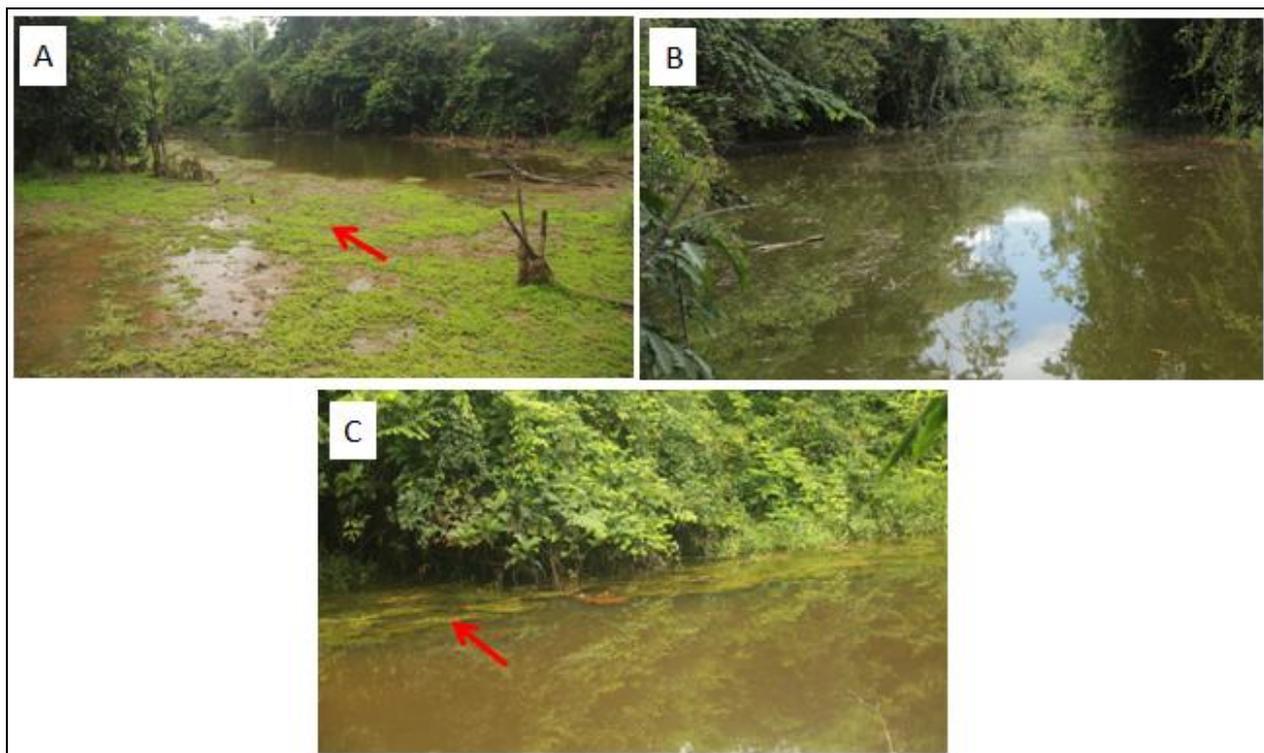


Figura 29. As três fases principais da OX em relação aos pulsos de inundação - PI. **A.** Fase Secagem; **B.** Fase de Enchente; **C.** Fase Intermediária (=produtiva das larvas).

Nas LAR encontradas no Polo Base Marari, a Fase Intermediária não teve esta relação com a dinâmica das populações internas de *Mayaca sp.* Os microhabitats mais produtivos foram áreas de vegetação emergente e aglomerados de detritos flutuantes parcialmente ou expostos ao sol. Por exemplo, o OX da comunidade Gasolina, no Marari, já se encontrava na Fase Secagem em 14 de janeiro de 2015, somente dois meses depois do PI documentado no Marari em 14 de novembro de 2014. Isto significa que a Fase Produtiva de algumas LAR do Marari são mais curtas comparado com o OX do Komomassipe exposto anteriormente. Portanto, os picos de densidades decorrentes dos PI são mais curtos nesta localidade.

Na Tabela 27 detalha-se a fase em que foram encontradas as LAR na área do Marari e as capturas de fêmeas e larvas de *An. darlingi* associadas. O total de larvas de *An. darlingi* é reportado por tipo de criadouro.

Tabela 27. Fases em que foram encontradas as principais LAR por comunidade no Marari, a relação com os PI documentados e as capturas de adultos e larvas de *An. darlingi*.

	Março.13 (PI)	Agosto.13	Setembro.14	Novembro.14 (PI)	Janeiro.15	Março.15
Alapusi						
Fase	Enchente	Intermediária	Secagem	Enchente	Intermediária	Secagem
<i>An. darlingi</i> adulto	1	Não coletado	6	18	77	21
<i>An. darlingi</i> larva	0	0	0	80X+1NOX	30X+4NOX	0
Castanha						
Fase	Não coletado	Intermediária	Intermediária	Enchente	Secagem	Secagem
<i>An. darlingi</i> adulto	0	Não coletado	3	2	2	1
<i>An. darlingi</i> larva	Não coletado	1SFS+1RP	1SFS+28OX	7SFS*+10X	20X	0
Taibrapa						
Fase	Enchente	Intermediária	Não coletado	Enchente	Intermed./Seca.	Secagem
<i>An. darlingi</i> adulto	7	Não coletado	Não coletado	4	78	10
<i>An. darlingi</i> larva	18	0	Não coletado	10X	80X+20NOX	70X+5NOX
Gasolina						
Fase	Secagem	Intermediária	Produc./Seca.	Enchente	Secagem	Secagem
<i>An. darlingi</i> adulto	2	72	23	42	48	10
<i>An. darlingi</i> larva	30X	140X+11FAAR	140X+9FAAR	320X	80X	80X
Taibrapa 2						
Fase	Não coletado	Intermediária	Secagem	Não coletado	Não coletado	Não coletado
<i>An. darlingi</i> adulto	Não coletado	4	4	Não coletado	Não coletado	Não coletado
<i>An. darlingi</i> larva	Não coletado	90X	0	Não coletado	Não coletado	Não coletado

* Esta coleta no SFS na comunidade Castanha foi feita antes do PI do dia 14 de novembro 2014. No dia posterior ao PI extremo, o SFS foi amostrado de novo e não foram coletadas larvas.

4.19 Dados de pluviosidade e sazonalidade das Áreas Efetivas de Criação dos criadouros.

Segundo os dados de pluviosidade e a dinâmica sazonal encontrada nos criadouros dos Polos Base, identificamos quatro estações. Nos três Polos Base, as quatro principais estações foram as mesmas, houve leves mudanças na duração e nos meses em que ocorreram (Fig. 30). No caso de Toototobi: outubro a março (época seca), abril (mês de transição seca-chuvas), maio a agosto (época das chuvas) e setembro (mês de transição chuvas-seca). No caso de Parafuri estabelecemos as seguintes estações do ano: setembro - janeiro (época seca), fevereiro (mês de transição seca-chuvas), março - julho

(época de chuvas) e agosto (mês de transição chuvas-seca). No caso do Marari, ao não ter realizadas capturas sistemáticas ao longo dos dois anos consecutivos, não conseguimos delimitar com tanta precisão as estações do ano. No entanto, este Polo Base aproximou-se mais ao padrão de Toototobi que do Parafuri, talvez com início um pouco mais antecipado da época seca, contabilizando-se um período total de sete meses com pluviosidade reduzida no Marari (de setembro até março). Os dados de pluviosidade para o Parafuri dos meses de outubro de 2013 a fevereiro de 2014 foram adaptados a partir da estação pluviométrica da Agência Nacional de Águas (ANA) situada no Polo Base de Surucucu, a uns 50 km aproximadamente do Parafuri.

Mês	Toototobi	Parafuri	AEC
Out. 12	162,3	60,9	Não AEC
Nov. 12	42,3	43,5	
Dec. 12	59,4	195,3	
Jan. 13	15,6	69,6	
Fev. 13	233,1	232,5	AEC C2
Mar. 13	80,4	137,4	
Abr. 13	252,9	388,8	AEC C3
Mai. 13	297,6	257,4	
Jun. 13	192,9	205,5	
Jul. 13	183,9	158,7	AEC C4
Ago. 13	110,1	156,9	
Set. 13	113,1	84,9	AEC C5
Out. 13	43,5	539,4	
Nov. 13	109,2	414,7	AEC C6
Dec. 13	54,3	256,9	
Jan. 14	46,8	506,9	
Fev. 14	50,4	173,9	AEC C7
Mar. 14	75,9	77,1	
Abr. 14	170,4	146,4	AEC C8
Mai. 14	246,9	155,1	
Jun. 14	225,3	69,3	
Jul. 14	188,8	394,6	AEC C9
Total (mm)	2.979	4.726	

Figura 30. Pluviosidade (mm) em Toototobi e Parafuri, outubro 2012 - julho 2015. Os meses ressaltados em cores representam: vermelho - época seca, verde - meses de transição seca-chuvas, azul - época de chuvas e amarelo - meses de transição chuvas-seca. AEC C (campanha)²= Campanha 2 em que foram realizadas as saídas de campo e quantificado a AEC. Os meses de outubro 2013 a fevereiro 2014 no Parafuri foram adaptados da estação pluviométrica do Surucucu.

Na Figura 31, apresenta-se a dinâmica sazonal do total de AEC por tipo de criadouro nas quatro comunidades estudadas do Toototobi e associados aos níveis de pluviosidade local. Encontramos alguma correlação positiva entre, por exemplo, os níveis de pluviosidade do mês anterior e o total de AEC de criadouros tipo FANAR na comunidade de Koiopi ($r=0,8383$, $P<0,05$), indicando que a dinâmica destes criadouros está correlacionada com os níveis de chuva precedentes nessa microrregião. Em termos gerais, constatamos uma retração muito marcada do AEC total em todas as comunidades na segunda metade da época seca (mês de janeiro). Por exemplo, na comunidade de Mahaxipoha, o AEC disponível neste período (total de 425 m² em janeiro de 2013) ficou restrito a dois OX e a algumas poças formadas nos MFS da região.

No caso do Raxasi, o AEC em 1 km de raio em relação à comunidade quase desapareceu na segunda metade da época seca, ficando restrito a poucas unidades de AEC de um OX e a três poças de um MFS (contabilizando no total só 131 m² de AEC). No caso da comunidade de Apiahik também houve uma marcada flutuação entre a época de seca e chuvas. Houve uma máxima AEC de 7.169 m² no pico das chuvas e uma mínima AEC de 1.170 m² na segunda metade da época seca. Quatro OX e algumas poças em MFS mantiveram a AEC de época seca nesta localidade. Finalmente, o Koiopi, apresentou a AEC remanescente de época seca em algumas poças de dois MFS (somando 564 m²). No período chuvoso, constatamos que os AEC tipo FAAR foram também importantes nas comunidades de Raxasi, Mahaxipoha e Apiahik, com estas duas últimas comunidades também com uma abundância relativa importante de AEC tipo OX. Dentre todas as comunidades do Toototobi, somente no Apiahik foi detectada uma NOX permanente.

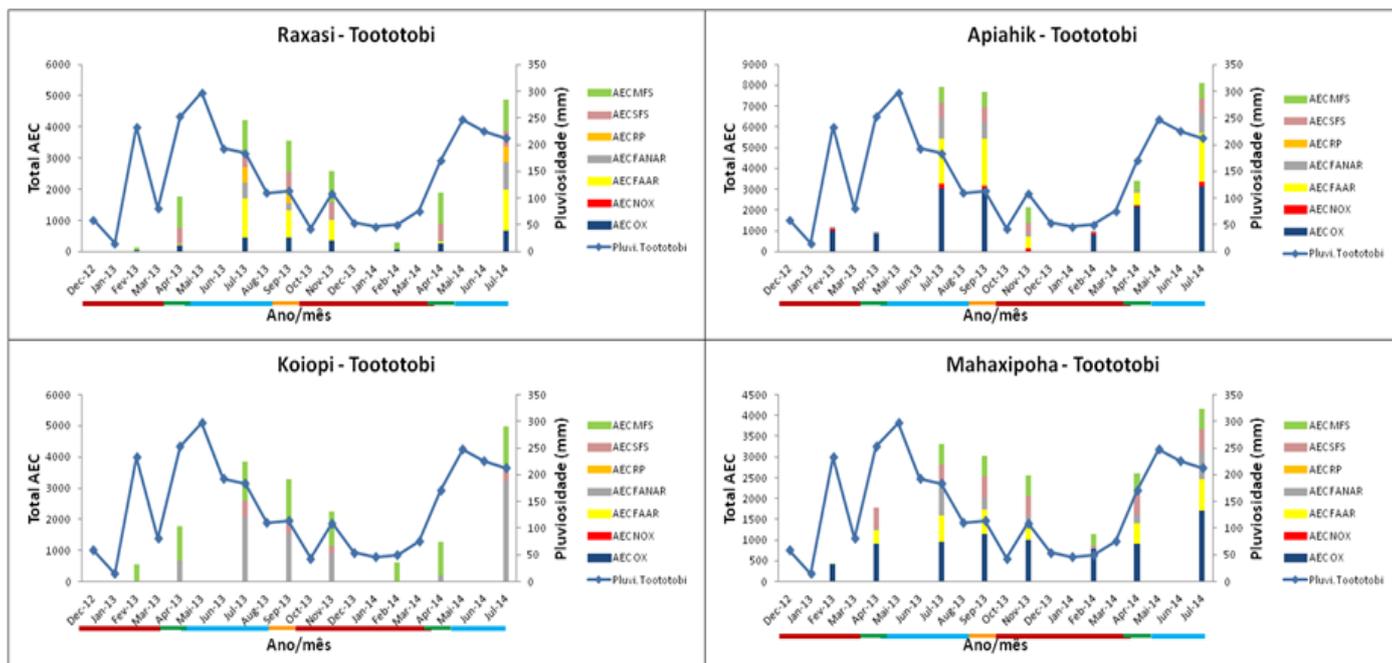


Figura 31. Dados mensais de pluviosidade e dinâmica da Área Efetiva de Criação (AEC), por tipo de criadouro nas comunidades de Toototobi. Abaixo do eixo horizontal principal indicam-se os meses de época seca (vermelho), verde para o mês de transição seca-chuvas, azul-chuvas e amarelo-transição chuvas-seca. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

A AEC teve uma dinâmica sazonal diferente no Polo Base de Parafuri. Neste caso, não houve uma diferença tão marcada entre a AEC disponível na segunda metade da época seca e o pico das chuvas. A Figura 32 apresenta a dinâmica sazonal do total de AEC por tipo de criadouro nas quatro comunidades estudadas do Parafuri, associando-as com os níveis de pluviosidade local. A comunidade de Xaruna somente contou com um pequeno NOX (ao redor de 200 m² de AEC) como representante de LAR na região, e não foi localizado nenhuma OX em um raio de 1 km da localidade. No entanto a presença de AEC associada a SFS, MFS e FANAR foi mais prevalente nesta comunidade. O Warareu apresentou uma grande proporção de AEC tipo OX e NOX, constituindo a maior parte dos criadouros próximos a esta localidade. A AEC de tipo temporário predominou em algumas localidades de Toototobi, levando a uma flutuação do AEC total por localidade muito maior em comparação com as comunidades onde os AEC de tipo LAR predominam, como no caso de Warareu e Komomassipe, onde constatamos que a AEC total ao longo do ano foi mais constante. Uma exceção a esta tendência foi o que encontramos na comunidade de Makabey, onde um enorme OX com 3.084 m²

de AEC na época das chuvas passou a ter somente 925 m² na segunda metade da época seca (novembro-dezembro 2014).

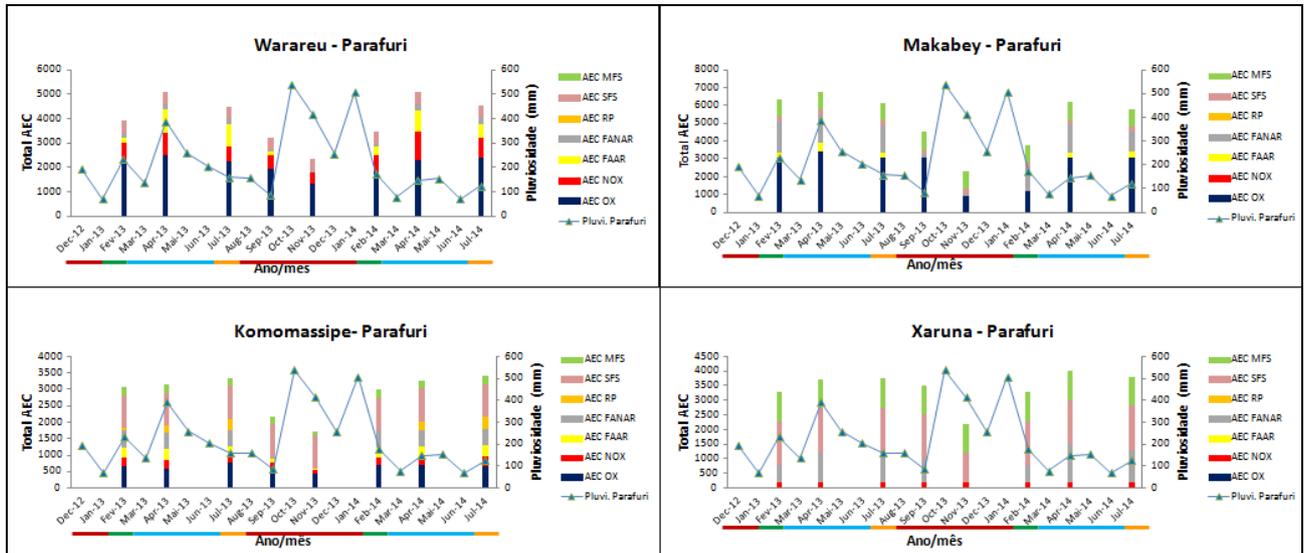


Figura 32. Dados mensais de pluviosidade e dinâmica da Área Efetiva de Criação (AEC), por tipo de criadouro nas comunidades de Parafuri. Abaixo do eixo horizontal principal indicam-se os meses de época seca (vermelho), verde para o mês de transição seca-chuvas, azul-chuvas e amarelo-transição chuvas-seca. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

Em resumo, pudemos constatar uma redução do total de AEC na segunda metade da época seca nas duas áreas (novembro/dezembro para Parafuri e janeiro/fevereiro para o Toototobi). As flutuações foram muito mais marcadas entre estações na área de planície do Toototobi, onde quantificamos um mínimo de 2.290 m² no pico da época seca de 2013 e um máximo de 21.973 m² no pico da época de chuvas de 2014. Já para o Parafuri, o mínimo de AEC calculado foi de 8.546 m² na segunda metade da época seca de 2014 e um máximo de 18.725 m² no pico da época das chuvas em 2014. Portanto, o aumento relativo entre o mínimo e máximo de AEC no Toototobi foi de 859%, enquanto no Parafuri foi somente de 119%.

Não conseguimos monitorar de forma diária as flutuações das cotas dos rios de Toototobi e Parafuri (rios Inajá e Parima), devido à falta de um observador que pudesse registrá-las. No entanto, obtivemos dados de pluviosidade local. Coletamos os dados de chuvas fortes locais em períodos de 24 horas na área de Toototobi ao longo de nosso período de estudo, ressaltando chuvas de mais de 50 mm num período de 24 horas e entre 20 e

50 mm em 24 horas. Além das chuvas locais, as precipitações em áreas mais distantes, como nas cabeceiras dos rios, poderão influenciar na magnitude dos PI de áreas rio abaixo. Entre os dias 3.10.13 e 7.2.14 (época seca) a estação meteorológica do Parafuri deixou de funcionar, não sendo registrados os dados de chuvas intensas nesta região. Constatamos somente uma chuva forte, de 98,1 mm, no período seco de 2013 no Parafuri. Também constatamos uma diferença no número de episódios de chuvas fortes entre o período de chuvas do ano 2013 (nove registros com três maiores a 50 mm-24 horas) e o período de chuvas de 2014 (cinco e sem nenhum período chuvoso maior a 50 mm-24 horas). Cabe destacar que durante a campanha de novembro de 2013, foi documentado um PI na região do rio Inajá associado a chuvas muito fortes. Infelizmente, não pudemos registrar os dados de pluviosidade nem quantificar o incremento do nível de água do rio Inajá.

4.20 Dados de sazonalidade das larvas e adultos em Toototobi e Parafuri.

Normalmente, foram coletadas mais larvas que adultos. No entanto, houve algumas campanhas em que o total de adultos coletados foi claramente maior que o do número de larvas, como aconteceu na campanha de abril/maio de 2013 no Parafuri e no Toototobi. Estas diferenças foram causadas por abundância de *An. oswaldoi s.l.* em duas coletas nas comunidades de Mahaxipoha (235) e Makabey (271). No caso do Mahaxipoha, associamos este pico de densidades no mês de abril a um possível PI no mês de fevereiro e a chuvas intensas no mês de fevereiro e março registradas na sede do Polo Base. Esta intensidade de chuvas não foi registrada nos meses de fevereiro e março de 2014, e só foram coletados três exemplares de *An. oswaldoi s.l.* em abril-maio subsequente (Fig. 33).

Foram exploradas algumas correlações entre o total de formas adultas e larvas espécie-específicos ao longo das oito campanhas, realizando-se análises por Polo Base. Não encontramos correlação entre o número de larvas coletadas e as formas adultas, seja no Toototobi (*An. oswaldoi s.l.*; $r=0,3571$, $P=0,3894$) seja no Parafuri (*An. oswaldoi s.l.*; $r=0,3571$, $P=0,3894$; *An. darlingi*; $r=0,6347$, $P=0,0962$). Mesmo analisados os dados à escala de comunidade,

tampouco vimos correlação entre o número de larvas e adultos de *An. oswaldoi* s.l. coletados na comunidade Koiopi ($r=0,4970$, $P=0,2162$).

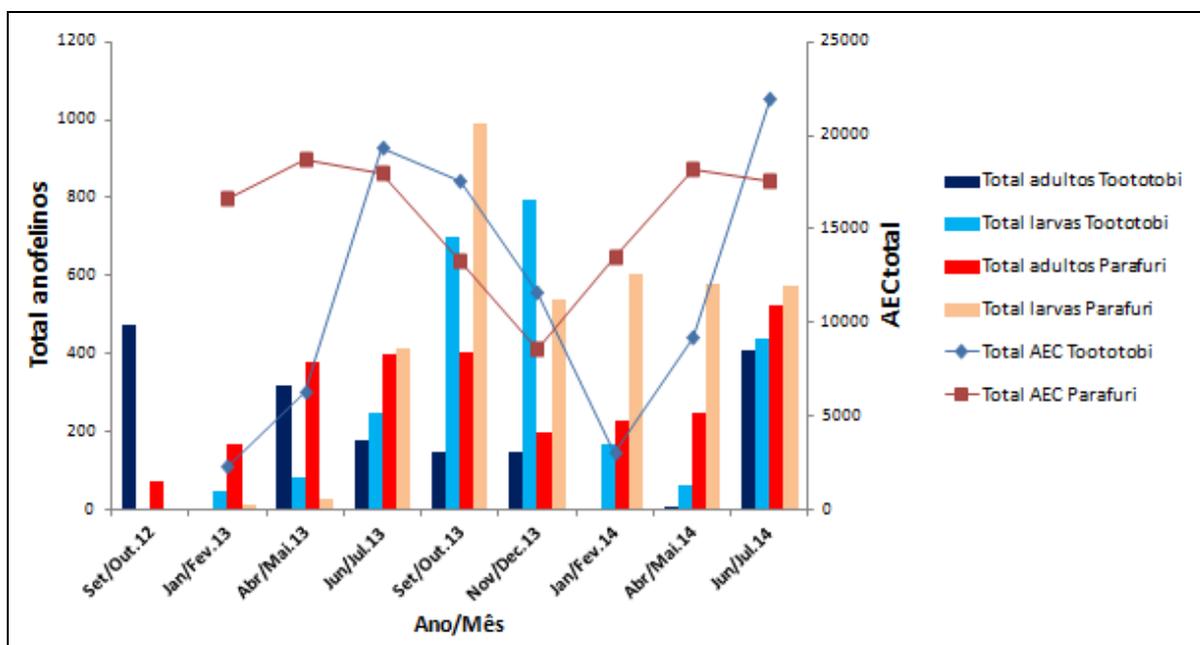


Figura 33. Associação da Área Efetiva de criação e o número de larvas e adultos por mês de coleta (janeiro de 2013 a julho de 2014) em Toototobi e Parafuri. Set/out 2012 não foi feita coleta de larvas.

Na Figura 34, são mostrados dados de sazonalidade das espécies de adultos mais abundantes e sua relação com os tipos de AEC associados aos PI e os tipos de AEC não associados aos PI. Não encontramos correlações significativas entre as densidades de *An. oswaldoi* s.l. e os dois tipos de AEC (associado ao PI ou não associado ao PI). No entanto, para *An. intermedius* ($r=0,8538$, $p=0,01$) e *An. mattogrossensis* ($r=0,8024$, $p=0,02$) encontramos correlações positivas entre as densidades destes anofelinos e o total de AEC associado aos PI. Para estas três espécies também encontramos uma correlação das suas densidades com o total de AEC do tipo não associado ao rio ($P<0,05$). Os dois tipos de AEC presentes nesta seção tiveram flutuações sazonais muito semelhantes ao longo do ano, com um pico máximo no período de chuvas (julho) em ambos os anos e com os níveis mais baixos na segunda metade da época seca (janeiro a março).

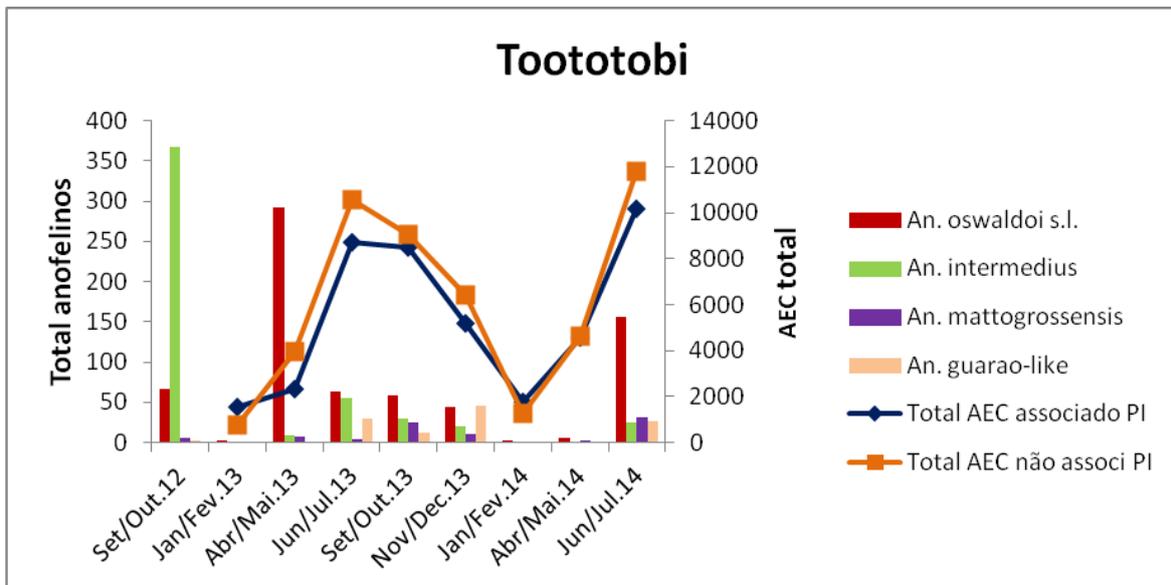


Figura 34. Dinâmica sazonal do total de formas adultas coletadas das espécies de anofelinos mais abundantes do Toototobi, setembro 2012 a julho 2014.

Na Figura 35 mostramos os dados por tipo de AEC associado e não associado aos PI no Parafuri. Diferentemente de Toototobi, não encontramos nenhuma correlação positiva entre os tipos de AEC (associados ao PI ou não) e as densidades das espécies mais abundantes ($P > 0.05$). No entanto, a flutuação dos dois tipos de AEC quando considerando o Polo Base conjuntamente, tiveram comportamentos muito parecidos, apresentando a menor disponibilidade de AEC na segunda metade da época seca (novembro). Os maiores períodos de disponibilidade de AEC ocorreram nos meses de chuva e transição chuvas-seca.

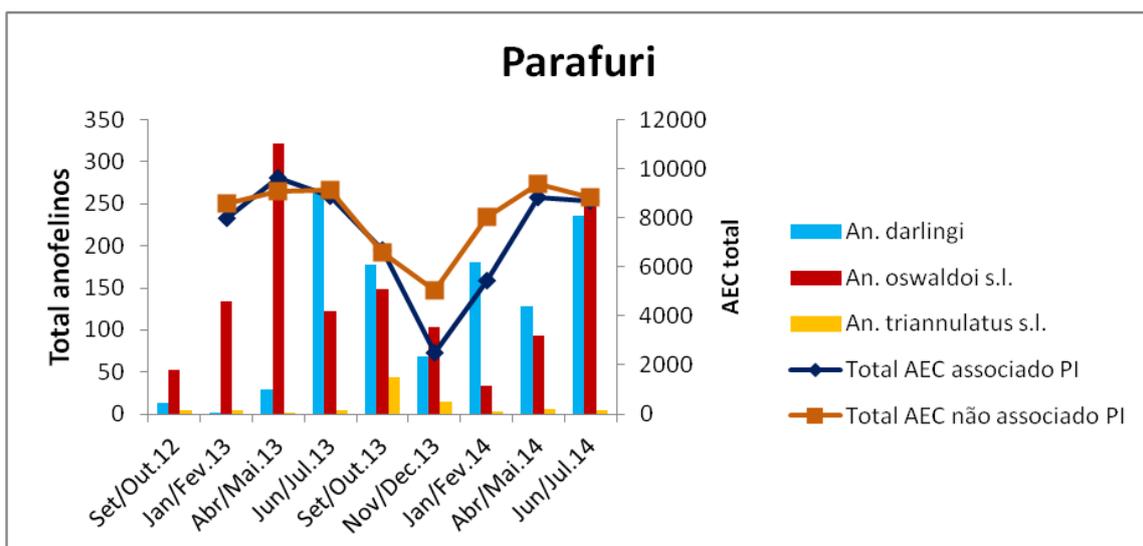


Figura 35. Dinâmica sazonal do total de formas adultas coletadas das espécies de anofelinos mais abundantes do Parafuri, setembro 2012 a julho 2014.

4.21 Dinâmica sazonal das espécies mais abundantes nas comunidades de Parafuri e Toototobi .

Comunidade de Komomassipe (Parafuri) - *An. darlingi*.

A comunidade de Komomassipe apresentou as maiores densidades de *An. darlingi* de toda a área Yanomami estudada. A 228 metros das habitações indígenas, encontra-se um OX que constitui o principal criadouro da Unidade de Sanfona (UdS) desta localidade. Na Figura 36 é destacada a dinâmica sazonal dos criadouros que foram encontrados positivos para o *An. darlingi* em 1 km rádio do Komomassipe. Já na Figura 37 são apresentadas três informações por campanha: 1) a variação sazonal dos diferentes tipos de AEC, 2) o total de larvas de *An. darlingi* coletadas e 3) o total de formas adultas de *An. darlingi*. Além do OX principal, encontramos mais um OX, um NOX, uma FAAR, uma FANAR, dois áreas de RP, três SFS e um MFS. A máxima contração da UdS aconteceu na segunda metade da época seca (Fig. 36 - C, novembro 2013), quando somente foram coletadas larvas de *An. darlingi* no OX principal. Contrariamente, encontramos a maior extensão do raio de ocorrência do *An. darlingi* no final da época de chuvas e começo do período de transição chuva - seca (Fig. 36 - A, julho 2013). Komomassipe foi um exemplo da expansão e contração de criadouros positivos para *An. darlingi* (incluindo FANAR, NOX e RP na época das chuvas) a partir de um OX principal. Neste período de coleta (novembro de 2014) documentamos um PI importante que alagou a OX principal e os outros criadouros associados ao rio desta microrregião, modulando a dinâmica populacional de *An. darlingi*.

As maiores densidades de larvas corresponderam a primeira metade da época seca, enquanto que o maior número de alados foi coletado no mês anterior (transição chuvas-seca) para ambos os anos. Encontramos uma importante diferença de densidades tanto de larvas como adultos, nas capturas de fevereiro e abril de 2013 e essas dos mesmos meses de 2014.

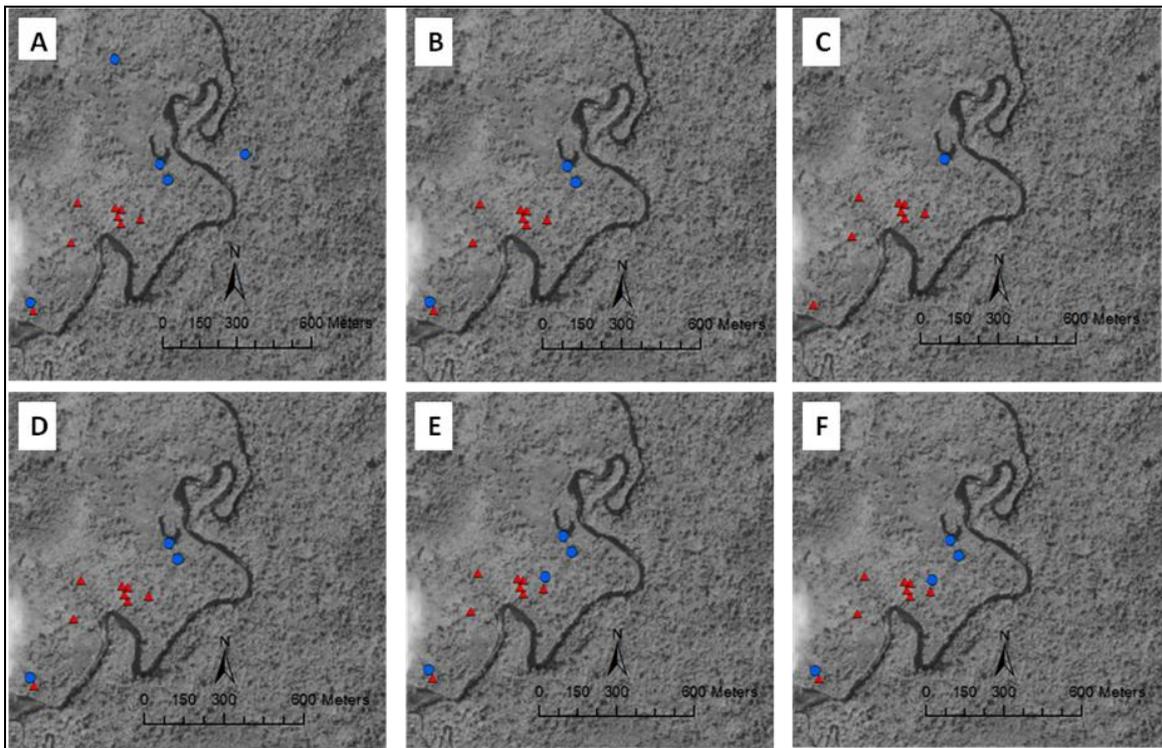


Figura 36. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para *An. darlingi*, Komomassipe - Parafuri. Os círculos azuis representam os criadouros positivos para *An. darlingi* e os símbolos vermelhos a localização das pequenas habitações da comunidade do Komomassipe. **A.** Transição chuvas-seca; **B.** Primeira metade da seca; **C.** Segunda metade da seca; **D.** Transição seca-chuvas; **E.** Época de chuvas e **F.** Transição chuvas-seca. Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery.

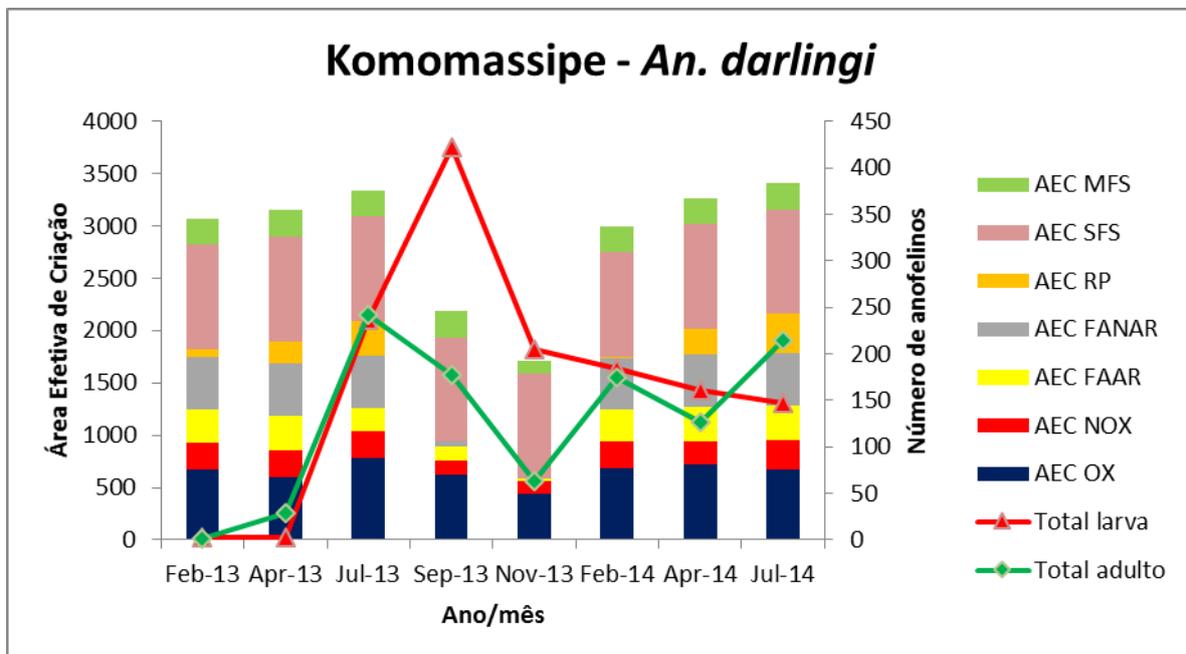


Figura 37. Relação da Área Efetiva de Criação por tipo de criadouro e abundância de formas adultas e larvas de *An. darlingi* no Komomassipe - Parafuri. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

Comunidade de Koiopi (Toototobi) - *An. oswaldoi* s.l.

Encontramos exemplares ocorrendo em simpatria nesta localidade de *An. oswaldoi* B e *An. oswaldoi* A. Estes dados alertam para que as larvas que identificamos como *An. oswaldoi* s.l. podem, na verdade, ser representantes das duas espécies. Não realizamos testes moleculares nas larvas de *An. oswaldoi* s.l. Koiopi é a única comunidade estudada que não se encontra próxima a um rio e portanto, todos os criadouros num rádio de 1 km não estão associados aos PI (FANAR, SFS e MFS). A Figura 38 mostra a dinâmica sazonal dos criadouros que foram encontrados positivos para o *An. oswaldoi* s.l. Detectamos que na época de chuvas (Foto-A) o raio de ocorrência desta espécie estava na sua máxima expansão, com oito criadouros positivos (incluindo FANAR, MFS e SFS). Identificamos uma produção relativa das FANAR decrescentes desde a época de chuvas, até encontrar somente exemplares de *An. oswaldoi* s.l. em poças de MFS na segunda metade da época seca, onde a única AEC disponível era em MFS. Estes criadouros foram identificados como os FRE de *An. oswaldoi* s.l. nesta microrregião do Koiopi. No caso da época chuvosa de julho de 2014, encontramos uma grande disponibilidade de AEC, mas com poucos criadouros positivos.

Na figura 39 apresentamos a dinâmica das densidades de larvas, adultos e tipos de AEC no Koiopi. As maiores densidades de larvas foram encontradas na primeira metade da época seca, quando ocorreu a estabilização dos criadouros depois dos PI da época chuvosa. Não encontramos um pico claro de densidades de adultos para este local. No entanto, ao igual que nas outras comunidades do Toototobi, tanto as populações de larvas como de adultos quase desapareceram na segunda metade da época seca.

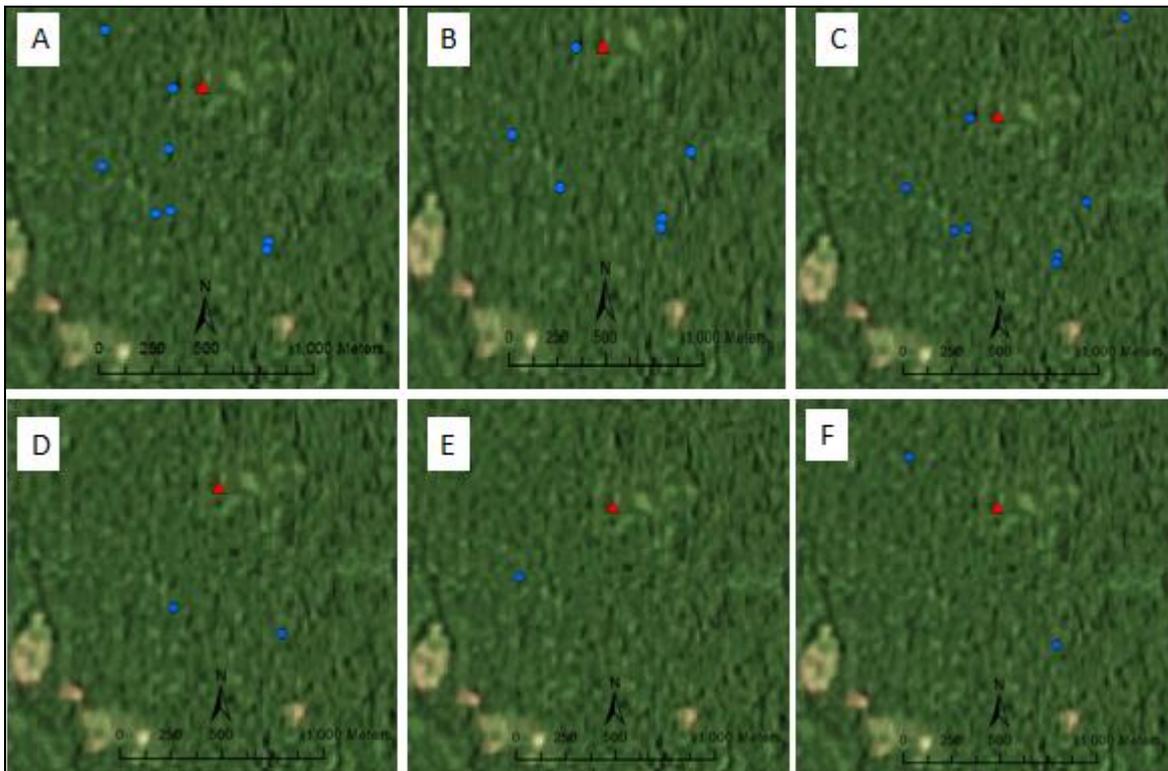


Figura 38. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para *An. oswaldoi s.l.* - Koiopi - Toototobi. Os círculos azuis representam os criadouros positivos para *An. oswaldoi s.l.* e os símbolos vermelhos a localização da comunidade de Koiopi. **A.** Época de chuvas; **B.** Transição chuvas-seca; **C.** Primeira metade da seca; **D.** Segunda metade da seca; **E.** Transição seca-chuvas e **F.** Época de chuvas. Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery.

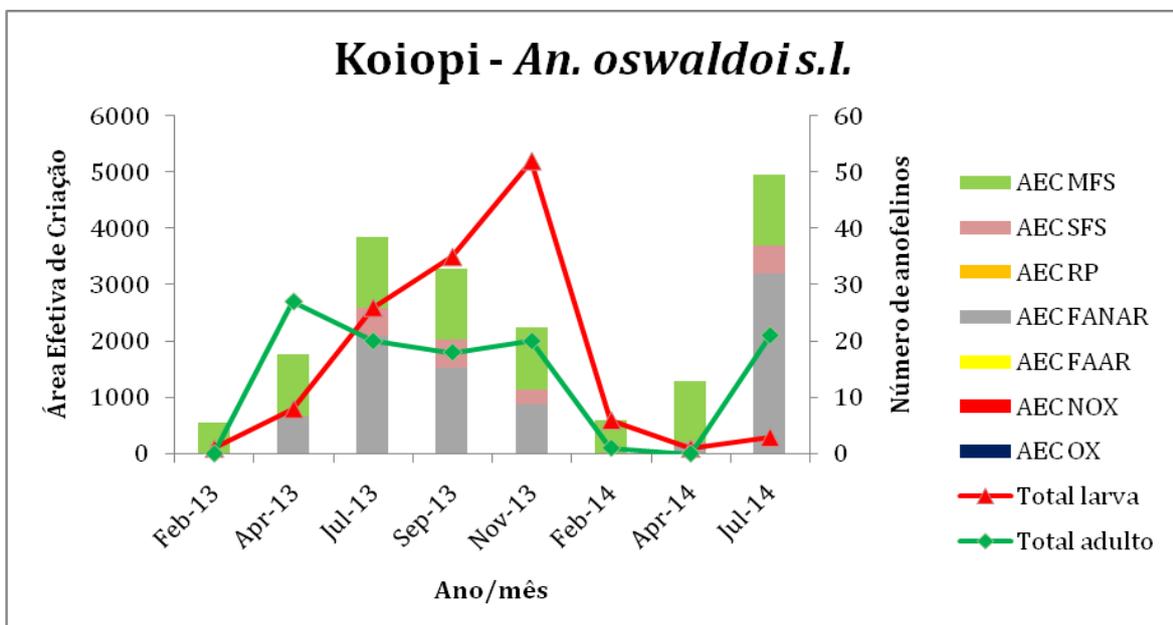


Figura 39. Relação da Área Efetiva de Criação e abundância de adultos e larvas de *An. oswaldoi s.l.* no Koiopi - Toototobi. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

Comunidade de Apiahik (Toototobi) - *An. mattogrossensis*.

Na Figura 40 é ilustrada a dinâmica sazonal dos criadouros que foram encontrados positivos para o *An. mattogrossensis* na comunidade de Apiahik. Na Figura 41 são apresentadas as mesmas informações para o *An. mattogrossensis* que as que aparecem nas Figura 37 e 39. O máximo raio de ocorrência desta espécie aconteceu na época de transição chuvas-seca e na primeira metade da época seca, com a maior parte de larvas coletadas em criadouros tipo FAAR e OX. Detectamos aqui uma mudança na contribuição dos OX e FAAR na produção de *An. mattogrossensis*. Na primeira metade da época seca (C) as proporções se inverteram e os OX passaram a representar 61,5% das larvas coletadas, enfrente 38,5% das FAAR. Seguindo essa tendência, os OX foram os únicos criadouros positivos identificados na segunda metade da época seca e constituíram também os FRE para esta espécie neste local. Embora o total de AEC sofreu uma expansão significativa entre a segunda metade da época seca (Foto D) e a estação de transição seca-chuva (Foto E) (de 981 m² para 3.403 m²), não foi coletada nenhuma larva desta espécie nos corpos de água de recente formação.

Encontramos um pico tanto de formas adultas como de larvas nos meses de transição chuvas-seca e primeira metade da época seca. Ao igual que *An. oswaldoi s.l.*, as populações de *An. mattogrossensis* quase sumiram na segunda metade da época seca e no período de transição seca-chuvas.

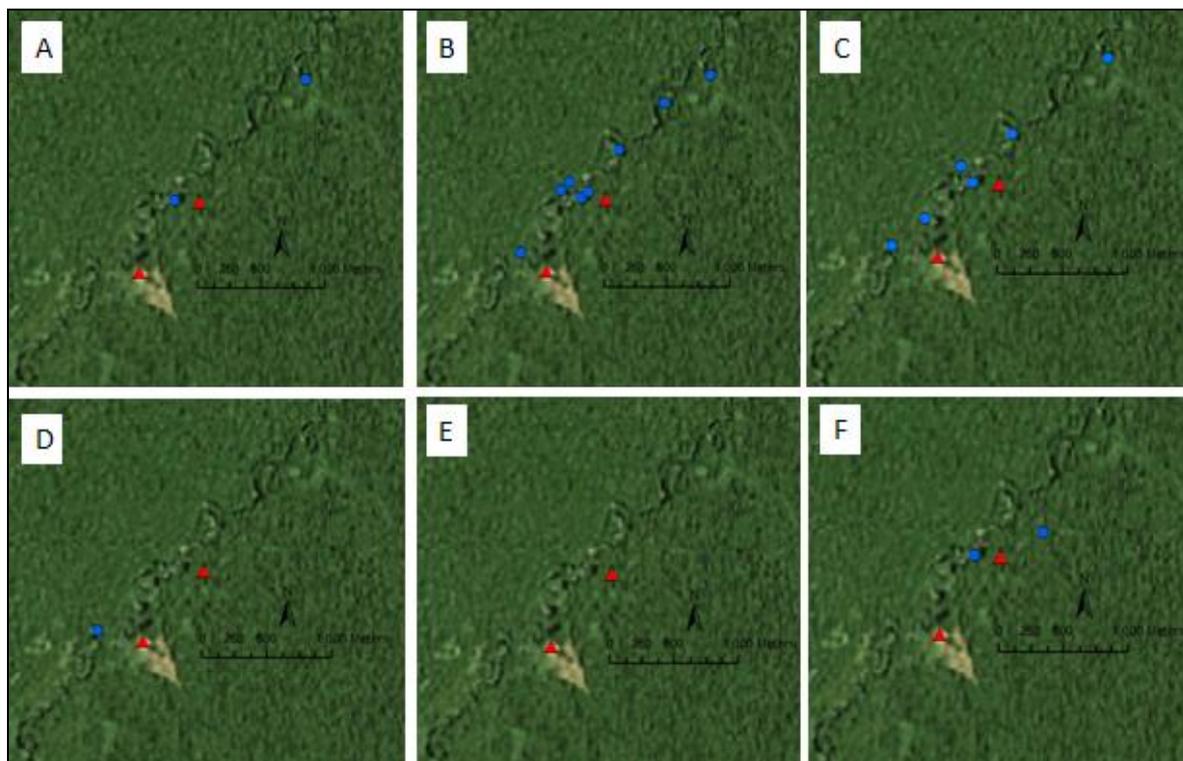


Figura 40. Dinâmica sazonal dos criadouros positivos para *An. mattogrossensis*, Apiahik - Toototobi. Os círculos azuis representam os criadouros positivos para *An. mattogrossensis*, e os símbolos vermelhos a localização da comunidade Apiahik. **A.** Época de chuvas; **B.** Transição chuvas-seca; **C.** Primeira metade da seca; **D.** Segunda metade da seca; **E.** Transição seca-chuvas e **F.** Época de chuvas. Fonte: ArcGIS Basemap World Imaginery.

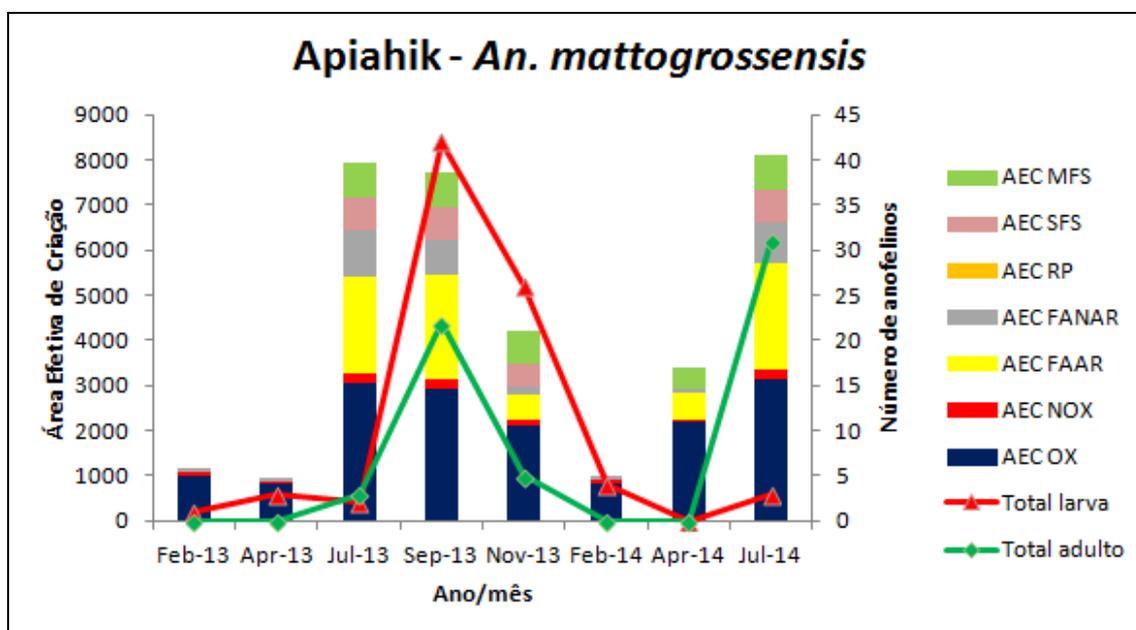


Figura 41. Relação da Área Efetiva de Criação e abundância de adultos e larvas de *An. mattogrossensis* no Apiahik - Toototobi. OX - lago oxbow, NOX - Lago não oxbow, FAAR - Áreas inundadas associadas aos rios, FANAR - Áreas inundadas não associadas aos rios, RP - Poças chuva, SFS - córregos e MFS - igarapés.

Comunidade de Apiahik (Toototobi) - *An. oswaldoi s.l.*

Apresentamos a dinâmica das populações de larvas e adultos de *An. oswaldoi s.l.* numa comunidade onde os OX fizeram o papel de FRE para esta espécie, confirmando que o *An. oswaldoi s.l.*, além de poder explorar os FRE em poças de MFS (ex: Koiopi), também pode manter os últimos exemplares das suas populações em FRE tipo OX de uma microrregião concreta. Houve um pico de larvas na primeira metade da época seca (novembro de 2014), associada a um incremento da produção das FAAR (38,5%) e das OX locais (61,5%). Este pico de densidades acentuado de formas larvares não esteve acompanhado de um incremento associado de formas adultas.

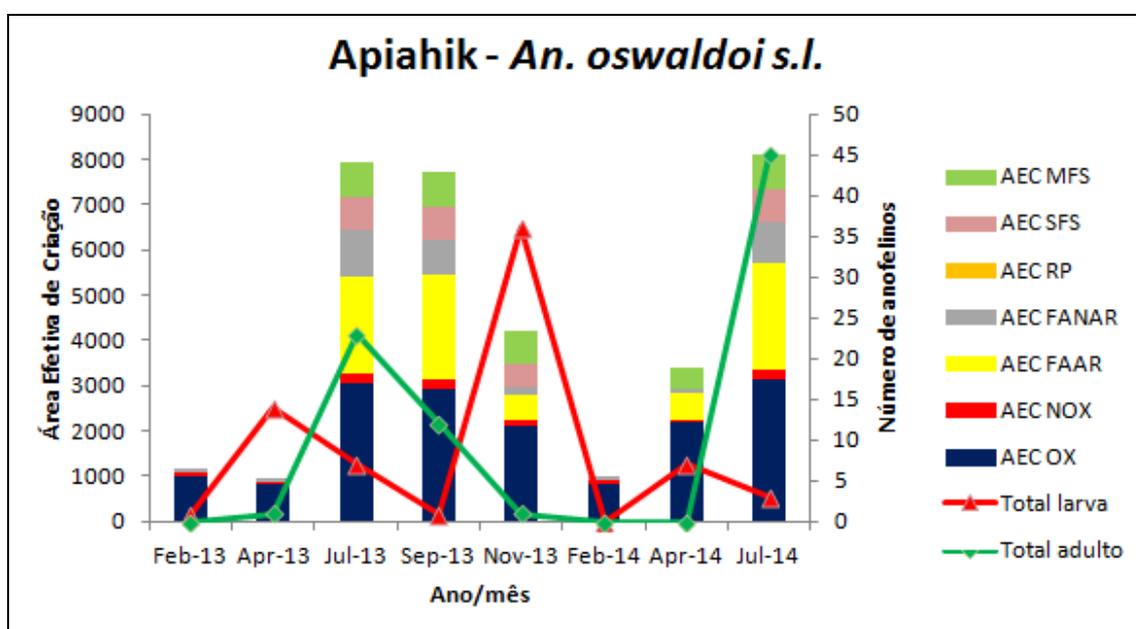


Figura 42. Relação da Área Efetiva de Criação e abundância de formas adultas e larvas de *An. oswaldoi s.l.* no Apiahik - Toototobi.

4.22 Dados de mobilidade dos Yanomami: Toototobi, Parafuri e Marari.

Constatamos alguns padrões e mobilidade diferenciados entre nossas comunidades de estudo. Enquanto algumas comunidades sempre tiveram a maior parte dos seus integrantes na comunidade ao longo do estudo, outros indígenas passaram longos períodos fora das respectivas habitações principais, deixando em alguns casos a comunidade totalmente vazia ou com muitos poucos integrantes por períodos consideráveis de tempo. Constatamos estas situações principalmente nas comunidades de: Raxasi (passaram quatro

meses fora entre janeiro de 2013 e abril de 2013), Apiahik (a comunidade ficou quase vazia entre janeiro de 2013 e abril 2013 devido ao deslocamento da maior parte da comunidade à residência secundária do Sinatra), Warareu (a comunidade ficou durante três períodos de quase um mês em tapiris deixando a comunidade totalmente abandonada) e Xaruna (houve dois períodos durante a duração do projeto que a comunidade ficou um mês e dois meses fora respectivamente).

No caso das comunidades de Marari, encontramos dois períodos em que os Yanomami de alguma comunidade tinham se deslocado em massa para as residências secundárias. Foi o caso da comunidade do Castanha e Taibrapa que tinham se deslocado em agosto 2013 para suas residências secundárias do Castanha 3 e Taibrapa 2 respectivamente. Em setembro de 2014 a comunidade do Taibrapa também estava temporariamente no Taibrapa 2.

4.23 Dados de malária no Polo Base de Marari.

São apresentados os resultados de transmissão de malária no Polo Base Marari do período de janeiro 2013 a março 2015, cobrindo os dois anos e três meses ao longo dos quais houve coletas entomológicas neste Polo Base. Em 2013, o Marari representou somente 4% de toda a população da área Yanomami, mas os 913 Yanomami deste Polo Base concentraram o 35% de todos os casos de malária registrados em todo o DSEI-Y.

Os dados referentes às comunidades de Ahima, Castanha e Taibrapa estão ilustrados na Figura 43. Estas três comunidades estão sob a influência dos PI do sistema de rios de primeira ordem da região da sede do Polo Base. Por outro lado, na Figura 44 estão apresentados os dados de malária das comunidades do Gasolina e Alapusi, principalmente sob a influência dos PI do rio Marari (mas também do rio Catalan no caso da comunidade Gasolina). As setas em vermelho indicam PI documentados e as de amarelo PI altamente prováveis de ter acontecido, atendendo que influenciaram as fases das LAR encontradas nas áreas durante os trabalhos de campo. Adicionalmente, são apresentados os dados das coletas de formas adultas de *An. darlingi* nas diferentes comunidades. Para mais detalhe do estado das LAR em cada campanha, detalhes sobre as coletas de larvas e dessas comunidades em que não foram realizadas coletas, sugere-se olhar a tabela 27.

No caso das comunidades de Ahima e Castanha, ambas situadas na mesma área e sob a influência do rio de primeira ordem Xirinita, observamos um padrão de transmissão sazonal de malária muito parecido. A comunidade Taibrapa seguiu um padrão bem semelhante das anteriores. As três comunidades se encontram sob a influência de rios de primeira ordem que se originam nas mesmas serras.

Observamos um pico do número de casos registrados no final da época seca de 2013-2014 e início da época chuvosa de 2014 nas cinco localidades do Marari. No entanto, nestes meses não foi feita nenhuma coleta de anofelinos. Os maiores números de casos, surpreendentemente, foram registrados na comunidade do Castanha em fevereiro de 2013 (76 casos). A Fase Produtiva encontrada na OX do Gasolina em setembro de 2014, sugere que houve um PI que afetou a OX desta localidade no mês anterior (agosto de 2014). Ainda no Gasolina, observamos um aumento significativo dos casos de malária em outubro de 2014. As comunidades de Taibrapa, Alapusi e Gasolina, apresentaram um importante aumento de casos de malária em abril de 2015.

Na tabela 28 foram avaliados os principais parâmetros que determinariam se uma comunidade teria alta receptividade e vulnerabilidade à transmissão da malária. A comunidade de Komomassipe apresentou uma das maiores densidades de *An. darlingi*. Algumas das habitações estão localizadas somente a 233 metros do OX mais produtivo (45 LAR foram amostrados) para esta espécie. Esta localidade, portanto, é um exemplo de um local altamente receptivo para a transmissão local de malária. As densidades de espécies principalmente exofágicas como o *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius*, *An. costai-like* ou *An. guarao-like* foram muito baixas nesta comunidade (1). Ao contrário, o Komomassipe foi uma comunidade muito pouco vulnerável à introdução de transmissão de plasmódio, sendo uma comunidade onde os seus membros não se deslocam para fora da área indígena, não tem presença de garimpeiros nas proximidades da comunidade e as visitas a outras comunidades são muito limitadas. O exemplo diferente seria a comunidade de Xaruna. Somente foram coletados dois *An. darlingi* adultos ao longo dos dois anos de projeto, mas as densidades de espécies exofágicas (2) (principalmente de *An. oswaldoi s.l.*) foram maiores que no Komomassipe. Esta comunidade está também em uma situação bastante isolada, sem quase contato com comunidades do Parafuri.

No entanto, um fator de risco epidemiológico é a presença de garimpeiros na região do rio Parima próximo à comunidade.

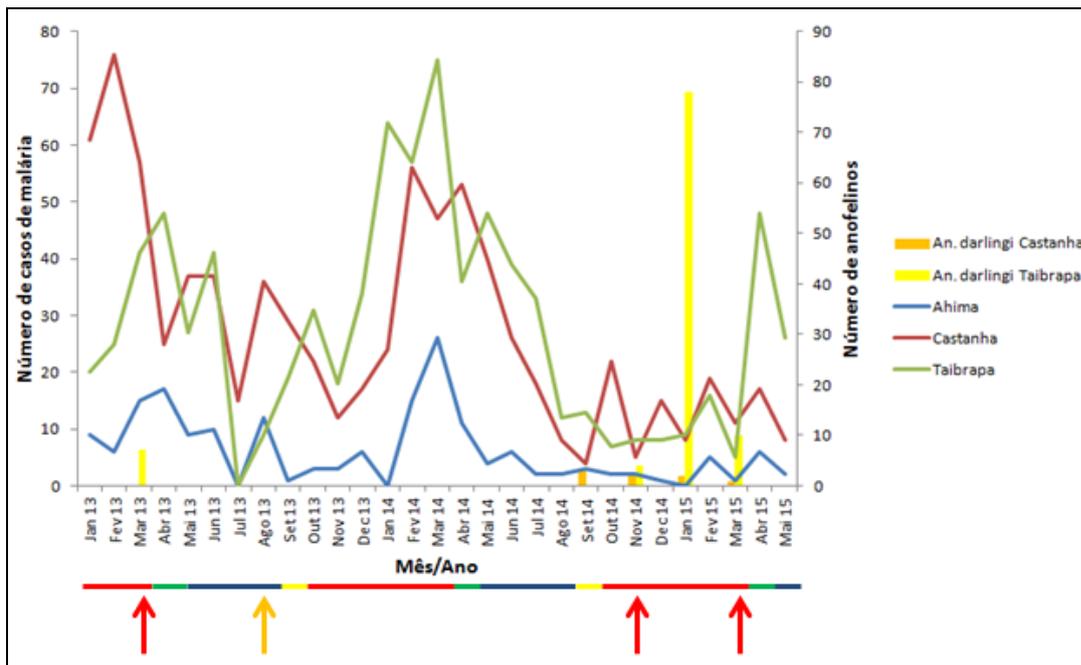


Figura 43. Número de casos de malária diagnosticados por mês entre janeiro de 2013 e maio de 2015 nas comunidades de Ahima, Castanha e Taibrapa e número de *An. darlingi* adultos coletas entre março de 2013 e março 2015.

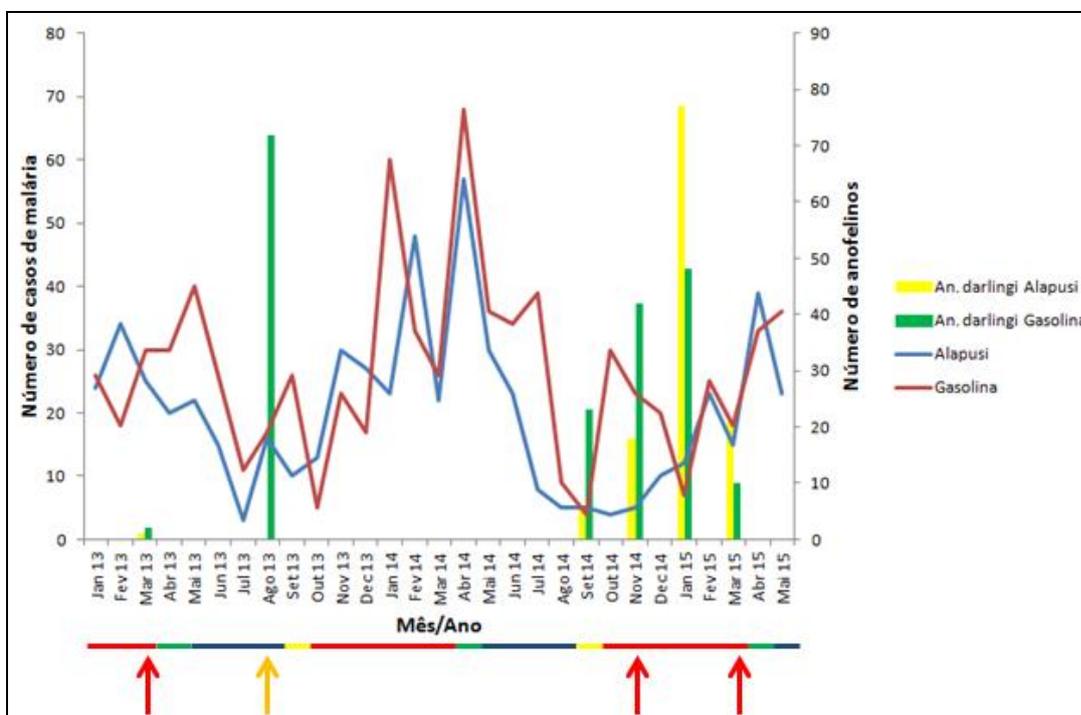


Figura 44. Número de casos de malária diagnosticados por mês entre janeiro de 2013 e maio de 2015 nas comunidades de Gasolina e Alapusi e número de *An. darlingi* adultos coletas entre março de 2013 e março 2015.

As comunidades do Polo Base de Toototobi se caracterizaram por ter uma baixa receptividade, definida pela falta de LAR de alta produtividade de anofelinos (especialmente durante a época seca) e a quase inexistência de *An. darlingi* na área (somente foram capturados dois exemplares de *An. darlingi* no Apiahik em dois anos de capturas). Ao contrário, em todas as comunidades desse Polo foi constatada uma densidade média de várias espécies de anofelinos exofágicos, como *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius*, *An. mattogrossensis*, *An. costai-like* e *An. guarao-like*.

As comunidades do Marari apresentaram características de receptividade e vulnerabilidade muito diferentes aos outros dois Polos Base. O *An. darlingi* está presente em todas as comunidades em umas densidades médias, com exceção das comunidades Castanha e Taibrapa 2. A presença em geral de anofelinos exofágicos foi muito baixa, com exceção do Taibrapa 2, onde foram registradas densidades muito altas de *An. nuneztovari s.l.* As comunidades do Marari são muito vulneráveis à malária, devido ao alto grau de interconectividade entre as comunidades e, principalmente, as regulares viagens que fazem fora da área indígena (especialmente na comunidade não indígena de Nova Jerusalém), representando uma via frequente de reintrodução de plasmódios no Marari. Na atualidade não existe garimpo nem na área Yanomami de Marari nem de Toototobi.

Tabela 28. Avaliação de parâmetros de receptividade e vulnerabilidade à malária das 13 comunidades estudadas, Toototobi, Parafuri e Marari.

Polo - Comunidade	Receptividade				Vulnerabilidade		
	<i>An. darlingi</i>	An. exofágicos	Produtividade LAR	Tamanho população Yanomami	Contato fora área Yanomami	Contato entre as comunidades do Polo	Presença garimpo
TOOTOTOB							
Mahaxipoha	0	2	1	Média (50)	1	2	0
Raxasi	0	2	0	Média (89)	1	2	0
Apiahik	1	2	1	Média (81)	1	2	0
Koiopi	0	2	0	Média (79)	1	1	0
PARAFURI							
Xaruna	1	2	0	Média (93)	0	0	3
Makabey	1	2	1	Média (64)	0	1	3
Warareu	1	2	2	Média (64)	0	1	0
Komomassipe	3	1	3	Grande (138)	0	1	0
MARARI							
Alapusi	2	1	2	Grande (56)	3	3	0
Castanha	1	1	1	Muito grande (237)	3	3	0
Ahima	1	1	1	Média (56)	3	3	0
Taibrapa	2	1	2	Muito grande (234)	3	3	0
Gasolina	2	1	2	Muito grande (233)	3	3	0

Parâmetros descritos como: 0=ausente, 1=baixa, 2=média e 3=alta frequência. Pequena < 50 habitantes, Média 50 - 100, Grande 100 - 200, Muito grande >200.

5. DISCUSSÃO

Embora se tenha registrado uma redução importante no número de casos de malária nas Américas entre 2001 e 2012, ainda existem grupos populacionais onde esse agravo se distribui de maneira desigual, sendo o exemplo mais claro os grupos indígenas [37]. No interior das grandes reservas indígenas do Brasil, existem áreas sem aparente circulação de plasmódio e outras onde a transmissão ocorre de forma muito mais intensa e ao longo do ano [60]. Inclusive dentro do DSEI-Y, existem Polos Base com tendência a apresentar altos níveis de transmissão ao longo dos anos (ex: Marari) e outros locais com um histórico de casos de malária muito menor [56].

Os nossos resultados mostram que nos Polos Base Toototobi, Parafuri e Marari, as características entomológicas de cada aldeia têm um papel fundamental na prevalência e intensidade da transmissão local da malária. Um dos fatores determinantes que reconhecemos em nossas investigações foi a existência de lagos associados a rios (LAR) dentro de um raio de 1 km da aldeia que são favoráveis à produção de espécies epidemiologicamente importantes, como o *An. darlingi*. Além da abundância e proximidade dos LAR às habitações indígenas, outro fator importante que identificamos foi a qualidade dos LAR quanto à produtividade para *An. darlingi*: determinada pela boa exposição ao sol, presença de vegetação emergente e/ou submersa, algas filamentosas verdes e detritos flutuantes expostos ao sol. Observamos que as comunidades localizadas em áreas com rios mais meândricos, e com tendência a formar maior número de OX, constituiriam áreas com melhores condições para a transmissão da malária. Áreas com NOX produtivas de *An. darlingi* têm sido apontadas como altamente receptivas para a transmissão da malária [161].

Nos três polos Base Yanomami foram coletadas várias espécies de anofelinos associadas à transmissão da malária, como: *An. darlingi*, *An. oswaldoi* s.l., *An. intermedius*, *An. nuneztovari* s.l., *An. triannulatus* s.l. e *An. mattogrossensis*. Além de *An. costai*-like, *An. guarao*-like, *An. nimbus*, *An. thomasi*, *An. squamifemur* e *An. (Kerteszia) sp.* coletadas em menor densidade e cujo envolvimento na transmissão de malária não está bem estabelecido. Em Toototobi e Parafuri, a espécie mais abundante foi *An. oswaldoi* s.l., seguida de *An. intermedius* em Toototobi, e *An. darlingi* no Parafuri. No Marari

predominaram as espécies associadas à proliferação em LAR parcialmente ou expostos ao sol, como o *An. darlingi* e *An. nuneztovari* s.l.. Em outras localidades do Brasil associadas aos ambientes de floresta ou de recente desmatamento o *An. oswaldoi* s.l. predominou [114]. Adicionalmente, *An. oswaldoi* s.l. e *An. intermedius* foram muito abundantes em regiões da floresta Amazônica da Guiana Francesa [87].

Coletamos a maioria dos anofelinos em ambientes fora das habitações indígenas, inclusive o *An. darlingi*. Tem sido observado que o grau de comportamento endo-exofágico do *An. darlingi* é variável ao longo de sua distribuição geográfica [31]. O *An. darlingi* foi a espécie mais comum no interior das habitações indígenas nos primeiros horários da noite (18-22 horas), entretanto em densidades muito menores do que nos ambientes peridomiciliares e extradomiciliares. Dos oito *An. darlingi* encontrados infectados no Marari, sete foram coletados em ambientes peridomiciliares ou extradomiciliares e apenas um no interior das malocas indígenas. Nas aldeias onde constatamos maior abundância de *An. darlingi* intradomiciliares, coletamos 16,6%, 9,1%, 5,5% e 5,4% dos *An. darlingi* no interior das habitações em Alapusi, Taibrapa, Komomassipe e Gasolina, respectivamente. Nas aldeias Castanha e Taibrapa 2 todos os *An. darlingi* foram coletados fora das habitações. Vale mencionar que o fato de ter atrasado em duas horas as capturas do ambiente intradomiciliar no Marari pode ter influenciado no aumento relativo dos exemplares de *An. darlingi* no intradomicílio neste Polo Base.

Estudos realizados no Parque Nacional do Xingu já mostravam a importância da transmissão extradomiciliar e peridomiciliar em áreas indígenas, envolvendo principalmente *An. darlingi*. Durante um inquérito na comunidade indígena de Capoto da etnia Kayapó-Mentuktíre, foi constatado que o *An. darlingi* esteve presente em densidades significativamente superiores nos ambientes extradomiciliares, principalmente nas proximidades do rio a 100 metros da aldeia (84,09%), enquanto que um menor percentual (13,32%) foi capturado no ambiente peridomiciliar e só uma proporção mínima (0,79%) no interior das habitações [162]. Aproximadamente 300 km ao sul, em comunidades indígenas Xavante, 93,5% dos *An. darlingi* foram coletados na beira do rio e com maiores densidades no crepúsculo vespertino e nas horas do amanhecer, horários onde foi constatada uma maior frequência dos

indígenas na beira dos rios [163]. Na comunidade de Cuminipanema de etnia Zo'é, no Pará, *An. darlingi* se apresentou com maior frequência no peridomicílio. Este grupo indígena mora em condições parecidas a dos Yanomami, em áreas de floresta preservada e condições de semi-isolamento, tipologia de malocas que os expõem ao contato com o vetor, localizadas próximas a um rio de 2ª ordem [164].

Sugerimos aqui que a pequena proporção de *An. darlingi* capturada no interior das aldeias em nossas áreas de estudo teria uma grande importância epidemiológica, já que sua atividade coincide com os horários de permanência dos Yanomami dentro das malocas, facilitando o contato efetivo vetor-homem. Nas áreas de Parafuri e Marari, o *An. darlingi* apresentou uma maior atividade entre às 23 e 01 horas, com atividade menor antes e depois deste pico unimodal. No Marari, na comunidade do Alapusi, detectamos também atividade importante de *An. darlingi* entre as 20 e 22 horas. O pico de atividade dessa espécie em Parafuri e Marari foi parecido com aquele relatado na área Yanomami de Ocamo da Venezuela, por outros autores [165]. Não obstante, na região da comunidade de Nova Jerusalém, a primeira comunidade fora da área Yanomami descendo o rio Padauri (do qual o rio Marari é tributário), foi constatado um pico bimodal nas coletas intradomiciliares, sendo o horário das 19-20 horas o mais importante, seguido por outro pico entre as 4 e 6 horas [166]. Outro estudo em comunidades indígenas do rio Baixo Caura (Ye'kuana e Sanema), na Venezuela, mostrou que, embora o *An. darlingi* tenha sido ativo toda a noite, apresentou um pico de atividade nas primeiras horas da noite, sendo ainda observado que *An. nuneztovari* s.l. foi também mais ativo durante as primeiras horas da noite (pico no horário das 18:00). Os autores concluíram que, nesta área, o risco de contrair malária é maior nos ambientes peri- e extradomiciliares antes das 22:00 horas [167].

Observamos picos de atividade decrescentes dos Yanomami nos horários crepusculares (18-21 horas), transitando no ambiente peridomiciliar e nas beiras dos rios (principalmente para tomar banho, pescar ou coletar água) e em grau muito menor nas primeiras horas da manhã (das 5 às 6 horas). No Marari, estas atividades crepusculares se estenderam até um pouco mais tarde. Entretanto, a grande maioria dos Yanomami se encontram recolhidos no interior das aldeias a maior parte da noite.

Outras espécies de anofelinos que picam no crepúsculo vespertino nos mesmos horários em que os Yanomami se encontram em atividades peridomiciliares e extradomiciliares são *An. oswaldoi s.l.*, *An. mattogrossensis*, *An. intermedius*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. triannulatus s.l.* e a fração extradomiciliar de *An. darlingi*. Estas espécies poderiam transmitir malária neste horário, mas o principal responsável pela transmissão no intradomicílio (das 20 horas às 06 horas) seria o *An. darlingi*. Em nossas áreas de estudo 8,3%, 32,7%, 42,2% e 54,1% das picadas por *An. oswaldoi s.l.* aconteceram antes das 19, 20, 21 e 22 horas respectivamente. Considerando as espécies exofágicas crepusculares mais abundantes (*An. oswaldoi s.l.*, *An. triannulatus s.l.*, *An. intermedius* e *An. nuneztovari s.l.*), 67,3% de todas as picadas aconteceram no extradomicílio antes das 22 horas. O contrário aconteceu com *An. darlingi*, onde 80,4% das picadas foram registradas entre as 22 e 6 horas. Em quase todas as aldeias onde foi constatada a presença de *An. darlingi*, foram capturados exemplares dentro das habitações Yanomami. Um estudo com populações indígenas remotas Ra-glai do Vietnã mostrou que 52% já estavam dormindo às 19 horas, com somente 24,5% ainda ativos depois das 20:00 e quase todos dentro das habitações dormindo às 21 horas (92%). Das picadas dos vetores locais (*An. dirus s.l.*, *An. minimus s.l.* e *An. maculatus*), 25% e 50% aconteceram antes das 20 e 22 horas respectivamente [168].

O *An. oswaldoi* A e B, *An. nuneztovari s.l.* e *An. intermedius* foram encontrados com atividade de picada diurna em diferentes horários e estações do ano nas comunidades estudadas, com predomínio de *An. oswaldoi s.l.* (77,7% do total). Embora pouco frequente, este tipo de contato vetor-homem poderia ter um efeito residual na cadeia de transmissão da malária. Todos os ataques diurnos aconteceram nas proximidades de algum criadouro produtivo. A importância da transmissão diurna foi relatada em outras áreas endêmicas. Na Guiana Francesa, *An. darlingi*, *An. braziliensis*, *An. intermedius*, *An. triannulatus*, *An. aquasalis*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. nimbus* foram encontrados picando de dia. Desses, *An. oswaldoi s.l.*, *An. nuneztovari* e *An. intermedius* foram também encontrados infectados [87]. Num estudo feito perto de Iquitos, Peru, 3,8% das coletas de *An. darlingi* aconteceram durante as horas diurnas (06 às 18 horas) [169]. Em mangues da costa do Pacífico da Colômbia, foi apontado que crianças e mulheres poderiam estar expostas à malária pelas

picadas infectantes de *An. neivai* durante as atividades de coleta de moluscos e outros animais durante o dia [147].

Ambientes extradomiciliares distantes das habitações indígenas (>1 km) teriam potencial de transmissão de malária na área Yanomami. Constatamos que os indígenas também praticam a pesca noturna (próximos à LAR ou no canal do rio), sendo uma atividade mais prevalente nos homens. Nestes locais as pessoas podem se expor às picadas de certas espécies de anofelinos, como o *An. oswaldoi* s.l., *An. intermedius* e *An. triannulatus* s.l.. Hipoteticamente estas espécies podem ter papel na transmissão esporádica de malária entre os pescadores nesses locais distantes. Esta possível transmissão em locais extradomiciliares distantes poderia servir de ponto de interconexão das infecções por plasmódios entre as diferentes comunidades do Marari, já que alguns pontos de pescaria são frequentados por pessoas de diferentes comunidades. Contudo, nenhum exemplar adulto coletado com armadilhas CDC nestes ambientes foi encontrado infectado. A transmissão de malária extradomiciliar distante foi relatada na costa do Pacífico da Colômbia, onde o vetor é *An. (Kerteszia) neivai* em áreas de pescaria distantes das moradias [147]. Na ilha de Cotijuba, no Pará, foi enfatizada uma importante exposição dos pescadores à picadas por anofelinos [170].

O grande aglomerado de pessoas num ambiente intradomiciliar pequeno também é considerado um fator importante de risco de malária [171] e a ocorrência de mais de um repasto sanguíneo por fêmea de *An. darlingi* em um ciclo gonotrófico tem sido relatado. Este comportamento de repastos múltiplos intradomiciliares poderia acontecer na área Yanomami, onde observamos comportamento de afugentar os anofelinos após picada durante o sono. A hipótese de que as populações de insetos hematófagos teriam desenvolvido mecanismos para discriminar e escolher os hospedeiros que sejam mais fáceis de serem picados, evitaria as taxas de mortalidade durante o repasto sanguíneo [172]. No contexto, o esperado é que as crianças teriam menos mecanismos de defesa contra as picadas de anofelinos, em qualquer dos ambientes de transmissão descritos na área Yanomami e os repastos múltiplos pelo mesmo anofelino também aumentariam as chances de que um anofelino não infectado se infectasse, aumentando as taxas de infecção na população do vetor. Há registros de vários membros de uma mesma família Yanomami que vivem na mesma habitação no Marari adoecendo de malária quase ao mesmo

tempo. O *An. darlingi* tem sido apontado como capaz de sustentar elevados níveis de transmissão em densidades muito baixas [31]. Na área Yanomami de Marari, encontramos locais com TPHN peridomiciliares por *An. darlingi* de 11 e 10,75, como é o caso de Alapusi e Gasolina. Já na comunidade Castanha, as TPHN de *An. darlingi* foram de somente 0,42, significando que uma pessoa só receberia 153 picadas desta espécie por ano. No entanto, foi no Castanha onde constatamos a maior notificação dos números de casos de malária num mês (76 casos de malária em fevereiro de 2013). Estes dados indicam que as baixas densidades de *An. darlingi* registradas nesta localidade são suficientes para a manutenção de altos níveis da transmissão.

Apesar do marcado grau de antropofilia do *An. darlingi*, alguns estudos têm confirmado a ocorrência desta espécie em regiões desabitadas, onde pode sobreviver em densidades muito baixas a partir de repastos sanguíneos em animais selvagens [31]. Coletamos larvas e adultos de *An. darlingi* em alguns LAR distantes, mas em densidades muito baixas. Apesar de constatar que pequenas populações desta espécie estejam presentes nos LAR no território Yanomami distantes das comunidades, as densidades desta espécie se correlacionam positivamente com a proximidade às habitações indígenas ($P < 0,05$). Por exemplo, os OX localizados próximos às comunidades de Komomassipe (à 228 metros) e Gasolina (à 287 metros) apresentaram as maiores densidades de larvas de *An. darlingi* nos respectivos Polos Base. Não observamos nenhuma correlação com as distâncias das habitações indígenas e a frequência de outras espécies encontradas nas comunidades como o *An. triannulatus* s.l. e *An. oswaldoi* s.l., demonstrando um grau menor de sinantropia. Num estudo em aldeias indígenas Waimiri-Atroari do estado do Amazonas, o *An. darlingi* foi o principal anofelino coletado nas aldeias indígenas, enquanto *An. oswaldoi* foi mais frequente no interior da floresta [129].

Apesar das habitações terem tipologias diferentes nas comunidades dos Polos Base de Toototobi, Parafuri e Marari em geral propiciam o contacto *An. darlingi*-homem no intradomicílio. O tipo de moradia dos indígenas no Brasil foi recentemente, associado ao risco de contrair malária devido aos espaços abertos nas habitações em forma de beirados e aberturas nas paredes e tetos [171]. No caso das habitações Yanomami, as principais rotas de entrada são, aparentemente, os espaços entre as paredes, entre a parede e os tetos e entre

as próprias unidades habitacionais. Nas comunidades do Marari, os *shabonos* têm numerosos espaços entre as unidades familiares que servem de entrada para anofelinos endofágicos, sugerimos que estas comunidades sejam mais expostas ao contato com o *An. darlingi* no interior das habitações. Já as construções das casas no Parafuri, mesmo sendo mais fechadas, ainda observamos importantes aberturas entre os componentes estruturais das habitações.

Outro fator importante que observamos no ambiente intradomiciliar Yanomami é a presença de fumaça. Tem-se especulado que as altas concentrações de fumaça, derivadas das numerosas fogueiras dentro das moradias, pode funcionar como repelente para os anofelinos, diminuindo a entrada deles nos ambientes intradomiciliares. Em alguns lugares, as fogueiras têm sido apontadas como importantes "medidas de controle vetorial" no interior das habitações das aldeias indígenas da Amazônia [171], como no caso dos Xavante [163]. Por outro lado, uma revisão recente do efeito da fumaça no comportamento alimentar dos anofelinos demonstrou que não existem evidências de que o uso de combustível doméstico dentro das casas tenha um efeito significativo de repelência [173]. A fumaça e o calor decorrente das fogueiras também inibem a aceitabilidade do uso de mosquiteiros no interior das habitações indígenas [171]. Da mesma maneira, as partículas de fuligem de ambientes carregados de fumaça poderiam diminuir o efeito dos MILD devido à impregnação desta fuligem nos mosquiteiros aumentando a frequência de lavagens dos mesmos e acelerando a perda de inseticida [173].

No interior das habitações de Toototobi e Marari, que são *shabonos* circulares e centralmente abertos, o acúmulo de fumaça é menor que nas habitações de Parafuri, que não são abertas no centro. Surpreendentemente, Komomassipe foi a aldeia onde coletamos maiores números de *An. darlingi* no interior das habitações de tipologia fechada, tanto com o método de AHP, armadilhas CDC e Aspirador Manual.

Nenhum dos 2.219 *An. oswaldoi s.l.* capturados com o método de AHP foi achado no ambiente intradomiciliar das aldeias indígenas. Em contraste, constatamos a ocorrência de *An. oswaldoi s.l.* no interior de algumas construções livres de fumaça ocupadas pela equipe de saúde. Nossos dados poderiam sugerir maior sensibilidade do *An. oswaldoi s.l.* à fumaça.

Nossos dados mostraram que 62,4% e 53,1% das fêmeas de *An. darlingi* e *An. oswaldoi s.l.*, já haviam parido, respectivamente. No horário de pico de 00-01 horas, a taxa de paridade de *An. darlingi* foi de 80% e *An. oswaldoi s.l.*, entre os horários de 18 h as 22 h, foi de 52,6%. Entretanto, estes dados correspondem a um número pequeno de exemplares dissecados e devem ser considerados com cautela. Na América Central, *An. albimanus* é encontrado principalmente fora das casas e antes das 22:00 h, apresentando um porcentagem médio importante de fêmeas paridas neste período (49%). Algumas publicações sobre *An. darlingi* no Brasil têm apontado diferenças nas taxas de paridade por horários e estações do ano [174, 175]. No entanto, num estudo na Guiana Francesa, Girod et al. [176] não encontraram diferenças entre as taxas de paridade de *An. darlingi* entre estações do ano e ao longo dos diferentes horários noturnos.

Com relação à pluviosidade, Barros et al. [175] detectaram uma relação estatisticamente negativa entre o número de dias de chuva por mês e as taxas de sobrevivência diárias de *An. darlingi*, sugerindo que a pluviosidade aumenta a mortalidade desta espécie. Estes dados sugerem que o pico de densidade decorrente de um pulso de inundação na época seca poderia gerar fêmeas epidemiologicamente mais perigosas em nossas áreas de estudo.

A Taxa de Inoculação Entomológica-TIE tem sido considerada o padrão ouro para medir os níveis de transmissão de malária [177]. Esta taxa é calculada a partir das Taxas de Infecção multiplicada pela média de picadas que uma pessoa recebe por noite (TPHN) e ajustada pelo período de interesse (mês ou ano). No Polo Base de Marari, encontramos taxas de infecção elevadas do *An. darlingi* na comunidade Gasolina (1,52%), Taibrapa (2,02%) e Alapusi (1,63%) quando comparadas a outras localidades da Amazônia, como por exemplo, a área Yanomami de Ocamo na Venezuela (0,764%) [165]. Galardo et al. [145] também encontraram Taxas de Infecção menores para o *An. darlingi*, de 0,62% para *P. falciparum*, 1,071% para *P. vivax* VK210, 0,591% para *P. vivax* VK247 e 1,105% para *P. malariae*. Estes autores enfatizaram que as TPHN influenciam mais na TIE que as Taxas de Infecção. Apesar de na região de Ocamo a Taxa de infecção ter sido menor do que as encontradas em Marari, as TPHN foram maiores. Em Ocamo cada pessoa recebeu uma média de 46,06 picadas de *An. darlingi* por noite, ao passo que no Marari a maior TPHN foi de 10,57 picadas de *An. darlingi* no Alapusi e em Parafuri foi de 64,3

no Komomassipe. É importante ressaltar que a TIE foi calculada utilizando as coletas intradomiciliares em Ocamo e a partir das coletas peri- e extradomiciliares no Marari. Na região Yanomami do Marari, a maior TIEA foi observada no Alapusi com 65,4 picadas infetantes por pessoa por ano, enquanto TIEA-intradomiciliar em Ocamo foi de 128,6 [165].

Além do *An. darlingi*, encontramos outras espécies que podem ter um papel na transmissão de malária nas três áreas Yanomami estudadas, como o *An. oswaldoi s.l.*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. triannulatus s.l.* e *An. intermedius*. Estas espécies já foram incriminadas como vetores da malária em várias regiões. O *An. oswaldoi s.l.*, *An. nuneztovari s.l.* e *An. intermedius* foram encontrados infectados com esporozoítos de *P. falciparum* na Guiana Francesa [87], *An. intermedius*, *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. marajoara*, *An. triannulatus* em três comunidades ribeirinhas do rio Matapí, no estado de Amapá-Brasil [145], *An. oswaldoi s.l.* no Amapá [178] e *An. triannulatus* e *An. oswaldoi s.l.* em Rondônia [27]. Um estudo incriminou *An. oswaldoi s.l.* como o principal vetor da malária no Acre, encontrado com taxas de infecção muito elevadas (até 3,41% para *P. falciparum*) [83].

O único membro do complexo Oswaldoi identificado até o momento no estado do Acre é o *An. oswaldoi A*. Portanto, esta espécie foi confirmada como vetor importante no Acre [108]. O *An. oswaldoi B* também foi relatado na localidade de Ocamo e encontrado infectado no Brasil, Colômbia e Trinidad e Tobago [108]. Espécimes confirmados pelas sequencias COI como *An. oswaldoi B* foram coletados no Toototobi e Marari, e *An. oswaldoi A-like* foi coletado abundantemente no Parafuri e Toototobi. Vale ressaltar que os exemplares que foram identificados como *An. oswaldoi A-like*, poderiam corresponder a uma espécie ainda não descrita. Embora não tenhamos encontrado nenhum *An. oswaldoi s.l.* infectado por PET-PCR, sugerimos que os membros do complexo Oswaldoi possam ter papel na transmissão da malária na área Yanomami do Brasil, onde exibem alta densidade. *An. oswaldoi s.l.* também foi incriminado na transmissão da malária na Venezuela ocidental e foi sugerido que sua presença em altas densidades também poderia estar associada à transmissão da malária na área indígena do Baixo rio Caura [179].

Alguns PET-PCR para detecção de esporozoítos deram valores CT iguais ou inferiores a 40,5 para quatro espécimes de *An. intermedius* e um de

An. nuneztovari s.l., mas não foi possível confirmar qual espécie de plasmódio estava infectando estas espécies. Foram considerados positivos somente para gênero *Plasmodium sp.* Também baseados em dados da literatura que incriminam estas espécies como vetores de malária e sua relativa abundância na área Yanomami do Brasil, sugerimos que conjuntamente com o *An. oswaldoi s.l.*, possam ter uma importância relativa ou secundária na transmissão da malária. Num estudo entomológico de curta duração durante um surto de *P. falciparum* em comunidades remotas Yanomami da Venezuela em 1994, *An. intermedius* foi particularmente abundante, acompanhado, no entanto, por coletas menores de *An. oswaldoi s.l.* e *An. darlingi* [180].

Um estudo recente na Mata Atlântica do Brasil, onde o *An. cruzii* é a principal espécie vetora, apontou que um aumento da biodiversidade pode diminuir a transmissão da malária, principalmente por dois mecanismos: a presença de um maior número de espécies animais de sangue quente que podem atuar de "beco-sem-saída" para os plasmódios e uma competição difusa com outras espécies de mosquitos, que leva a um aumento do comportamento defensivo dos hospedeiros [181]. Em situações onde o equilíbrio ambiental sofre importantes mudanças, alguns vetores podem alterar seu comportamento para se adaptar às novas condições ambientais, passando principalmente de comportamentos zoofílicos a antropofílicos [182]. Nas áreas próximas às comunidades Yanomami, encontramos o fenômeno de "floresta vazia". A intensa caça feita pelos Yanomami tem eliminado muitas das fontes alternativas de sangue próximo às comunidades. Nossa hipótese é que, nesta situação, os anofelinos de caráter mais zoofílico, como *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius*, veriam-se forçados a centrar os seus esforços de hematofagia nas pessoas. Um exemplo vem das áreas costeiras da Guiana. Devido ao desenvolvimento agrícola da região, houve uma diminuição da densidade de gado, do qual as populações locais de *An. aquasalis* estavam se alimentando quase exclusivamente até aquele momento. Ao diminuir de forma dramática essa fonte sanguínea, as populações zoofílicas de *An. aquasalis* mudaram a sua atenção para o homem, reativando a transmissão local de *P. vivax* na área [183].

A sazonalidade da malária em áreas não alteradas da Amazônia poderá variar de forma considerável, dependendo se as áreas endêmicas estão localizadas próximas de rios de baixa ou alta ordem e, portanto, sob influência

dos Pulsos de Inundação (PI) e da dinâmica dos criadouros associados às planícies de inundação dos rios. Estas características hidro-geográficas determinaram em grande medida quais espécies de anofelinos neotropicais ocorreram e em quais densidades. O presente estudo descreve a dinâmica espaço-temporal dos criadouros e espécies de anofelinos associadas a rios de baixa ordem (1^a a 5^a ordem), os quais estão sujeitos a PI curtos, polimodais e, geralmente, de caráter imprevisível. Depois de um PI, os criadouros associados ao rio se alagaram, aumentando o total da Área Efetiva de Criação (AEC) disponível muito rapidamente e propiciando posteriores picos de anofelinos adultos e, potencialmente, de malária. Os PIs dos rios de baixa ordem dependem, em grande medida, da intensidade das chuvas locais [160]. Um grande número das comunidades indígenas da Amazônia, como o caso dos Yanomami, encontraram-se localizadas em áreas de floresta preservada e próximas a rios Amazônicos de baixa ordem. Outro fator que pode ter uma influência importante na sazonalidade das densidades populacionais dos anofelinos é a ausência da população indígena nas aldeias por um período de tempo longo. Isto poderia levar a uma falta de fontes alimentar para os anofelinos locais e, portanto, uma menor taxa de recuperação das populações de mosquitos.

Concomitantemente às capturas de adultos, coletamos larvas de várias espécies de anofelinos, como *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. triannulatus s.l.*, *An. mattogrossensis*, *An. costai-like*, *An. intermedius/guarao-like*, *An. squamifemur*, *An. thomasi*, *An. kompi* e *Chagasia bonnae*, sendo as densidades muito variáveis entre as diferentes comunidades. Em Toototobi o *An. oswaldoi s.l.* foi a espécie mais abundante (representando 48,7% das larvas), enquanto no Parafuri foi a terceira espécie mais coletada (4,4%), depois do *An. darlingi* (79,9%) e do *An. triannulatus s.l.* (9,3%). Houve algumas exceções, como por exemplo, o *An. mattogrossensis* (43%) que foi a espécie da qual coletamos mais larvas no Apiahik - Toototobi e o *An. oswaldoi s.l.* (43,2%) a mais coletada no Makabey - Parafuri.

As diferenças na ocorrência e densidades da fauna anofélica em cada localidade foram determinadas pela disponibilidade dos diferentes tipos de criadouros. No Marari, Parafuri e Toototobi houve uma prevalência de 41,5%, 26,4% e 16,7% criadouros tipo LAR, respectivamente. As espécies associadas principalmente aos LAR como *An. darlingi* e *An. nuneztovari s.l.* predominaram

no Marari. Em algumas comunidades do Marari encontramos altas prevalências de LAR, como a comunidade do Castanha (cinco OX) e do Alapusi (três OX e quatro NOX). No caso do Komomassipe, a presença de três LAR (dois OX e um NOX) foi determinante na manutenção de uma importante população local de *An. darlingi*. Pelo contrário, criadouros tipo FANAR, identificados como importantes amplificadores das populações de *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius*, tiveram uma predominância decrescente entre o Toototobi, Parafuri e Marari, com uma prevalência de 33,4%, 20,8% e 11,3% respectivamente.

Os lagos tropicais apresentam flutuações de volumes de água e tamanhos ao longo das diferentes estações [184]. Os OX na área submontana de Parafuri sofreram em geral uma retração sazonal do total de AEC menor que no caso dos OX de Toototobi e Marari. No Toototobi as variações no total de AEC disponível entre a época chuvosa e seca foram muito mais acentuados. Por exemplo, quatro dos OX próximos à comunidade do Apiahik passaram a apresentar 146, 231, 24 e 434 m² de AEC na segunda metade da época seca para 1.282, 593, 360 e 884 m² de AEC na época chuvosa, respectivamente. De todos os modos, espécies como os anofelinos, que apresentam altas taxas reprodutivas (que seguem estratégias r) terão mais sucesso na adaptação às mudanças nos criadouros devidas aos PI.

Na literatura têm sido apresentadas várias classificações de criadouros larvais para diferentes espécies de mosquitos [185]. No entanto, poucos exemplos de classificações abrangentes têm sido propostas para anofelinos neotropicais. Na sua revisão da bionomia e distribuição dos principais vetores das Américas, Sinka et al. [49] apresentaram uma lista completa dos principais criadouros de anofelinos, separados em grandes e pequenos e se eram naturais ou decorrentes da atividade humana. Lagoas, lagos, pântanos e rios com margens com pouca correnteza foram considerados os principais tipos de criadouro naturais grandes. Os SFS e MFS, fontes de infiltração, poças e pequenos buracos no chão foram apresentados como os tipos mais comuns de criadouros naturais pequenos.

Com a nova classificação de criadouros de anofelinos que propusemos nesta tese, tentamos simplificar as diferentes denominações de criadouros naturais associados a rios de baixa ordem da Amazônia. As principais características que utilizamos para nossa classificação foram a associação dos

criadouros com os Pulsos de Inundação, a temporalidade e os graus de exposição ao sol. Encontramos que estes parâmetros eram os mais indicados para explicar a ocorrência de focos das espécies de anofelinos e caracterizar sua dispersão. Parâmetros geomorfológicos e hidrológicos foram também fundamentos de uma classificação recente de criadouros nas proximidades de um rio de baixa ordem na Tanzânia [186].

Introduzimos o conceito de Lagos Associados com os Rios (LAR) para os estudos ecológicos de malária, os quais incluem os dois tipos de criadouro (OX e NOX) que podem ter uma maior influência na transmissão da malária em áreas não alteradas da Amazônia, principalmente nessas áreas indígenas localizadas em áreas de rios de baixa ordem. Os OX são o tipo de lago mais frequentemente encontrado no território brasileiro, especialmente nas áreas inundáveis do Pantanal e da Amazônia, onde uma paisagem plana e numerosos meandros dos rios favorecerão a formação de muitos destes tipo de lagos [158]. Também foram os tipos de LAR mais frequentes nos três Polos Base Yanomami, representando 68,8% dos LAR mapeados na área.

O raio de voo das diferentes espécies de anofelinos pode variar, embora tenha sido tradicionalmente considerado que a máxima distância que podem voar é até 2 km. No entanto, alguns autores têm demonstrado que a maioria dos voos possam ocorrer em distâncias mais curtas deste raio de 0-2 km [187]. Num experimento de Marcação-Soltura-Recaptura, Charlwood e Alecrim [188] reportaram que a maioria das recapturas ocorreram até 1 km de distância, embora dois *An. darlingi* tenham sido coletados a 7,2 km do ponto de liberação. Num outro estudo Ache et al. [189] confirmou que a taxa de recaptura de *An. darlingi* foi maior aos 0 metros (29%; 124/ 428) e foi diminuindo até 11,6% (37/318) e 5,8% (21/361) nos pontos de recaptura a 400 metros e 800 metros respectivamente. De acordo com estes relatos e nossas observações na área Yanomami, determinamos o raio de 1 km a partir das habitações indígenas para amostrar criadouros epidemiologicamente relevantes com potencial influência na transmissão da malária nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar próximos de comunidades. No entanto, criadouros localizados levemente acima dos 1.000 metros poderiam ter uma influência residual nos ambientes antes citados e, em alguns casos particulares, também foram amostrados.

Num estudo nas Ilhas Salomão, Belkin et al. (1954) introduziram o conceito de Superfície Efetiva de Criação ou Ponto Efetivo de Criação para definir essas áreas dentro de um criadouro adequadas à proliferação de anofelinos. Áreas de águas abertas, paradas, profundas e corpos de água com marcada correnteza foram consideradas Áreas Não-Efetivas de Criação. Posteriormente em outro estudo, a Área Efetiva de Criação em áreas de pastagem irrigadas foi estratificada em diferentes microambientes e o número de conchadas por cada subtipo de micronicho foi proporcional à sua contribuição à área total do criadouro [185]. Para nosso estudo, utilizamos o termo Área Efetiva de Criação (AEC) para definir a área de um criadouro que pode ser adequada para a proliferação das formas imaturas de anofelinos. Refinamos também o conceito de AEC, medindo de forma precisa esse parâmetro com um sistema laser de alta precisão e estratificando as coletas por subtipo de AEC dentro dos principais criadouros, os LAR.

Estudos de transmissão de doenças e de ecologia dos vetores da malária têm utilizado de forma crescente ferramentas como o sensoriamento remoto (SR) ou os Sistemas de Informação Geográfica (SIG), facilitando, em grande medida, a capacidade de análise das relações entre os vetores e as doenças no tempo e espaço [155]. No entanto, na paisagem aparentemente homogênea que encontramos nas áreas não impactadas da floresta Amazônica, o uso do Sensoriamento Remoto pode ser particularmente difícil, especialmente em áreas associadas a rios de baixa ordem com pouca largura. Por exemplo, não existem imagens de satélites de alta resolução (ex: imagens IKONOS) para a maior parte do território Yanomami do Brasil, e muitas FAAR e LAR pequenos e todos os criadouros que se localizam embaixo da cobertura vegetal densa não serão detectados pelas imagens de satélite livres disponíveis (ex: imagens LANDSAT). A medida *in-loco* destes corpos de água com a nova abordagem utilizando o medidor laser pode se caracterizar como a única maneira de quantificar a dinâmica da AEC dos diferentes criadouros em áreas remotas da Amazônia.

Rios mais meândricos tenderão a formar mais OX, e portanto, áreas com estas características poderão sustentar populações locais de *An. darlingi*, formando paisagens mais propícias para a transmissão local da malária. Coletamos 1.178 (84,5%) larvas de *An. darlingi* em OX, 178 (12,7) em NOX e 1.356 (96,9%) considerando os dois tipos de LAR juntos no Toototobi e

Parafuri. Os LAR, e especialmente os OX, foram os principais criadouros desta espécie nas áreas de estudo. Cabe destacar que os OX foram especialmente abundantes no Polo Base de Marari, contendo 51,6% do total de OX mapeados nos três Polos Base. Alguns autores têm ressaltado a dificuldade de coletar larvas de *An. darlingi*, cujos focos são considerados difíceis de serem encontrados [190]. Em quase todas as comunidades onde coletamos *An. darlingi* adultos, foram identificados LAR positivos para esta espécie. Na localidade Yanomami de Ocamo, na Venezuela, dois lagos localizados a uns 400 metros das moradias foram apontados como os principais criadouros próximos [165].

Alguns estudos de ecologia de anofelinos apresentam informações sobre os PI em rios de baixa ordem. No rio Miranda, rio de baixa ordem do Pantanal, foram registradas diferenças (3,5 metros) importantes em alguns meses entre o nível máximo dos rios e os mais baixos [131]. Outro estudo em um rio de baixa ordem em Tanzânia, foi constatado que as cotas aumentaram rapidamente em resposta às chuvas locais. Uma chuva de 70 mm em 24 horas provocou o aumento do rio de 0 cm até 115 cm, voltando aos níveis normais em 4 horas. Este PI levou ao alagamento das planícies de inundação rio abaixo. Durante a época de chuvas este rio alagou as planícies de inundação de forma mais constante [186]. Constatamos características semelhantes dos PI em nossas áreas de estudo. Durante o dia 14 de novembro de 2014 houve uma chuva de grande intensidade na área do Polo Base Marari, gerando um PI de alta intensidade e com uma duração de 24-48 horas, afetando todos os rios da região do Marari (no sistema fluvial 1; rio Marari e no sistema fluvial 2; rios de primeira ordem Xirinita, Catanal e Taibrapa). No caso do rio de primeira ordem Xirinita, as cotas mensuradas foram: 30 cm no dia 14 de novembro, 98 cm no dia 15 e 25 cm no dia 16 de novembro. No dia 15 estimamos o rio Marari tinha aumentado aproximadamente 2 metros em relação aos níveis da época seca. O PI de novembro de 2013 no rio Inajá - Parafuri também teve uma duração curta (entre 24 e 48 horas) e estimamos numa flutuação das cotas ao redor de 1 metro, suficiente para alimentar bastantes OX locais. Durante a época de chuvas, foi constatado um maior nível basal das cotas dos rios por períodos mais longos, a exceção dos rios de primeira ordem do Marari, que depois dos mais frequentes PI da época seca, sempre voltaram rapidamente a um padrão de cotas da época seca. Este maior nível basal das cotas da época

de chuvas foi beneficiado, tanto pela maior frequência e intensidade dos PI, como pelo efeito de represamento (*backflooding*) nos tributários menores pelos rios maiores aos quais estão conectados. Encontramos indícios de uma ocorrência diferencial de PI nos dois sistemas de rios do Marari. O rio Marari recebe águas de áreas de drenagem montanhosas muito mais extensa que a dos rios de primeira ordem Xirinita, Catalan e Taibrapa, os quais, estão somente sob a influência das chuvas que ocorrem nas serras no entorno da sede do Polo Base (aproximadamente 7 km de distância da sede do Polo Base até o pico Marari).

O *An. darlingi* tem sido reportado em uma grande variedade de criadouros naturais e artificiais, o que indica sua grande adaptabilidade a diferentes ambientes ecológicos [31]. Algumas publicações têm apontado que os microambientes nos canais dos rios são as principais fontes de produção de *An. darlingi*. Rejmankova et al. [190] ressaltaram a ocorrência de larvas de *An. darlingi* em um tipo muito específico de *microdam* ao longo das margens do rio Sibun em Belize. Aglomerados de bambu suspensos, combinados com raízes, criaram micronichos onde o fluxo da água era quase inexistente, onde detritos flutuantes se acumulavam. Este rio de baixa ordem em Belize tem características parecidas ao rio Inajá do Parafuri, com largura aproximada entre 20 e 40 metros no segmento de estudo e sujeito ao efeito de PI de curta duração, polimodais e imprevisíveis. Os autores documentaram que, depois de um PI repentino e intenso no rio Sibun, algumas larvas L3 e L4 de *An. albimanus* e *An. darlingi* foram coletadas em tapetes de detritos em uma lagoa anexa ao rio. Na campanha de 2014 no Marari, todos os OX da região foram amostrados em uma situação de pós-PI imediata. No rio Xirinita, coletamos 23 larvas num OX, das quais, uma era L1, nove L2 (1 *An. darlingi*), 10 L3 e três L4. Nossos dados, junto com as observações de Rejmankova et al. [190], confirmaram a presença de larvas de estágios tardios em situações pós - PI em LAR. Já no caso da comunidade do Gasolina, foram coletadas 51 larvas no OX principal, sendo que a maioria delas (48) foram encontradas em AEC de detritos flutuantes expostos ao sol. Do total, 22 larvas foram de *An. darlingi*. Neste caso, a maioria de larvas eram de estágios jovens (L1 e L2). Na maioria dos LAR da comunidade de Taibrapa e Alapusi, foram coletadas larvas com diferentes estágios, jovens e tardios, e em alguns LAR foram coletadas larvas de *An. darlingi*. Esses resultados indicam que os PI extremos podem nem

sempre ser eventos tão catastróficos para as larvas que se localizam em LAR (especialmente OX) com conexão média.

Ao contrário, as populações de anofelinos nos rios de baixa ordem e SFS sofreram um efeito de lavagem maior devido ao PI. Antes do PI de novembro de 2014, um SFS próximo da pista de pouso da sede do Polo Base Marari, foi o único criadouro onde conseguimos coletar em situação de pre e pós - PI. Antes do PI coletamos 28 larvas numa área com água represada do SFS, das quais, nove foram *An. darlingi*. Em situação de post-PI, realizamos algumas amostragens no mesmo local, sem coletar nenhuma larva. Neste tipo de criadouro poderia se dizer que aconteceu um restabelecimento das condições iniciais. Nas amostragens em rios de primeira ordem logo depois do PI, não encontramos larvas de *An. darlingi*. No entanto, encontramos oito larvas L1 (não de *An. darlingi*) num pequeno espaço lateral do rio Marari com vegetação acumulada e água parada. No estudo no rio Sibun, não foram coletadas larvas nos criadouros do canal do rio imediatamente depois do PI. De forma parecida, Barros et al. [191] também reportaram coletas em vários *microdams* ao longo do rio Azul no estado de Roraima. Neste caso, os *microdams* foram criados por troncos caídos que obstruíam o fluxo de água e permitiram a acumulação de detritos flutuantes. Estes autores, enfatizaram que estes *microdams* eram o principal tipo de criadouro na área de estudo e, possivelmente, ao longo das áreas de malária de fronteira da região norte Amazônica. Os autores reportaram que não foram encontrados outros criadouros potenciais, como pântanos, na área, que pudessem sustentar a proliferação e explicar a ocorrência local de *An. darlingi*. O rio Azul tampouco produziu larvas durante a época das chuvas.

Deane et al. [93] também apontou a criadouros grandes como lagos, lagoas, represas e poças fundas nos leitos de MFS como criadouros preferenciais de *An. darlingi*. Rachou [192] também enfatizou as grandes coleções hídricas como represas, lagoas e remansos de rios como os criadouros preferenciais de *An. darlingi*. Outros estudos têm encontrado criadouros tipo LAR como os principais habitat para o *An. darlingi*. Mais recentemente, no estado de Bolívar da Venezuela, as lagoas naturais e corpos artificiais gerados a partir da atividade de garimpo foram apontados como os dois tipos de criadouros epidemiologicamente mais importantes, principalmente devido à produção de *An. darlingi* e *An. marajoara* [193].

Nas áreas de nosso estudo, a preferência pela exposição ao sol é um parâmetro crucial que influenciará em enorme medida a ocorrência de larvas de diferentes espécies de anofelinos, como *An. darlingi*. Yasuoka et al. [194] apresentaram um índice de preferência ao sol para muitos vetores de malária no mundo. Certos subtipos de AEC somente proliferaram em áreas com exposição ao sol, como é o caso das macrófitas submersas e algas filamentosas verdes. Porém, *An. darlingi* foi também classificado como uma espécie com preferência por ambientes sombreados. Em uma revisão recente, só um estudo apontou a preferências do *An. darlingi* por lugares expostos ao sol [49]. Ao longo dos *microdams* do rio Sibun de Belize, o *An. darlingi* foi associado a ambientes sombreados ou parcialmente sombreados [190]. Numa região de transição savana-floresta aluvial de Roraima, as larvas de *An. darlingi* foram coletadas em margens de SFS/MFS e poças de chuvas sombreadas no interior da floresta [174]. O *An. darlingi* tem sido definido também como uma espécie de floresta com preferências por criadouros grandes, de água límpida e sombreados [111].

Em nosso estudo, porém, encontramos preferência clara do *An. darlingi* por criadouros expostos ao sol ($P < 0,05$). Também foram coletadas poucas larvas em ambientes parcialmente sombreados e totalmente sombreados, mas não houve diferenças significativas entre estas duas categorias ($P > 0,05$). Por isso, classificaríamos o *An. darlingi* como uma espécie que prefere os ambientes ensolarados. Além do grau de exposição ao sol dos criadouros, as populações locais de *An. darlingi* proliferaram onde coincidem uma série de determinantes ecológicos, tais como a proximidade de uma comunidade Yanomami (número de pessoas e, portanto, a quantidade de fontes de sangue disponíveis) e características internas dos próprios LAR, como o desenvolvimento de aglomerados de macrófitas submersas, algas filamentosas verdes e detritos flutuantes parcial ou bem expostos ao sol.

Outros autores corroboram nossos resultados. Galvão et al. [91] apontaram que a exposição ao sol em um criadouro era um dos principais fatores para a ocorrência de *An. darlingi*. Também observaram que algumas áreas previamente sombreadas poderiam se converter em excelentes áreas produtoras de larvas de *An. darlingi* após serem expostas ao sol por desmatamento. As áreas anexas sombreadas a estes novos pontos expostos ao sol, continuaram negativas para esta espécie. Nós observamos este

fenômeno em RP recentemente expostas ao sol na comunidade de Komomassipe, as quais, se tornaram excelentes produtoras de larvas de *An. darlingi*, enquanto em RP sombreadas não foram coletadas larvas de *An. darlingi*. Cabe destacar que o AEC total desta área de RP (256 m²) foi menor que o AEC associado aos LAR (1.101 m²) no Komomassipe. Na área de Marari, também observamos uma FANAR que foi completamente exposta ao sol numa área de cultivo de banana próxima a aldeia. Durante as coletas no final da época de chuvas de agosto de 2013, foram coletadas numerosas larvas de *An. darlingi* neste tipo criadouro temporário que originariamente estava totalmente sombreado. Embora Deane et al. [93] tenham relatado o encontro de algumas larvas de *An. darlingi* coletadas em áreas de sombra, esses autores também apontaram esta espécie de vetor com preferências claras por criadouros totalmente expostos ao sol, e preferencialmente em grandes criadouros do tipo lago. Finalmente, Vittor et al. [101] viram que criadouros com <70% da sua superfície cobertos por sombra tiveram quase o dobro de chance de apresentar larvas de *An. darlingi* que criadouros mais sombreados na região da Amazônia no Peru.

A dinâmica das populações de anofelinos dependerá da disponibilidade de locais propícios para sua proliferação e fontes sanguíneas preferenciais. Trabalhos clássicos já apontaram a ampliação da área de ocorrência de *An. darlingi* na época chuvosa, devido a um incremento da disponibilidade de criadouros pelas chuvas [195]. Galvão et al. [91] observaram que larvas de *An. darlingi* proliferavam no final da época seca somente em uma grande lagoa, em um açude, em braços mortos de um igarapé e na represa da cidade, próximo a Porto Velho. Com a chegada das chuvas, as larvas de *An. darlingi* se dispersavam, a partir desses primeiros criadouros, para a maioria das áreas novas inundadas. Este tipo de observações foram reforçadas por Deane et al. [93] que indicaram que na época seca, esta espécie normalmente se retrai para criadouros maiores às margens da floresta, como MFS permanentes, poças fundas em MFS, represas, lagos e lagoas. Já na época de chuvas, seu raio de abrangência aumentaria, explorando criadouros menores e temporários. Os autores indicaram que, em várias localidades, *An. darlingi* desaparece na época seca, já que não existem criadouros produtivos dentro do raio de vôo do *An. darlingi*. Locais próximos a criadouros permanentes para *An. darlingi*, teriam atividade hematofágica por esse vetor o ano inteiro, mas com

densidades flutuantes. O conceito de Foco de Refugio Estival (FRE) para anofelinos neotropicais, como o *An. darlingi*, já foi utilizado por estes malariologistas brasileiros nos anos de 1940 [91, 93]. Tadei et al. [196] também descreveram a expansão e contração do raio de abrangência local de *An. darlingi*, em função da diferente disponibilidade de criadouros segundo a estação do ano na região urbana e periurbana de Ariquemes. Nesta área, um igarapé foi apontado como o principal foco de proliferação de *An. darlingi*. Foi relatado que, na época de chuva, os sítios de reprodução dos anofelinos se estendiam desde os criadouros permanentes como lagos e lagoas junto às margens dos rios, para criadouros temporários gerados no meio da mata. A expansão dos criadouros a partir do rio Branco no estado de Roraima, foi também documentada [111].

A Amazônia tem uma complexa malha interconectada de rios de diferentes ordens, onde o *An. darlingi* conseguiu se expandir através de diferentes mecanismos. Para a compreensão da sazonalidade de anofelinos amazônicos, e especialmente de espécies como *An. darlingi* fortemente associadas aos rios e suas planícies de inundação, é fundamental a estratificação das áreas associadas a rios de baixa e alta ordem. Não encontramos relatos na literatura que clarifiquem a partir de quantos metros de largura um rio na Amazônia poderia se converter numa barreira biogeográfica para a dispersão de *An. darlingi* e outros anofelinos Amazônicos. Tem-se apontado algumas barreiras biogeográficas na América do Sul, como o rio Amazonas-Solimões e as montanhas dos Andes ao oeste do Brasil, que podem ter influenciado na diversificação evolutiva do *An. darlingi* [107].

Acreditamos que em regiões associadas aos rios de baixa ordem, existirão maiores irregularidades nas densidades de anofelinos que comparado com áreas onde os padrões de alagamento sejam mais estáveis e previsíveis. As características dos rios, como a largura e características das margens, foram apontadas como fatores importantes para explicar a diferente ocorrência de *An. darlingi* nos diferentes sistemas fluviais da Amazônia de Suriname. Rios estreitos e com margens abruptas que impedem o alagamento da floresta circundante foram apontados como lugares pouco propícios para a proliferação do *An. darlingi* e manutenção da malária, enquanto rios maiores que alagam facilmente a floresta circundante seriam pontos adequados para a ocorrência desta espécie [99]. As RP enchidas pela chuva e as áreas de floresta alagada

resultantes dos PI foram os principais criadouros para *An. darlingi* na época das chuvas. No entanto, os autores apontaram que, durante a época seca, os rios descem de forma pronunciada, disponibilizando poças parcialmente expostas ao sol, colonizadas pelo *An. darlingi* [99]. *An. darlingi* também proliferou nas margens dos rios com baixo nível associados a tapetes de plantas aquáticas bem desenvolvidos [97]. Gil et al. [197] sugeriram que nos rios grandes do estado de Rondônia, como o Maderia e Machado, onde acontece um incremento progressivo dos níveis dos rios, se formariam extensos alagamentos estáveis (ou igapós com correnteza muito diminuída) dentro da floresta, constituindo-se em excelentes criadouros para *An. darlingi* durante a época de chuvas. Já em áreas de tributários menores não se daria a formação de igapós estáveis devido às flutuações dos volumes de água dos rios causada pelas chuvas fortes durante a época chuvosa. Segundo estes autores, os criadouros se originariam depois da época de chuvas, quando estes rios menores recobriam as cotas normais e amplas áreas estáveis de água seriam formadas ao longo das margens dos rios.

O modelo de Unidades de Sanfona (UdS) proposto neste trabalho está baseado nas observações anteriores descritas acima. No entanto, foi dada ênfase nas particularidades da dinâmica dos rios de baixa ordem (com seus PI característicos), incluindo-se o papel que os tipos de criadouros naturais aqui descritos terão na manutenção (funcionando como FRE) e na ampliação da distribuição das diferentes espécies das anofelinos. Além disso, também incorporamos as medidas do AEC no modelo de UdS.

Encontramos duas variantes do Modelo de Sanfona para explicar a dispersão do *An. darlingi*. Uma das variantes é a ocorrência e dispersão desta espécie durante a época seca pelos microhabitats dentro dos canais dos rios em períodos entre PI. Estes seriam os criadouros temporários da época seca, já que seriam eliminados em períodos de PI frequentes (chuvas). Os principais criadouros para esta espécie na época seca e chuvosa continuariam sendo os LAR. Na época de chuvas aconteceria uma colonização de criadouros temporários gerados ou pelo efeito dos PI (FAAR) ou das chuvas (FANAR e RP parcial ou expostas ao sol) a partir dos LAR. Este último modelo explica a distribuição de *An. darlingi* nessas regiões onde os canais dos rios não têm as características adequadas para sustentar populações deste vetor e, não obstante, o *An. darlingi* ocorre e coloniza a maioria de LAR.

Os dois modelos se complementaríamos para explicar a distribuição real desta espécie ao longo da floresta Amazônica em áreas de rios da baixa ordem. O rio Toototobi e os criadouros associados aos PI não foram propícios à proliferação desta espécie. Somente foram coletados dois adultos na época chuvosa e duas larvas na primeira metade da época seca em um LAR. Não encontramos microhabitats positivos no rio Toototobi, o qual foi, na verdade, negativo para qualquer espécie de anofelino. Coletamos escassos anofelinos adultos na segunda metade da época seca em Toototobi (até algumas comunidades na beira do rio Toototobi foram negativas), fato que reforça a ideia de que o rio desta região não é lugar de proliferação dos anofelinos. Devido aos intensos meses de seca e sem PI neste período, os LAR entraram numa fase de secagem muito pronunciada, apresentando águas extremadamente turvas. A falta de PI de época seca poderia ter levado ao quase-colapso natural durante estes dois anos das populações desta espécie em Toototobi. A dinâmica das populações de *An. darlingi* neste Polo Base poderiam ser diferente sob o efeito de PI adicionais de época seca (especialmente durante a primeira metade), evitando assim que os LAR associados chegassem a níveis tão secos e de água extremadamente turva como os encontrados nos dois anos de coletas.

No Polo Base de Parafuri, a maioria dos LAR amostrados foram positivos para *An. darlingi*, mas não encontramos larvas deste vetor nos rios Parima ou Inajá. Nas comunidades de Apiahik e Xaruna, foram coletados dois exemplares de *An. darlingi* no pico da estação chuvosa. Não conseguimos identificar nenhum criadouro positivo para esta espécie nos dois anos de coleta. Sugerimos que estes foram exemplares pertencentes ao limite de expansão de algum LAR distante (a mais de 1 km) através de criadouros temporários (FAAR, FANAR e RP), atingindo somente estas comunidades no período de expansão máxima da AEC. Não coletamos exemplares adultos de *An. darlingi* em nenhum outro período do ano.

A capacidade de produção de *An. darlingi* nos LAR vai depender de vários fatores: 1) a densidade de formas adultas presentes no ambiente no momento de ocorrer o PI e que, portanto, determinarão o potencial de recolonizar os LAR. 2) a dinâmica interna dos LAR (características das fases de enchente, intermediária e secagem), 3) a frequência dos vários PI. Na época de chuvas os PI seriam mais consecutivos e as fases intermediárias

(produtivas) dos LAR mais curtas, e portanto, com picos de densidades de anofelinos mais curtos. Já na época seca os pulsos de inundação seriam mais espalhados e permitiria a ocorrência completa do processo de alagamento, Fase Intermediária e de Secagem.

Constatamos que durante a Fase Intermediária dos LAR foi quando aconteceram os picos de densidades do *An. darlingi* (caso do Komomassipe e comunidades do Marari). Na comunidade de Komomassipe identificamos a dinâmica dos tapetes de *Mayaca sp.* no OX principal, como fator determinante na dinâmica das populações de *An. darlingi* neste local, enquanto os detritos flutuantes e áreas de vegetação emergente expostas ao sol foram os subtipos de AEC com maior ocorrência de *An. darlingi* na fase intermediária dos OX no Marari.

Cada LAR seguiu uma dinâmica diferente associada aos PI, tendo o grau de conectividade LAR-Rio uma importância fundamental nestes processos. Estes graus de conectividade hidrológica propiciaram a proliferação de diferentes tipos de macrófitas e influenciaram nas características da água [159], convertendo alguns LAR em melhores criadouros para espécies como *An. darlingi*, *An. triannulatus s.l.* e *An. oswaldoi s.l.* Por exemplo, nos OX isolados dos rios (ex: OX isolados em Mahaxipoha, Makabey, Warareu e Taibrapa 2) e que, portanto, só PI extremos os conectariam com os rios, encontramos populações muito mais variadas e abundantes de macrófitas submersas. Já a abundância de macrófitas foi decrescente entre os OX de conectividade média e esses LAR sempre conectados com o rio, onde quase não encontramos proliferação de macrófitas submersas.

Os LAR do Marari têm uma dinâmica diferenciada quando comparadas com os LAR da região submontana do Parafuri. Pelo fato de serem LAR associados a rios menos profundos, os LAR (principalmente os OX) perdem volume com mais rapidez e entram mais cedo na fase de secagem. O resultado é que os potenciais picos de densidade associados aos PI de época seca no Marari serão mais curtos que nos OX associados ao rio Inajá do Parafuri. Por exemplo, em novembro de 2014 constatamos um PI extremo associado a chuvas torrenciais durante esta primeira parte da época seca no Marari. Este PI aconteceu no início de período de coletas e pudemos constatar que todos os criadouros associados aos rios da região foram alagados (todos os LAR e FAAR). Já na próxima entrada (janeiro de 2015), os OX encontravam-se de

novo numa fase de secagem muito adiantada. Os OX do Parafuri apresentaram fases intermediárias de maior duração (mais de dois meses).

Acreditamos que haja a ocorrência de uma sucessão ecológica de diferentes espécies neotropicais dentro dos LAR. Coletamos muitas larvas L4 e pupas durante a fase de secagem de um OX no Taibrapa 2. Embora a maioria de exemplares de larvas ainda estejam por identificar, os exemplares que fizemos eclodir foram *An. nuneztovari s.l.* Estes dados, conjuntamente com as densidades extremas de adultos de *An. nuneztovari s.l.* coletadas no mesmo período, sugerem que neste OX, aconteceu um pico de densidades de *An. nuneztovari s.l.* Estes dados concordam com anteriores observações de que esta espécie prefere águas doces e turvas [7]. Neste OX, poderia ter acontecido uma sucessão ecológica de espécies, com maiores densidades de *An. darlingi* durante a fase intermediária (com águas mais límpidas) e um posterior pico de densidade de *An. nuneztovari s.l.* na fase de secagem e com águas muito mais turvas. Durante a fase intermediária, em agosto de 2013, coletamos duas larvas de *An. darlingi* neste OX, enquanto durante a fase de secagem, não coletamos nenhuma larva desta espécie. Existem outros exemplos da sucessão ecológica de espécies segundo a variação das condições ambientais num mesmo criadouro, como a sucessão de diferentes espécies de anofelinos nas áreas de cultivo de arroz segundo o grau de desenvolvimento das plantas. Espécies com preferência por habitats expostos ao sol como *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis* (África), *An. albimanus* (América), *An. fluviatilis* e *An. culicifacies* (Ásia) são considerados pioneiros na colonização dos campos de cultivo de arroz, enquanto espécies que preferem criadouros com maior grau de sombreamento como o *An. funestus* (África), *An. punctimacula* (América) e *An. umbrosus*, *An. hyrcanus* e *An. leucosphyrus* (Ásia) serão mais abundantes durante as fases em que a vegetação dos cultivos está mais desenvolvida e fornecem mais sombra sobre a superfície da água [198].

O efeito dos PI é fundamental no fluxo de oxigênio e nutrientes entre os rios e as planícies de inundação. Quando o fluxo de água cessa entre os rios e os corpos de água fixos das planícies de inundação, acontece um processo de empobrecimento gradual de oxigênio dissolvido, o qual, afetará em diferentes graus os organismos aquáticos [199]. Larvas de *An. oswaldoi s.l.* foram associadas significativamente com concentrações menores de oxigênio no

Equador [200]. A temperatura da água é outro parâmetro importante que influenciará no desenvolvimento das larvas de anofelinos [201]. Encontramos maiores temperaturas e concentrações de oxigênio em subtipos de AEC bem expostos ao sol (tapetes de *Mayaca sp.*) nos OX da região do Parafuri. Os OX do Parafuri foram os únicos com ocorrência de *Mayaca sp.*

O *An. triannulatus* prefere criadouros parcialmente ou bem expostos ao sol, normalmente associados à vegetação emergente, submersa ou detritos flutuantes. Este anofelino tem sido coletado em corpos de água como pântanos, lagos e lagoas permanentes, valas e margens de rios [112]. Em termos gerais, alguns autores têm sugerido que exista um pico das densidades de *An. triannulatus s.l.* no território brasileiro durante a época de chuvas e transição chuvas-seca [131]. O Warareu foi a única comunidade onde encontramos esta espécie em densidades suficientes para caracterizar sua sazonalidade, sendo mais abundante no início da época seca. Em nossas áreas de estudo, o *An. triannulatus s.l.* mostrou um comportamento de espécie especialista, estando altamente associado a corpos de água bem expostos ao sol ($P < 0,05$), mas sem correlação com a distância das habitações indígenas ($P > 0,05$). *An. triannulatus s.l.* foi também associado com criadouros expostos ao sol, mas não com a proximidade com as populações humanas em outro estudo em Roraima [202]. Os principais criadouros associados a esta espécie em nossas áreas de estudo foram os OX (87,9% do total de larvas coletadas), NOX (4,5%) e FAAR (7,5%). Nossos dados estão em consonância com os resultados para *An. triannulatus s.l.* na região Yanomami venezuelana de Ocamo, onde esta espécie foi associada significativamente com criadouros tipo lagoa (LAR e FAAR) [203]. Ao contrário, o *An. triannulatus s.l.* foi considerado de comportamento generalista num estudo nos estados de Roraima e do Pará no Brasil, onde não foi influenciado por restrições ambientais e apresentou uma ampla distribuição [204]. No rio Miranda, em Mato Grosso do Sul, foram encontrados coexistindo os três membros do complexo *Triannulatus*, *An. triannulatus s.l.*, *An. halophylus* e *An. triannulatus C*. Os autores sugeriram que os alagamentos sazonais da região e a posterior dinâmica interna das lagoas teriam uma forte influência na dinâmica destas espécies. O *An. triannulatus s.s.* foi mais abundante no final das épocas de chuvas, uns 30 a 60 dias depois do alagamento. Em contraste, o *An. halophylus* e *An. triannulatus C* foram mais abundantes na segunda metade da época seca (não foram detectados PI de

época seca ao longo dos cinco meses de estiagem), quando os corpos de água alagados perderam a conexão com os rios, diminuíram seus tamanhos e se tornaram mais salobros [131].

O efeito das chuvas sobre as diferentes populações de anofelinos dependerá do tipo de criadouro explorado por cada espécie [205]. Em nossa área de estudo, encontramos algumas espécies que estiveram mais relacionadas a criadouros associados ao aumento das chuvas. O complexo Oswaldoi é composto pelo menos por três espécies diferentes, *An. oswaldoi s.s.*, *An. oswaldoi A* e *An. oswaldoi B* [108]. Este complexo tem sido associado a uma ampla gama de condições dos criadouros, com marcada tolerância a diferentes graus de exposição ao sol, turbidez e tamanho dos corpos de água [111]. Os criadouros formados somente por água de chuvas são corpos de água com poucos nutrientes. Nossos resultados concordam com a preferência de *An. oswaldoi s.l.* por criadouros com diferentes graus de exposição ao sol, de diferentes tamanhos (desde grandes LAR a pequenas poças formada ao longo dos SFS e MFS durante a época seca) e graus de turbidez (desde criadouros de águas claras até águas extremadamente turbas). Do total de 396 larvas de *An. oswaldoi s.l.* identificadas no Toototobi e Parafuri 33,6%, 24,2%, 20,7, 6,3% e 15,2% foram coletadas em LAR, FAAR, FANAR, SFS e MFS respectivamente. Na primeira metade da época seca, encontramos uma densidade larvar importante em poças sombreadas no leito de um SFS (0,94 larvas/conchada) no Koioipi. *An. oswaldoi s.l.* correspondeu a 34,4% destas larvas. Além das poças em igarapés e FANAR residuais, os LAR constituíram importantes FRE para *An. oswaldoi s.l.* na área Yanomami, especialmente para *An. oswaldoi A-like* no Parafuri. Estudos na Venezuela também associaram esta espécie a criadouros tipos lagoas [193]. Num estudo anterior durante a época seca na região Yanomami de Ocamo na Venezuela, as larvas de *An. oswaldoi s.l.* foram as mais comumente coletadas, seguidas pelo *An. triannulatus s.l.* e *An. darlingi*. Neste estudo, o *An. oswaldoi s.l.* foi coletado principalmente em criadouros tipo SFS e MFS (nas poças que se formam na seca), normalmente com sombra parcial e pouca profundidade [161].

Em termos gerais o *An. oswaldoi s.l.* foi mais abundante nos meses de chuvas, transição chuvas-seca e durante a primeira metade da época seca em nossas áreas de estudo. Esta espécie também é influenciada pelo PI dos rios de baixa ordem, podendo apresentar picos de densidade bruscos e irregulares.

Encontramos exemplos nos picos de densidades acentuados nas comunidades de Mahaxipoha e Raxasi em abril de 2013. Também encontramos diferenças na ocorrência desta espécie na segunda metade da época seca no Toototobi, onde quase desapareceu. Enquanto que no Parafuri, foram coletados exemplares o ano todo mas com menores densidades no período de transição seca-chuvas. No Polo Base do Marari, foram detectadas densidades muito menores desta espécie, devido provavelmente à pouca abundância de criadouros tipo FAAR (13,2%) e FANAR (7,5%).

O *An. oswaldoi s.l.* apresentou padrões de expansão-contração mais diversificados que o *An. darlingi* ou *An. triannulatus s.l.* A possibilidade de membros deste grupo aproveitar LAR e poças nos leitos de MFS e SFS como principais FRE, permitiu ao *An. oswaldoi s.l.* manter populações em áreas da floresta afastadas dos rios (como o Koiopi) e, portanto, sem criadouros que dependam dos PI, onde os FRE serão os SFS e MFS. Em comunidades próximas aos rios, existirá uma coocorrência dos dois padrões de distribuição do *An. oswaldoi s.l.*, utilizando ambos tipos de FRE para manter as populações durante os meses mais secos. Dos exemplares coletados, 57,8% e 42,2% ocorreram em criadouros associados e não associados aos rios, respectivamente. Nossa hipótese é que parte desta marcada heterogeneidade na escolha de pontos de oviposição poderia ser explicada pela coocorrência de diferentes membros do complexo Oswaldoi, já que estas espécies poderiam apresentar preferências por nichos ecológicos diferentes. As lagoas também foram apontadas como criadouros principais de *An. triannulatus s.s* e *An. oswaldoi s.l.* em outro estudo na área indígena Ye'kuana e Sanuma do sul da Venezuela [179]. Ainda na Venezuela, em uma área litoral no estado do Sucre, o *An. oswaldoi s.l.* foi coletado em áreas de poças com vegetação permanente e canais sem vegetação [206].

Criadouros associados às chuvas vão ter um grau de previsibilidade maior, tendo o AEC disponível somente nessas épocas onde as chuvas são mais intensas e frequentes, mantendo por alguns meses esses criadouros com água. Por este motivo, encontramos uma sazonalidade mais regular nas densidades de espécies adaptadas a criadouros não associados aos PI, como *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius* e *An. guarao-like* na comunidade de Koiopi.

Já o *An. mattogrossensis* também apresentou um padrão de expansão-contração semelhante às espécies heliofílicas, proliferando em criadouros

temporários na época chuvosa e de transição chuva-seca como FAAR parcial ou expostos ao sol. O *An. mattogrossensis* apresentou um comportamento mais próximo à dinâmica dos criadouros associados aos rios. Somente 7% dos espécimes foram coletados em criadouros não associados aos rios. As maiores densidades desta espécie flutuaram entre os dois anos, mas encontramos maiores densidades na época de transição chuvas-seca e primeira metade da seca em 2013 e na época de chuvas em 2014. Identificamos os LAR também como seus potenciais FRE. Concordando com nossos resultados, esta espécie foi mais comum em lagoas na área Yanomami de Ocamo [161]. Cabe destacar que o *An. mattogrossensis* e *An. nuneztovari s.l.* não foram coletados na área submontana de Parafuri. Nossa hipótese é que a falta de LAR que entram em fase de secagem pronunciada e portanto com períodos de águas turbas, desfavoreceu a colonização desta região da floresta por *An. nuneztovari s.l.* Outro fator que pode ter influenciado na ausência de *An. mattogrossensis* e a presença menor de FAAR parcial ou bem expostas ao sol no Parafuri.

An. intermedius tem sido descrito como uma espécie associada a ambientes silvestres [207]. As larvas identificadas como *An. intermedius* / *An. guarao-like*, colonizaram uma grande variedade de corpos de água com características ambientais muito diferentes. Foram coletados 56,4% e 48,1% dos exemplares dessa espécie em criadouros associados e não associados aos rios, respectivamente. Como no caso do *An. oswaldoi s.l.*, esta espécie (ou grupo de espécies) foi capaz de explorar grande número de criadouros e FRE. Pelo fato de proliferar em criadouros associados aos PI, poderemos encontrar picos de densidades extremos e inesperados, como no caso de *An. oswaldoi s.l.* Sugerimos que este foi o caso das coletas extremas no Apiahik durante a primeira campanha de setembro de 2012. Assim como *An. oswaldoi s.l.*, os picos de densidade mais comuns para *An. intermedius* / *An. guarao-like* ocorreram nos meses de chuvas, transição chuvas-seca e primeira metade da seca.

Em nossas áreas de estudo, espécies morfológicamente identificadas como *An. costai-like* apresentaram preferências por criadouros temporários e não associados aos PI ($P < 0.05$), demonstrando um comportamento ecológico oposto ao do *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.* Não coletamos nenhuma larva de *An. costai-like* em criadouros expostos ao sol. A maioria das larvas desta espécie foram coletadas, de fato, em criadouros quase totalmente sombreados

(88,2% do total) e, o restante, em criadouros parcialmente expostos ao sol, sendo que 67,7% foi coletado em FANAR e 24,3% na combinação de SFS+MFS. Somente 3,6% das larvas foram encontradas em LAR, mas em nenhum caso bem expostas ao sol.

A coocorrência de diferentes espécies de anofelinos pode modular a dinâmica das populações das larvas. Por exemplo, a coexistência de *An. arabiensis* e *An. gambiae* s.s. em pequenas poças foi associada a uma redução da sobrevivência de ambas as espécies e um incremento de 1,6 no tempo de formação de pupas para o *An. arabiensis* [208]. *An. dirus* s.l. tem sido relatado capaz de depredar outras espécies de mosquitos [209]. Pelo contrário, num estudo em Roraima-Brasil, foi sugerido que a presença de algumas espécies de anofelinos poderia facilitar sinergicamente a ocorrência de outras. Foram encontrados altos índices de afinidade entre *An. triannulatus* com *An. nuneztovari* e de *An. albitarsis* com *An. braziliensis* [210]. Em nossa área de estudo, encontramos algumas espécies de anofelinos coabitando os mesmos tipos de criadouros e até os mesmos subtipos de AEC, como por exemplo *An. oswaldoi* s.l. e *An. costai-like* com *An. intermedius/guarao-like* e *An. darlingi* com o *An. triannulatus* s.l. Na comunidade de Komomassipe, encontramos uma predominância muito clara de *An. darlingi* nos aglomerados de *Mayaca* sp. com relação ao *An. triannulatus* s.l. No entanto, no OX próximo à sede do Polo Base, e também em tapetes de *Mayaca* sp., encontramos a situação contrária, com predominância de *An. triannulatus* s.l. em relação ao *An. darlingi*. Nossa hipótese é que a distância às habitações indígenas (228 para o OX do Komomassipe e 408 metros para o OX da sede do Polo Base) e a população de cada área (156 Yanomami em Komomassipe e 34 no Posto), sejam dois fatores cruciais que modularam a maior ou menor prevalência da espécie mais sinantrópica, o *An. darlingi*. Estes determinantes ecológicos favoreceriam uma das espécies que, pelos seus altos números, poderia também inibir a ocorrência da outra espécie. Numa OX a 1.111 metros da comunidade de Warareu e com abundantes tapetes de *Cabomba* sp. e *Utricularia* sp., houve também predomínio claro de *An. triannulatus* s.l. em relação ao *An. darlingi*.

Exemplos da carga desigual da malária em comunidades indígenas podem se encontrar em várias regiões florestais do mundo. Em países latino-americanos, como a Guiana e o Panamá, os grupos indígenas representam

aproximadamente 10% da população dos países. Em contraste, 30% e 89% do total dos casos de malária ocorrem em áreas indígenas de Guiana e Panamá, respectivamente [37]. Existem algumas semelhanças dos determinantes socioculturais e entomológicos da malária entre áreas indígenas do continente asiático e áreas indígenas da Amazônia. No estado de Odisha, na Índia, existe uma desigual carga de morbimortalidade de malária associada a grupos tribais. Este estado contém somente 4% da população da Índia (com 61 grupos tribais diferentes), mas contribuiu com 43,9% de todos os casos de malária por *P. falciparum* e 25,5% das mortes associadas à malária em 2008 [211]. As áreas de floresta habitadas por grupos indígenas Karen, em regiões de floresta na fronteira de Tailândia-Mianmar, também têm sido identificadas como os principais focos de transmissão de malária restantes na Tailândia [212]. Estas aldeias indígenas da Ásia, ao igual que no caso de das comunidades Yanomami, estão formadas por aglomerados de casas concentrados em um espaço geográfico pequeno em áreas remotas da floresta, num ambiente com vetores competentes para a malária, gerando cenários propícios para o estabelecimento e manutenção de ciclos intensos de transmissão de malária.

Tem se estimado que os limites de detecção de infecção humana por microscopia estariam entre 10-30 parasitas por microlitro em condições ideais [213]. Outras estimativas colocam o limiar de detecção da microscopia e dos Testes de Diagnóstico Rápido (RDT) em condições de campo, em 50 parasitas por microlitro [4]. Estudos recentes na Amazônia brasileira apontam que os casos com baixas parasitemias que normalmente não são detectados por microscopia, teriam um papel importante na manutenção da transmissão de *P. vivax*. Esta situação foi apontada também como comum em áreas com baixa transmissão de malária num estudo recente no oeste da Amazônia. De fato, os autores apontaram que a proporção de casos de *P. vivax* que não eram detectados por microscopia aumentavam à medida que a prevalência de malária diminuía na população [214]. Adicionalmente, demonstraram que a maioria de casos subpatentes de *P. vivax* albergavam gametócitos circulantes, convertendo-se em fontes de infecção potenciais para os anofelinos competentes locais [214].

A principal espécie de plasmódio na área Yanomami e nos Polos Base estudados é o *P. vivax*. Baseado nestas observações, sugerimos que os casos de *P. vivax* subpatentes possam ter um papel fundamental na manutenção da

transmissão da malária nessas comunidades. O Polo Base de Marari tem tido registro de casos de malária ao longo dos últimos anos de forma contínua. Somente não foram diagnosticados casos no mês de maio de 2009. No entanto, em junho 2009 já foram diagnosticados por gota espessa 11 casos novos de *P. vivax*. Laserson et al. [180] afirmou que a transmissão de *P. vivax* será mais fácil de persistir de forma continuada em comunidades Yanomami devido à capacidade de recidivas desta espécie e porque os tratamentos radicais e prolongados com primaquina muitas vezes falham. Já o *P. falciparum* teria uma capacidade de persistência menor em comunidades semi-isoladas e precisaria de reintroduções periódicas. No Polo Base de Marari, tem sido constatada importante transmissão de *P. falciparum*, mas com períodos de transmissão mais descontínuos em comparação ao *P. vivax*. Por exemplo, no ano 2009, somente três casos de *P. falciparum* na comunidade do Gasolina foram diagnosticados, um por mês em janeiro, setembro e novembro. Neste mesmo ano, houve sete meses sem diagnóstico por gota espessa desta espécie plasmodial nesta comunidade, na qual podem ocorrer uma média de 10,75 picadas de *An. darlingi* por homem por noite no ambiente peridomiciliar. No caso de *P. falciparum*, um estudo recente estimou em 194 dias a duração de infecções não tratadas em pacientes africanos de Ghana. Os autores apontaram que há um pico da duração da infecção na faixa etária de 5-9 anos e menor no caso de crianças menores e adultos [215]. De maneira semelhante ao *P. vivax*, algumas destas infecções podem também ser de caráter submicroscópico, constituindo, portanto, uma fonte para a manutenção da circulação do *P. falciparum* de forma contínua no Marari. Adicionalmente, devem ser considerados os eventos frequentes de re-introdução de parasitas de fora da área Yanomami, especialmente no Polo Base de Marari.

Complementando a importância dos casos subpatentes na manutenção da transmissão principalmente de *P. vivax* e *P. falciparum* na área Yanomami, acreditamos que pode haver eliminação da circulação local destes plasmódios nas comunidades semi-isoladas somente com as ações de busca ativa por gota espessa. Este segundo evento, seria determinante para explicar a dinâmica de transmissão da malária nas áreas estudadas. Num estudo anterior foi sugerido que em comunidades Yanomami da Venezuela, devido principalmente ao fato que o mesmo grupo reside concentrado, a introdução de um caso de malária poderia afetar rapidamente um grande número de pessoas

e perpetuar a transmissão local na falta de medidas de controle [180]. Freeman et al. [216] desenvolveram um modelo preditivo para simular a progressão de infecções de *P. falciparum* numa comunidade Yanomami sem tratamento terapêutico na Venezuela. Detectaram que 20,7% dos casos foram assintomáticos e estimaram que um só portador assintomático do parasita poderia infectar 4,87 pessoas em um mês, dos quais, um deles seria também assintomático. A flutuação das densidades de anofelinos teriam um papel fundamental na variabilidade e intensidade deste processo. Também foi sugerido que, em situações de casos esporádicos de *P. falciparum*, esta espécie poderia sofrer extinções locais aleatórias [180].

O melhor exemplo que daria suporte à possibilidade da eliminação local da transmissão da malária encontra-se na comunidade de Komomassipe, Parafuri. Em maio de 2012, foi diagnosticado por gota espessa o último caso de *P. vivax* após um período contínuo de transmissão patente de 36 meses consecutivos. Posteriormente, houve uma fase de 33 meses sem que casos de malária fossem reportados. Já em março de 2015, começaram a ser diagnosticados numerosos casos de *P. vivax* nesta comunidade, surto que dura até os dias de hoje. Contrário ao exemplo do Apiahik, que encontra-se numa área com parâmetros entomológicos mais variáveis e quase sem *An. darlingi*, na comunidade de Komomassipe coletamos *An. darlingi* o ano todo e em certos períodos, com densidades elevadas. No Komomassipe, encontramos as maiores TPHN por *An. darlingi* (64,3 picadas por pessoa por noite) de todas as comunidades estudadas. Entre abril e junho de 2014, foram realizadas lâminas durante ações de Busca Ativa nesta comunidade sem detecção de nenhum caso. Nossa hipótese é que a circulação local de *P. vivax* foi efetivamente eliminada em maio de 2012, sendo altamente improvável que algum caso subpatente tivesse permanecido na comunidade e não tivesse conduzido a mais casos secundários em curto prazo.

Dados de malária entre 2009 e 2014 no Marari, indicaram a seguinte proporção de casos em menores de 10 anos: Alapusi (70,4%), Ahima (68,7%), Castanha (69,4%), Gasolina (75,6%) e Taibrapa (74,2%). A enorme predominância de casos de malária em crianças até 10 anos e a constatação da picada de *An. darlingi* intradomiciliar em todas as comunidades do Marari, sugere que neste Polo Base a transmissão intradomiciliar possa ser importante,

ainda que seja comum ver muitas crianças menores de 10 anos nos ambientes peridomiciliares e extradomiciliares nos horários crepusculares.

Identificamos padrões de sazonalidade de malária diferenciados entre as três áreas de estudo. No caso do Marari, a transmissão da malária ocorre ao longo de todo o ano. Identificamos os PI polimodais dos quatro rios de baixa ordem da região como os principais eventos que modulariam os picos de transmissão ao longo do ano. Como vimos ao longo do nosso estudo, os PI imprevisíveis estariam associados a picos previsíveis, tanto de densidades de *An. darlingi* quando, potencialmente, de casos de malária. Os dados de malária do Marari indicam súbitos picos de casos em diferentes épocas do ano. Em algumas áreas da Amazônia foram definidos picos de transmissão de malária em períodos posteriores a estação de chuvas [165] e em outros casos o aumento de casos esteve relacionado ao pico das chuvas [31].

Tanto nas comunidades de Toototobi como do Komomassipe-Parafuri foram detectados picos de casos de malária nos períodos de transição chuvas-seca e início da época seca, além de alguns picos irregulares de malária na época seca. Para avaliar a sazonalidade da malária nos Polos base, é importante considerar os períodos de irregularidades nas buscas ativas ou da realização de nenhuma lâmina por algum tempo. Isto pode levar a épocas com aparente menor incidência de casos ou de não transmissão e períodos posteriores que, com o restabelecimento das buscas ativas, seja detectado um aumento repentino mensal de casos. No caso do Toototobi, foram reportados problemas deste tipo [64].

Dois conceitos epidemiológicos são importantes para a compreensão dos padrões de transmissão diferenciados observados entre as comunidades Yanomami. São os conceitos de receptividade e de vulnerabilidade à malária. Em nossas comunidades de estudo, constatamos diferentes graus de receptividade (referente ao potencial entomológico nas proximidades de uma comunidade para a manutenção da transmissão local e o número de pessoas habitando a região) e de vulnerabilidade (principalmente pelo potencial de chegada de portadores de formas gametocíticas dentro da área) [38]. A comunidade Komomassipe do Polo Base Parafuri, apresenta um grau de receptividade muito alto, com uma OX que sustenta uma população local de *An. darlingi* importante, o ano todo e que está a somente 228 metros das habitações. No entanto, o grau de vulnerabilidade desta comunidade é muito

baixo, já que os Yanomami desta comunidade são muito isolados e seu risco de contacto com outras comunidades endêmicas é mínimo. Além disso, estes Yanomami não têm acesso a outras áreas endêmicas fora do território Yanomami. Não obstante, quando a transmissão se estabelece em Komomassipe, apresentam-se IPA muito elevados (foram registrados em 2009 IPAs de 1.742,6 nesta comunidade). Ainda dentro do Polo Base Parafuri, encontra-se a comunidade de Xaruna, com características opostas a Komomassipe. Com relação às características entomológicas, é uma área pouco receptiva à malária, sem LAR em um raio de 1 km da comunidade e quase sem ocorrência de *An. darlingi*. Por outro lado, esta comunidade é de maior vulnerabilidade que o Komomassipe, já que são frequentes os contactos com garimpeiros e Yanomami de outros Polos Base endêmicos vizinhos. A malária apresentou-se sempre com menor intensidade neste local (IPA máximo em 2009 de 483,3).

Em algumas comunidades da Amazônia, a ocorrência da malária tem sido associada a atividades normalmente de adultos do sexo masculino, como desmatamento, pescaria e atividades de mineração [214]. Em varias áreas indígenas, incluindo as nossas áreas de estudo, os homens têm um maior grau de mobilidade que as mulheres, deslocando-se mais para pescar, caçar, visitar localidades distantes ou até, participar de trabalhos em áreas endêmicas fora da área indígena. Existe uma grande mobilidade dos indígenas Yanomami do Marari para trabalhar na área de extração de piaçaba que se encontra nas proximidades da entrada da terra indígena, na área da comunidade não indígena de Nova Jerusalém. Nas proximidades deste local, encontram-se numerosos LAR e é apontado como o principal ponto onde os Yanomami do Marari e Médio Padauri contraem a doença [64]. Um estudo entomológico em Nova Jerusalém apontou a ocorrência do *An. darlingi* o ano todo e com preferência por picar dentro das moradias [166]. Normalmente, são os homens adultos os únicos que saem da área para trabalhar nos piaçabais, deslocando-se até ali por pequenas embarcações. Este fato gera um constante movimento de pessoas para fora e dentro da área Yanomami de Marari. A extração de piaçaba ocorre todo o ano [217]. Portanto, todas as comunidades do Marari apresentam alta vulnerabilidade à malária, mas com receptividades variáveis (de baixa no Castanha até alta no Gasolina). A presença de garimpo seria o principal fator associado à introdução dos parasitas na área Yanomami de

Parafuri (especialmente nas comunidades do segmento do rio Parima). Na comunidade remota indígena de Saul, na Guiana Francesa, Berger et al. [218] apontaram o papel da presença de atividades de garimpo como um dos principais fatores que aumentam a vulnerabilidade e o risco para o surgimento de novos focos de transmissão em comunidades indígenas isoladas.

A transmissão potencial de *P. malariae*/*P. brasilianum* na área Yanomami do Brasil precisa ainda ser esclarecida. Não são realizados esfregaços durante a coleta de lâminas na área e o pessoal técnico carece da capacitação para distinguir corretamente esta espécie de plasmódio de *P. vivax*.

O controle e eliminação de malária em áreas indígenas do Brasil é uma prioridade, já que além da grande carga de doença que ainda acomete estas populações vulneráveis, estas áreas de risco podem funcionar como reservatórios dos plasmódios para outras áreas próximas receptivas não indígenas. As estratégias de controle da malária em áreas indígenas devem ser adaptadas aos determinantes locais de transmissão.

Existem alguns exemplos de programas de controle bem sucedidos em áreas indígenas. Na comunidade de Waspán, da etnia Miskito e localizada ao norte da Nicarágua na fronteira com Honduras, houve uma redução significativa da carga da doença através de ações integradas de controle bem planejadas. O número de casos foi diminuído de 1.900 no período 2001-2006 até só 340 casos no período 2007-2011 [37]. Considerando a história do controle da malária no DSEI-Y, em 2002 se conseguiu uma redução muito acentuada da transmissão da malária, sendo registrados naquele ano somente 173 casos de *P. falciparum* e 361 de *P. vivax*. Esta situação foi associada à implementação de um modelo de ações intensificadas de controle da doença adaptadas às condições de transmissão locais [56].

O pilar do controle da malária na área Yanomami é a busca ativa de casos, acompanhado de tratamentos rápidos. Esta intervenção tem provado ser de alta eficiência no controle da doença [46]. Ações de Busca Ativa e tratamento dos "reservatórios" de infecção foram apontadas também como uma estratégia útil de controle em comunidades isoladas da floresta de Suriname [219]. No entanto, a utilização de métodos moleculares mais sensíveis seria necessária para a detecção das infecções subpatentes nos focos crônicos de malária, assim como a incorporação de estratégias mistas de

procura passiva e direcionada durante as ações de Buscas Ativas convencionais, aumentando a cobertura total por inquérito.

A fração de *An.darlingi* (e com grau muito menor de outras espécies) com atividade intradomiciliar seria susceptível parcialmente às intervenções primárias contra espécies com hábitos endofágicos e endofílicos, como o uso de MILD e BRI. No entanto, a implementação de estratégias de controle para reduzir a carga da doença provocada por espécies de comportamentos extradomiciliares, como a subpopulação mais numerosa de *An. darlingi* e a maior parte das populações de anofelinos das outras espécies coletadas em nossa área, tornam-se necessárias.

O uso de mosquiteiros impregnados tem provado ser parcialmente eficiente contra a malária transmitida por *An. darlingi* em cenários epidemiológicos semelhantes. Num estudo na área Yanomami da Venezuela comparando comunidades utilizando mosquiteiros impregnados com o piretróide Lambda-Cialotrina e outras com mosquiteiros não impregnados, foi constatada uma redução de 55% no número de casos de malária nas comunidades com os MILD impregnados [220]. Estes dados indicam um impacto significativo na malária causada por *An. darlingi* intradomiciliares. Em populações remotas e de floresta do sudeste asiático o uso de redes associados a mosquiteiros impregnados também teve um impacto na redução da incidência e prevalência de malária [221].

Para intervenções como a Borrifação Residual Intradomiciliar (BRI) ter impacto, as espécies de anofelinos devem apresentar pelo menos certo grau de comportamento endofílico por período de tempo suficiente como para absorver uma dose de inseticida letal suficiente [222]. Por exemplo, o uso de BRI com DDT nas campanhas de controle na Venezuela e Guiana nos anos de 1940 e 1950 teve um grande impacto nas populações de *An. darlingi*. Não obstante, este impacto foi menos pronunciado em populações do mesmo vetor no interior do país, onde esta espécie demonstrou um comportamento mais exofílico [222]. Em nossas áreas de estudo observamos em algumas ocasiões *An. darlingi* repousando no interior das habitações em situações de pre- e pós-hematofagia. Estes dados indicam que a BRI pode ser útil no combate à pequena fração de *An. darlingi* com hábitos intradomiciliares, embora as superfícies de preferência de repouso de *An. darlingi* no interior das habitações indígenas não sejam conhecidas. Além das próprias estruturas de madeira das

malocas, observamos boa parte dos exemplares de *An. darlingi* em repouso em palhas de cestos ou arcos e flechas, objetos pessoais que são removidos durante as ações de BRI.

A despeito da potencial utilidade dos inseticidas no controle de adultos e redução do contato homem-vetor em áreas indígenas, o controle da malária na área Yanomami, localizada em sistemas fluviais de baixa ordem na Amazônia, representa a melhor oportunidade para a implantação de medidas de controle larvar. O conjunto de resultados do presente trabalho contribuiu de modo significativo para o conhecimento da dinâmica dos criadouros locais produtivos e que devem ser alvo de tais ações. Além disso, mostra igualmente que tais ações deveriam ser concentradas nos longos períodos da época seca, quando os únicos redutos produtivos de *An. darlingi* são muito poucos e com o AEC total consideravelmente diminuída. As ações de controle em criadouros têm tido um resurgimento de interesse nos últimos tempos [48]. O atual manual da OMS sobre este tópico preconiza que as atividades de controle de foco, deveriam ser restritas principalmente aos locais onde os criadouros são poucos, fixos e que podem ser localizados [52].

6. CONCLUSÕES

- O presente estudo identificou 11 espécies de anofelinos nas áreas Yanomami. *An. darlingi*, *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius*, *An. triannulatus s.l.* e *An. costai-like* foram coletados nos três Polos Base; *An. mattogrossensis*, *An. nuneztovari s.l.*, *An. guarao-like* e *Chagasi bonneae*, foram detectados em Toototobi; *An. (Kerteszia) sp.*, *An. squamifemur* e *An. guarao-like*, em Parafuri; e *An. nuneztovari s.l.* e *An. mattogrossensis* em Marari.
- As espécies mais abundantes por Polo Base foram: *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius* no Toototobi; *An. oswaldoi s.l.*, *An. darlingi* e *An. triannulatus s.l.* (apenas em Warareu) no Parafuri; *An. nuneztovari s.l.* e *An. darlingi* no Marari.
- Propomos uma nova classificação de criadouros naturais baseada em três parâmetros ambientais, tais como: associação com os pulsos de inundação, temporalidade e exposição ao sol. Os tipos são: 1. Lagos associados aos rios (LAR) - subdivididos em lagos de ferradura (OX) e lagoas de depressão (NOX); 2. Áreas inundadas associadas aos rios (FAAR); 3. Áreas inundadas não associadas aos rios (FANAR); 4. Poças de chuva (RP); 5. Córregos (SFS); 6. Igarapés (MFS) e 7. Rios (RIV).
- Propusemos um nova metodologia de amostragem de larvas usando o aparelho de medição de distância laser e o uso de um bote inflável, o que possibilitou quantificar de forma acurada as flutuações sazonais da Área Efetiva de Criação.
- A distribuição das espécies predominantes por tipo de criadouro foram: *An. darlingi*, *An. triannulatus s.l.*, *An. oswaldoi s.l.* e *An. nuneztovari s.l.* e *An. intermedius* em LAR, *An. oswaldoi s.l.*, *An. mattogrossensis* e *An. intermedius* em FAAR, *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius* e *An. costai-like* em FANAR e *An. oswaldoi s.l.*, *An. intermedius* e *An. costai-like* em SFS e MFS.
- Os LAR do tipo OX foram os criadouros epidemiologicamente mais importantes, especialmente por sua produtividade de *An. darlingi*.
- A sazonalidade das espécies de anofelinos dependeu da disponibilidade e características intrínsecas dos criadouros à nível de localidade e sua

relação com os pulsos de inundação (LAR, FAAR) e as chuvas (FANAR, RP, SFS e MFS).

- *An. darlingi*, *An. triannulatus s.l.* e *An. mattogrossensis* tiveram preferência pelos criadouros associados aos rios, enquanto *An. costai-like* fez uso principalmente de criadouros não associados aos rios. *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius* mostraram alta capacidade de se adaptar a uma ampla gama de criadouros diferentes. *An. darlingi*, mostrou clara preferência por criadouros expostos ao sol e próximos às habitações indígenas.
- Encontramos padrões de sazonalidade na densidade de anofelinos vinculados à natureza imprevisível dos pulsos de inundação de rios de baixa ordem. No Toototobi, todas as espécies praticamente desapareceram na segunda metade da época seca. *An. oswaldoi s.l.* e *An. intermedius* foram mais abundantes nos meses de chuva e transição chuva-seca. No Parafuri, *An. darlingi* também mostrou padrões sazonais irregulares em Komomassipe e Warareu. Entretanto, em ambos os anos o período de maior densidade anofélica foi na transição chuva-seca.
- *An. darlingi* é incriminado como o principal vetor da malária na área Yanomami de Marari onde ocorre, tendo sido encontrado infectado com *P. vivax* e *Plasmodium sp.* nas comunidades de Gasolina, Alapusi e Taibrapa, no intradomicílio e peridomicílio. Consideramos que a transmissão intradomiciliar seja feita principalmente por *An. darlingi*. Encontramos umas Taxas de Inoculação Entomológicas peridomiciliares elevadas em três aldeias de Marari, sendo de 65,4, 58,6 e 48,3 picadas infetantes por pessoa por ano no Alapusi, Gasolina e Taibrapa respectivamente.
- *An. intermedius* e *An. nuneztovari s.l.* foram encontrados infectados com *Plasmodium*, no Toototobi (Apiahik e Koioipi) e Marari (Taibrapa 2) respectivamente. Sugerimos que *An. intermedius*, *An. nuneztovari s.l.* e *An. oswaldoi s.l.*, possam contribuir na transmissão peri- e extradomiciliar da malária, nos horários vespertinos, na área Yanomami.
- *An. darlingi*, apresentou um pico horário entre 23 h e 01 h, nos Polos Base de Marari, no peri e extradomicílio e no peridomicílio no Polo Base de Parafuri (Komomassipe).

- Estes dados entomológicos servirão para a elaboração de estratégias de controle integradas adequadas para estas áreas indígenas endêmicas associadas a rios de baixa ordem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM: Malaria. *Lancet* 2014, 383:723-735.
2. World Health Organization: World malaria report 2014. Geneva: WHO; 2014.
3. Feachem RGA: Shrinking the Malaria Map A Guide on Malaria Elimination for Policy Makers. San Francisco: Univeristy of California; 2009.
4. Feachem RGA, Phillips AA, Targett GA: Shrinking the Malaria Map. A Prospectus on Malaria Elimination. San Francisco: University of California; 2009.
5. Liu J, Modrek S, Gosling RD, Feachem RG: Malaria eradication: is it possible? Is it worth it? Should we do it? *Lancet Glob Health* 2013, 1:e2-3.
6. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT: Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 2010, 9:115.
7. Consoli RA, Lourenco de Oliveira R: *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
8. Rosenberg R, Rungsiwongse J: The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg* 1991, 45:574-577.
9. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, Prevost MC, Ishino T, Yuda M, Menard R: Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe* 2008, 3:88-96.
10. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P: Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 2007, 9:1215-1222.
11. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A: Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 2001, 291:141-144.
12. Mota MM, Rodriguez A: Invasion of mammalian host cells by Plasmodium sporozoites. *Bioessays* 2002, 24:149-156.

13. Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigarario AM, Silva S, Leiriao P, Carapau D, Armas-Portela R, Comoglio PM, et al: Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med* 2003, 9:1363-1369.
14. Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudencio M: Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol* 2008, 11:352-359.
15. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT: Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006, 313:1287-1290.
16. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976, 295:302-304.
17. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R: Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 75:575-581.
18. Cavasini CE, De Mattos LC, Alves RT, Couto AA, Calvosa VS, Domingos CR, Castilho L, Rossit AR, Machado RL: Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. *Hum Biol* 2006, 78:215-219.
19. Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, Alves RT, Rossit AR, Castilho L, Machado RL: *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, 101:1042-1044.
20. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Muller I: *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 2008, 5:e127.
21. Collins WE, Jeffery GM: *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20:579-592.

22. Carter R, Mendis KN: Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:564-594.
23. Moyes CL, Henry AJ, Golding N, Huang Z, Singh B, Baird JK, Newton PN, Huffman M, Duda KA, Drakeley CJ, et al: Defining the geographical range of the Plasmodium knowlesi reservoir. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8:e2780.
24. Galinski MR, Barnwell JW: Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitol* 2009, 25:200-204.
25. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S: A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101:229-237.
26. Wong J, Bayoh N, Olang G, Killeen GF, Hamel MJ, Vulule JM, Gimnig JE: Standardizing operational vector sampling techniques for measuring malaria transmission intensity: evaluation of six mosquito collection methods in western Kenya. *Malar J* 2013, 12:143.
27. de Oliveira-Ferreira J, Lourenco-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.
28. Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, Field LM: PCR-based detection of Plasmodium in Anopheles mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J* 2008, 7:177.
29. SVS-MS: Boletim Epidemiológico. vol. 44: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministerio da Saúde; 2013.
30. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, et al: The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 2010, 3:117.
31. Hiwat H, Bretas G: Ecology of Anopheles darlingi Root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors* 2011, 4:177.
32. Lourenco-de-Oliveira R, Guimaraes AE, Arle M, da Silva TF, Castro MG, Motta MA, Deane LM: Anopheline species, some of their habits and

- relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989, 84:501-514.
33. Deane LM: Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986, 81:5-14.
 34. Deane LM: Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1988, 38:223-230.
 35. Camargo E: Malaria, maleita e paludismo. *Ciência e cultura* 2003, 55.
 36. Benchimol JL, Silva AFC: Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da primeira república. *História, ciência e saúde* 2008, 15:719-762.
 37. Amazon Malaria Initiative
<http://www.usaidami.org/#sthash.dWlONkM0.dpbs>. Acesado em 1/08/2015.
 38. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suarez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenco-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT: Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014, 109:618-633.
 39. Marrelli MT, Malafronte RS, Sallum MA, Natal D: Kerteszia subgenus of Anopheles associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malar J* 2007, 6:127.
 40. Maselli LM, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Dorlhiac-Llacer PE, Sallum MA, Bydlowski SP: Detection of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malar J* 2014, 13:224.
 41. Laporta GZ, Burattini MN, Levy D, Fukuya LA, de Oliveira TM, Maselli LM, Conn JE, Massad E, Bydlowski SP, Sallum MA: Plasmodium falciparum in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malar J* 2015, 14:181.
 42. Gonzalez-Silva M, Bassat Q, Alonso PL: Getting ready for malaria elimination: a check list of critical issues to consider. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014, 109:517-521.
 43. Najera JA, Gonzalez-Silva M, Alonso PL: Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969). *PLoS Med* 2011, 8:e1000412.

44. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde: Ações de controle da malária. MS/SVS; 2006.
45. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, Ferreira MU: Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop* 2012, 121:281-291.
46. Macauley C: Aggressive active case detection: a malaria control strategy based on the Brazilian model. *Soc Sci Med* 2005, 60:563-573.
47. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde: Guia para a gestão local do controle da malaria - controle vetorial. MS/SVS; 2009.
48. Fillinger U, Lindsay SW: Larval source management for malaria control in Africa: myths and reality. *Malar J* 2011, 10:353.
49. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI: The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 2010, 3:72.
50. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Elyazar IR, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI: The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 2011, 4:89.
51. Worrall E, Fillinger U: Large-scale use of mosquito larval source management for malaria control in Africa: a cost analysis. *Malar J* 2011, 10:338.
52. World Health Organization: Larval Source Management: a supplementary measure for malaria vector control - an operational manual. WHO; 2013.
53. Killeen GF, Fillinger U, Kiche I, Gouagna LC, Knols BG: Eradication of Anopheles gambiae from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infect Dis* 2002, 2:618-627.
54. Coimbra CE, Jr., Santos RV, Welch JR, Cardoso AM, de Souza MC, Garnelo L, Rassi E, Foller ML, Horta BL: The First National Survey of

- Indigenous People's Health and Nutrition in Brazil: rationale, methodology, and overview of results. *BMC Public Health* 2013, 13:52.
55. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo demográfico 2010. Características gerais dos indígenas. IBGE; 2012.
 56. Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde: Situação da Saúde e Assistência - Relatório epidemiológico anual. MS/FNS; 2010.
 57. Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI): <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/secretaria-sesai/mais-sobre-sesai/9518-destaques>. Acesado em 1/07/2015.
 58. Kelly JA, Carrera J: Salud indígena en Venezuela. Caracas: Editorial Arte; 2007.
 59. Barata RB, Briceño-León RE: *Doenças endêmicas: abordagens sociais, culturais e comportamentais*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2000.
 60. Ianelli RV: *Epidemiologia da malária em populações indígenas da Amazônia*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2000.
 61. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. vol. 44. pp. 1-16. MS/SVS: 2013:1-16.
 62. Mello DA: Malária entre populações indígenas do Brasil. *Cad. Saúde Pública* 1985, 1:25-34.
 63. Ribeiro D: *O Índio e a civilização: a integração das populações indígenas no Brasil moderno*. 3ª Edição edn. Rio de Janeiro: Editora Vozes; 1979.
 64. Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde: Relatório Técnico da Malária - Distrito Sanitário Yanomami. MS/FNS; 2006.
 65. Junk WJ: Amazonian floodplains: their ecology, present and potential use. *Rev Hidrobiolo trop* 1982, 15:285-301.
 66. Sioli H: Das Wasser in Amazonasgebiet. *Fosch, Fortschr* 1950, 26:274-280.
 67. Junk WJ, Piedade MTF, Schongart J, Wittmann F: A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (várzeas). *Wetlands Ecol Manage* 2012, 2012:461-475.
 68. Junk JW, Wittmann F, Schongart J, Piedade MTF: A classification of the major habitats of Amazonian black-water river floodplains and a

- comparison with their white-water counterparts. *Wetlands Ecol Manage* 2014.
69. Strahler A: Quantitative Analysis of Watershed Geomorphology. *Trans Amer Geophys Union* 1957, 38:913-920.
 70. Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE: The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Proceedings of the International Large River Symposium. Cad Spec Publ Fish Aquat Sci* 1989, 106:110-127.
 71. Ward JV, Stanford JA: The serial discontinuity concept: extending the model the floodplain rivers. *Regul River* 1995, 10:159-168.
 72. Junk W, Piedade M, Lourival R, Wittmann F, Kandus P, Lacerda L, Bozelli R, Esteves F, Nunes da Cunha C, Maltchik L, et al: Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. *Aquat Conserv* 2014, 24:5-22.
 73. Junk W, Piedade M, Schongärt J, Wittmann F: A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (várzeas). *Wetlands Ecol Manage* 2012, 20:461-475.
 74. McKeon SN, Moreno M, Sallum MA, Povoá MM, Conn JE: Distinct population structure for co-occurring *Anopheles goeldii* and *Anopheles triannulatus* in Amazonian Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, 108:605-615.
 75. Zimmerman RH: Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87 Suppl 3:371-383.
 76. Klein TA, Lima JBP: Biting behaviour of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *Rev Socied Brasil Medicina Tropical* 1991, 24:13-20.
 77. Marrelli MT, Sallum MA, Marinotti O: The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - a critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101:817-832.
 78. Motoki MT, Wilkerson RC, Sallum MA: The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104:823-850.
 79. Rosa-Freitas MG, Lourenco-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF: Anopheline species complexes in

- Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93:651-655.
80. Reinert JF, Kaiser PE, Seawright JA: Analysis of the Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an integrated approach. *J Am Mosq Control Assoc* 1997, 13 Suppl:1-102.
 81. Li C, Wilkerson RC: Identification of Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 100:495-500.
 82. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderon GI, Quinones ML, Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Gonzalez R: Malaria vector species in Colombia: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106 Suppl 1:223-238.
 83. Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig RS, Kloetzel JK: Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with Plasmodium falciparum, P. vivax, the variant P. vivax VK247 and P. malariae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, 87:391-394.
 84. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, et al: A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* 2012, 5:69.
 85. McKeon SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MA, Lima JB, Povoá MM, Conn JE: Lineage divergence detected in the malaria vector Anopheles marajoara (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J* 2010, 9:271.
 86. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Rios-Velasquez CM, Melo FF, Pessoa FA, Oliveira GA, Campos KM, Villegas LM, et al: An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015, 110:23-47.
 87. Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R: Incrimination of Anopheles (Anopheles) intermedius Peryassu, An. (Nyssorhynchus) nuneztovari Gabaldon, An. (Nys.) oswaldoi Peryassu as natural vectors of Plasmodium falciparum in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012, 107:429-432.

88. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS: Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 1998, 59:325-335.
89. Forattini OP: *Culicidologia médica - Identificação, biologia e epidemiologia*. São Paulo: EDUSP; 2002.
90. Davis NC: A note on the malaria carrying anophelines in Belém, Pará. *Rev di Malariol* 1931, 10.
91. Galvão ALA, Damasceno RG, Marques AP: Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belem, Pará. *Arq Hig* 1942, 12:51-11.
92. Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL: [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica* 2002, 11:235-244.
93. Deane LM, Causey OR, Deane MP: Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 1948, 1:827-965.
94. Tauil PL: The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106 Suppl 1:105-106.
95. Pajot F, le Pont F, Molez J, Degallier N: Agressivité d'Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae) en Guyane Française. *Cahiers ORSTOM ser Ent med et Parasit* 1977, 15:15-22.
96. Charlwood JD: Variações geográficas no ciclo de picada do Anopheles darlingi Root no Brasil. *Bull entomol Res* 1978, 70:685-692.
97. Hudson JE: Anopheles darlingi Root (Diptera:Culicidae) in the Suriname rain forest. *Bull Entomol Res* 1984, 74:129-142.
98. Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momen H, Molyneux DH: Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of Anopheles darlingi from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 1992, 8.
99. Rozendaal JA: Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector Anopheles darlingi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990, 85:221-234.
100. Klein TA, Lima JB: Seasonal distribution and biting patterns of Anopheles mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 1990, 6:700-707.

101. Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sanchez-Lozano W, Pinedo VV, Salas-Cobos E, Flores S, Patz JA: Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am J Trop Med Hyg* 2009, 81:5-12.
102. Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR: Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:364-376.
103. Gutierrez LA, Gomez GF, Gonzalez JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, Correa MM: Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Cordoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2010, 83:38-47.
104. Gonzalez R, Wilkerson R, Suarez MF, Garcia F, Gallego G, Cardenas H, Posso CE, Duque MC: A population genetics study of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from Colombia based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism markers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:255-262.
105. de Almeida RW, Tovar FJ, Ferreira, II, Leoncini O: Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003, 33:307-315.
106. Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA: Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect Genet Evol* 2012, 12:1246-1252.
107. Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel MA, Sallum MA: Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) Clusters by Major Biogeographical Region. *PLoS One* 2015, 10:e0130773.
108. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MA, Velez ID, Quinones ML, Flores-Mendoza C, Chadee DD, Alarcon J, et al: Systematics of the oswaldoi complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. *Parasit Vectors* 2013, 6:324.
109. Lane J: *Neotropical Culicidae*. University of São Paulo; 1953.

110. Flores-Mendoza C, Peyton EL, Wilkerson R, Lourenco de Oliveira R: Anopheles (Nyssorhynchus) Konderi Galvão and Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi (Peryassu) (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 2004, 106:118-132.
111. de Barros FS, de Aguiar DB, Rosa-Freitas MG, Luitgards-Moura JF, Gurgel Hda C, Honorio NA, de Arruda ME, Tsouris P, Vasconcelos SD: Distribution summaries of malaria vectors in the northern Brazilian Amazon. *J Vector Ecol* 2007, 32:161-167.
112. Faran ME, Linthicun KJ: A handbook of the Amazonian species of Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) *Mosq Systematics* 1981, 13:1-81.
113. Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL: Insight into Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol* 2008, 45:970-981.
114. Branquinho MS, Araujo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, Kloetzel JK: Anopheles oswaldoi a potential malaria vector in Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, 90:233.
115. Marrelli MT, Branquinho MS, Hoffmann EH, Taipe-Lagos CB, Natal D, Kloetzel JK: Correlation between positive serology for Plasmodium vivax-like/Plasmodium simiovale malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998, 92:149-151.
116. Marrelli MT, Honorio NA, Flores-Mendoza C, Lourenco-de-Oliveira R, Marinotti O, Kloetzel JK: Comparative susceptibility of two members of the Anopheles oswaldoi complex, An. oswaldoi and An. konderi, to infection by Plasmodium vivax. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, 93:381-384.
117. Quinones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton YM: Incrimination of Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli and An. (Nys.) oswaldoi as natural vectors of Plasmodium vivax in Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101:617-623.
118. Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenco-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O: Sequence analysis of the second internal

- transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1999, 36:679-684.
119. Ruiz F, Quinones ML, Erazo HF, Calle DA, Alzate JF, Linton YM: Molecular differentiation of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 100:155-160.
 120. Scarpassa VM, Conn JE: Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet Mol Res* 2006, 5:493-502.
 121. Motoki MT, Santos CL, Sallum MA: Intraespecific variation on the aedeagus of *Anopheles oswaldoi* (*Peryassu*) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol* 2009, 38:890-894.
 122. Galvão ALA, Lane J: Observações sobre alguns anofelinos de Salobra, Mato Grosso (Diptera, Culicidae). *Rev Biol Hyg* 1941, 11:10-18.
 123. Galvão ALA: Chaves para a determinação das espécies do subgenero *Nyssorhynchus* do Brasil. *Rev Biol Hyg* 1944, 9:141-153.
 124. Silva-Do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Lourenco-De-oliveira R, Monteiro FA: Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in central Brazil. *J Med Entomol* 2006, 43:455-459.
 125. Chadee DD, Wilkerson RC: *Anopheles triannulatus* (Neiva and Pinto): a new *Anopheles* record from Trinidad, West Indies. *J Am Mosq Control Assoc* 2005, 21:316-317.
 126. Silva do Nascimento TF, Lourenco-de-Oliveira R: *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97:801-811.
 127. Silva-do-Nascimento TF, Pitaluga LD, Peixoto AA, Lourenco-de-Oliveira R: Molecular divergence in the timeless and cpr genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, 106 Suppl 1:218-222.
 128. Gabaldon A: Malariology. In *Malaria control in the Neotropic Region*. Edited by Boyd MF. Philadelphia: Saunders; 1949: 749-763

129. Lourenco-de-Oliveira R, Luz SL: Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon--II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996, 91:687-694.
130. Rubio-Palis Y: Variation of the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 50:420-424.
131. Silva-do-Nascimento TF, Lourenco-de-Oliveira R: Diverse population dynamics of three Anopheles species belonging to the Triannulatus Complex (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:975-982.
132. Ribeiro JM: Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (Aedes, Anopheles, Culex). *Med Vet Entomol* 2000, 14:142-148.
133. Moreno M, Bickersmith S, Harlow W, Hildebrandt J, McKeon SN, Silva-do-Nascimento TF, Loaiza JR, Ruiz F, Lourenco-de-Oliveira R, Sallum MA, et al: Phylogeography of the neotropical Anopheles triannulatus complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasit Vectors* 2013, 6:47.
134. Charlwood JD, Wilkes TJ: Observations on the biting activity of Anopheles triannulatus bachmanni from the Mato Grosso, Brazil. *Acta Amaz* 1981, 11:411-413.
135. Deane LM, Daniel Ribeiro C, Lourenco de Oliveira R, Oliveira-Ferreira J, Guimaraes 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.
136. Faran ME: Mosquito studies (Diptera, Culicidae). A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. *Contributions of the American Entomological Institute* 1980, 15:1-215.
137. Bergo ES, Souto RN, Galardo AK, Nagaki SS, Calado DC, Sallum MA: Systematic notes on Anopheles Meigen (Diptera: Culicidae) species in the state of Amapa, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:373-376.
138. Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Santos CL, Galardo AK, Sallum MA: Resurrection of Anopheles goeldii from synonymy with Anopheles nuneztovari (Diptera, Culicidae) and a new record for Anopheles

- dunhami in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:791-799.
139. Santa Ana DC, Bergo ES, Sallum MA: *Anopheles goeldii* Rozeboom & Gabaldón (Diptera, Culicidae): a species of the Nuneztovari Complex of *Anopheles* Meigen. *Rev Bras Entomol* 2015, 59:68-76.
 140. Conn J, Puertas YR, Seawright JA: A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. *J Am Mosq Control Assoc* 1993, 9:294-301.
 141. Fritz GN, Conn J, Cockburn A, Seawright J: Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol* 1994, 11:406-416.
 142. Rafael MS, Tadei WP, Recco-Pimentel SM: Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, 98:629-635.
 143. Elliott R: The influence of vector behavior on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1972, 21:755-763.
 144. Scarpassa VM, Tadei WP, Suarez MF: Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:1010-1018.
 145. Galardo AK, Arruda M, D'Almeida Couto AA, 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.
 146. Tadei WP, Dutary Thatcher B: Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000, 42:87-94.
 147. Escovar JE, Gonzalez R, Quinones ML: Anthropophilic biting behaviour of *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab associated with Fishermen's activities in a malaria-endemic area in the Colombian Pacific. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, 108:1057-1064.
 148. Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L: Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* 2014, 7:581.

149. García M, Ronderos RA: Mosquitos de la República Argentina. I. Tribu Anophelini (Diptera, Culicinae). *Anales de la Comisión de Investigaciones de la Provincia de Buenos Aires* 1962, 3:103-201.
150. Moroni RB, Maia Jde F, Tadei WP, Santos JM: Genetic variability among Anopheles species belonging to the Nyssorhynchus and Anopheles subgenera in the Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, 43:409-415.
151. Belkin JN, Schick RX, Heinemann SJ: Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXV. Mosquitoes originally described from Brazil. *Contr Am ent Inst* 1971, 7:1-64.
152. dos Santos JM, Rodriguez GA, Maia Jde F, Tadei WP: Variability and genetic differentiation among Anopheles (Ano.) intermedius Chagas, 1908 and Anopheles (Ano.) mattogrossensis Lutz & Neiva, 1911 (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 100:531-537.
153. Detinova TS: Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monogr Ser World Health Organ* 1962, 47:13-191.
154. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, Hill V, Udhayakumar V: Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS One* 2013, 8:e56677.
155. Rejmankova E, Grieco J, Achee N, Roberts D: Ecology of Larval Habitats. In *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Edited by Manguin S. Rijeka: InTech; 2013: 397-446
156. Drago E, Paira A, Wantsen K: Channel-floodplain geomorphology and connectivity of the Lower Paraguay hydrosystem. *Ecohydrol Hydrobiol* 2008, 8:31-48.
157. Lesack L, Melack J: Flooding hydrology and mixture dynamics of lake water derived from multiple sources in an Amazon floodplain lake. *Water Resour Res* 1995, 31:329-345.
158. Esteves F: A gênese dos ecossistemas lacustres. In *Fundamentos de Limnologia*. Edited by Ed. Rio de Janeiro: Interciência; 1998: 84-103
159. Junk W: Flood pulsing and the linkages between terrestrial, aquatic, and wetlands systems. *Verh Internat Verein Limnol* 2005, 29:11-38.

160. Junk W, Fernandez M, Schongärt J, Cohn-Haft M, Adeney J, Wittmann M: A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. *Wetlands* 2011, 31:623-640.
161. Rubio-Palis Y, Menare C, Quinto A, Magris M, Amarista M: Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entomotropica* 2005, 20:29-38.
162. Lourenço-de-Oliveira R: Some observations on the mosquitoes of indian settlements in Xingu National Park, Mato Grosso state, Brazil, with emphasis on malaria vectors. *Rev Brasil Biol* 1989, 49:393-397.
163. Ianelli RV, Honorio NA, Lima DC, Lourenco-De-Oliveira R, Santos RV, Coimbra Junior CE: Faunal composition and behavior of anopheline mosquitoes in the Xavante Indian reservation of Pimentel Barbosa, central Brazil. *Parasite* 1998, 5:197-202.
164. Santos RL, Padilha A, Costa MD, Costa EM, Dantas-Filho Hde C, Povoá MM: Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon. *Rev Saude Publica* 2009, 43:859-868.
165. Magris M, Rubio-Palis Y, Menares C, Villegas L: Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:303-311.
166. Suarez-Mutis MC, Fe NF, Alecrim W, Coura JR: Night and crepuscular mosquitoes and risk of vector-borne diseases in areas of piassaba extraction in the middle Negro River basin, state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104:11-17.
167. Rubio-Palis Y, Bevilacqua M, Medina DA, Moreno JE, Cardenas L, Sanchez V, Estrada Y, Anaya W, Martinez A: Malaria entomological risk factors in relation to land cover in the Lower Caura River Basin, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, 108:220-228.
168. Grietens KP, Xuan XN, Ribera J, Duc TN, Bortel W, Ba NT, Van KP, Xuan HL, D'Alessandro U, Erhart A: Social determinants of long lasting insecticidal hammock use among the Ra-glai ethnic minority in Vietnam: implications for forest malaria control. *PLoS One* 2012, 7:e29991.
169. Reinbold-Wasson DD, Sardelis MR, Jones JW, Watts DM, Fernandez R, Carbajal F, Pecor JE, Calampa C, Klein TA, Turell MJ: Determinants of

- Anopheles seasonal distribution patterns across a forest to periurban gradient near Iquitos, Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2012, 86:459-463.
170. Mascarenhas BM, Guimarães DG, Brígida MS, Pinto CS, Gomes Neto HA, Pereira JDB: Estudo de anofelinos antropofílicos peridomiciliares da Praia da Saudade na Ilha de Cotijuba: uma área endêmica de malária em Belém, Pará. *Acta Amaz* 2009, 39:453-458.
171. Leandro-Reguillo P, Thomson-Luque R, Monteiro WM, de Lacerda MV: Urban and architectural risk factors for malaria in indigenous Amazonian settlements in Brazil: a typological analysis. *Malar J* 2015, 14:284.
172. Kelly DW: Why are some people bitten more than others? *Trends Parasitol* 2001, 17:578-581.
173. Biran A, Smith L, Lines J, Ensink J, Cameron M: Smoke and malaria: are interventions to reduce exposure to indoor air pollution likely to increase exposure to mosquitoes? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, 101:1065-1071.
174. de Barros FS, Honorio NA: Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:299-302.
175. de Barros FS, Honorio NA, Arruda ME: Survivorship of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in relation with malaria incidence in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 2011, 6:e22388.
176. Girod R, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, Fouque F: *Anopheles darlingi* bionomics and transmission of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:702-710.
177. Kilama M, Smith DL, Hutchinson R, Kigozi R, Yeka A, Lavoy G, Kanya MR, Staedke SG, Donnelly MJ, Drakeley C, et al: Estimating the annual entomological inoculation rate for *Plasmodium falciparum* transmitted by *Anopheles gambiae* s.l. using three sampling methods in three sites in Uganda. *Malar J* 2014, 13:111.
178. Pova 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.
179. Rubio-Palis Y, Moreno JE, Bevilacqua M, Medina D, Martínez A, Cardenas L, Guzmán H, González J: Caracterización ecológica de los

- anofelinos y otros culícidos en territorio indígena del Bajo Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *B Malariol Salud Amb* 2010, 1:95-107.
180. Laserson KF, Wypij D, Petralanda I, Spielman A, Maguire JH: Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:767-773.
 181. Laporta GZ, Lopez de Prado PI, Kraenkel RA, Coutinho RM, Sallum MA: Biodiversity can help prevent malaria outbreaks in tropical forests. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, 7:e2139.
 182. Araujo MS, Messias MR, Figueiro MR, Gil LH, Probst CM, Vidal NM, Katsuragawa TH, Krieger MA, Silva LH, Ozaki LS: Natural Plasmodium infection in monkeys in the state of Rondonia (Brazilian Western Amazon). *Malar J* 2013, 12:180.
 183. Giglioli G: Ecological Change as a Factor in Renewed Malaria Transmission in an Eradicated Area. A Localized Outbreak of A. Aquasalis-Transmitted Malaria on the Demerara River Estuary, British Guiana, in the Fifteenth Year of A. Darlingi and Malaria Eradication. *Bull World Health Organ* 1963, 29:131-145.
 184. Wantzen KM, Junk WJ, Rothhaupt KO: An extension of the floodpulse concept (FPC) for lakes. *Hydrobiologia* 2008, 613:151-170.
 185. Silver J: Chapter 3 Sampling the Larval Population. In *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. Dordrecht: Springer; 2008
 186. Hardy AJ, Gamarra JG, Cross DE, Macklin MG, Smith MW, Kihonda J, Killeen GF, Ling'ala GN, Thomas CJ: Habitat hydrology and geomorphology control the distribution of malaria vector larvae in rural Africa. *PLoS One* 2013, 8:e81931.
 187. Service MW: Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it. *J Med Entomol* 1997, 34:579-588.
 188. Charlwood JD, Alecrim WA: Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Ann Trop Med Parasitol* 1989, 83:569-576.
 189. Achee NL, Grieco JP, Andre RG, Rejmankova E, Roberts DR: A mark-release-recapture study using a novel portable hut design to define the flight behavior of *Anopheles darlingi* in Belize, Central America. *J Am Mosq Control Assoc* 2005, 21:366-379.

190. Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Rejmankova E, Hakre S: Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol* 1996, 33:205-211.
191. Barros FS, Arruda ME, Gurgel HC, Honorio NA: Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bull Entomol Res* 2011, 101:643-658.
192. Rachou GR: Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. *Rev Bras Malariol D Trop* 1958, 10:145-181.
193. Moreno J, Rubio-Palis Y, Acevedo P: Identificación de criaderos de anofelinos en un área endémica del estado Bolívar, Venezuela. *B Malariol Salud Amb* 2000, XL:21-30.
194. Yasuoka J, Levins R: Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 76:450-460.
195. Giglioli G: Malaria in British Guiana; part III. Breeding habits *Agr J British Guiana* 1938, 9:197-206.
196. Tadei WP, dos Santos JM, Costa WL, Scarpassa VM: [Biology of Amazonian *Anopheles*. XII. Occurrence of *Anopheles* species, transmission dynamics and malaria control in the urban area of Ariquemes (Rondonia)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1988, 30:221-251.
197. Gil LH, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PE, da Silva LH: Urban and suburban malaria in Rondonia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102:271-276.
198. Service MW: Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. *Rev Saude Publica* 1991, 25:165-178.
199. Junk WJ, Wantzen KM: The Flood Pulse Concept: New Aspects, Approaches and Applications - An Update. In *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries Volume II* (Welcomme RL, Petr T eds.). Phnom Penh 2003.
200. Pinault LL, Hunter FF: Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*,

- and *Anopheles oswaldoi* s.l. populations in lowland and highland Ecuador. *J Vector Ecol* 2012, 37:124-136.
201. Paaijmans KP, Read AF, Thomas MB: Understanding the link between malaria risk and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:13844-13849.
 202. Barros FS, Honorio NA, Arruda ME: Mosquito anthropophily: implications on malaria transmission in the Northern Brazilian Amazon. *Neotrop Entomol* 2010, 39:1039-1043.
 203. Rejmankova E, Rubio-Palis Y, Villegas L: Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J Vector Ecol* 1999, 24:130-137.
 204. McKeon SN, Schlichting CD, Povoas MM, Conn JE: Ecological suitability and spatial distribution of five *Anopheles* species in Amazonian Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2013, 88:1079-1086.
 205. Charlwood JD, Braganca M: The effect of rainstorms on adult *Anopheles funestus* behavior and survival. *J Vector Ecol* 2012, 37:252-256.
 206. Grillet ME: Factors associated with distribution of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae) in a malarious area, northeastern Venezuela. *J Med Entomol* 2000, 37:231-238.
 207. Dusfour I, Carinci R, Issaly J, Gaborit P, Girod R: A survey of adult anophelines in French Guiana: enhanced descriptions of species distribution and biting responses. *J Vector Ecol* 2013, 38:203-209.
 208. Paaijmans KP, Huijben S, Githeko AK, Takken W: Competitive interactions between larvae of the malaria mosquitoes *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* under semi-field conditions in western Kenya. *Acta Trop* 2009, 109:124-130.
 209. Prakash A, Bhattacharyya DR, Mohapatra PK, Mahanta J: Breeding and day resting habitats of *Anopheles dirus* in Assam, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997, 28:610-614.
 210. Nagm L, Luitgards-Moura JF, Neucamp Cde S, Monteiro-de-Barros FS, Honorio NA, Tsouris P, Rosa-Freitas MG: Affinity and diversity indices for anopheline immature forms. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007, 49:309-316.

211. Sahu SS, Gunasekaran K, Vanamail P, Jambulingam P: Persistent foci of falciparum malaria among tribes over two decades in Koraput district of Odisha State, India. *Malar J* 2013, 12:72.
212. Parker DM, Matthews SA, Yan G, Zhou G, Lee MC, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Fan Q, Li P, Sattabongkot J, Cui L: Microgeography and molecular epidemiology of malaria at the Thailand-Myanmar border in the malaria pre-elimination phase. *Malar J* 2015, 14:198.
213. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA: A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:687-692.
214. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos Mda S, Nicolete VC, Fontoura PS, Goncalves RM, Viana SA, Menezes MJ, et al: Epidemiology of disappearing Plasmodium vivax malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8:e3109.
215. Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, Beck HP, Owusu-Agyei S, Smith TA: The dynamics of natural Plasmodium falciparum infections. *PLoS One* 2012, 7:e45542.
216. Freeman J, Laserson KF, Petralanda I, Spielman A: Effect of chemotherapy on malaria transmission among Yanomami Amerindians: simulated consequences of placebo treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:774-780.
217. Suárez-Mutis M: Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio rio Negro, uma área de extrativismo vegetal da piaçaba no Estado de Amazonas, Brasil. IOC-Fiocruz, Medicina Tropical; 2007.
218. Berger F, Flamand C, Musset L, Djossou F, Rosine J, Sanquer MA, Dufour I, Legrand E, Ardillon V, Rabarison P, et al: Investigation of a sudden malaria outbreak in the isolated Amazonian village of Saul, French Guiana, January-April 2009. *Am J Trop Med Hyg* 2012, 86:591-597.
219. Hiwat H, Mitro S, Samjhan A, Sardjoe P, Soekhoe T, Takken W: Collapse of Anopheles darlingi populations in Suriname after introduction of insecticide-treated nets (ITNs); malaria down to near elimination level. *Am J Trop Med Hyg* 2012, 86:649-655.

220. Magris M, Rubio-Palis Y, Alexander N, Ruiz B, Galvan N, Frias D, Blanco M, Lines J: Community-randomized trial of lambda-cyhalothrin-treated hammock nets for malaria control in Yanomami communities in the Amazon region of Venezuela. *Trop Med Int Health* 2007, 12:392-403.
221. Thang ND, Erhart A, Speybroeck N, Xa NX, Thanh NN, Ky PV, Hung le X, Thuan le K, Coosemans M, D'Alessandro U: Long-Lasting Insecticidal Hammocks for controlling forest malaria: a community-based trial in a rural area of central Vietnam. *PLoS One* 2009, 4:e7369.
222. Pates H, Curtis C: Mosquito behavior and vector control. *Annu Rev Entomol* 2005, 50:53-70.

ANEXO

New classification of natural breeding habitats for Neotropical anophelines in the Yanomami Indian Reserve, Amazon Region, Brazil and a new larval sampling methodology

Jordi Sánchez-Ribas^{1,2}, Joseli Oliveira-Ferreira¹, Maria Goreti Rosa-Freitas²,
Lluís Trilla³, Teresa Fernandes Silva-do-Nascimento^{2/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Institut de Recerca en Energia de Catalunya, Barcelona, Spain

Here we present the first in a series of articles about the ecology of immature stages of anophelines in the Brazilian Yanomami area. We propose a new larval habitat classification and a new larval sampling methodology. We also report some preliminary results illustrating the applicability of the methodology based on data collected in the Brazilian Amazon rainforest in a longitudinal study of two remote Yanomami communities, Parafuri and Toototobi. In these areas, we mapped and classified 112 natural breeding habitats located in low-order river systems based on their association with river flood pulses, seasonality and exposure to sun. Our classification rendered seven types of larval habitats: lakes associated with the river, which are subdivided into oxbow lakes and nonoxbow lakes, flooded areas associated with the river, flooded areas not associated with the river, rainfall pools, small forest streams, medium forest streams and rivers. The methodology for larval sampling was based on the accurate quantification of the effective breeding area, taking into account the area of the perimeter and subtypes of microenvironments present per larval habitat type using a laser range finder and a small portable inflatable boat. The new classification and new sampling methodology proposed herein may be useful in vector control programs.

Key words: *Anopheles* larvae - lakes associated with rivers - effective breeding area - Yanomami

Nearly all malaria cases in Brazil are reported from the Amazon Region (99.8%), where malaria remains a public health problem (Oliveira-Ferreira et al. 2010). Between 2001-2013, an average of 392,600 malaria cases per year was recorded in Brazil. Although there was a decreasing trend in the number of malaria cases nationwide, from half a million annual cases during the 1990s to 130 thousand malaria cases currently, highly focal hotspots of malaria transmission persist, especially for *Plasmodium vivax* (de Pina-Costa et al. 2014). In 2011, approximately 10.6% of all malaria cases in the Amazon Region were registered in indigenous areas, with higher incidences in certain states, such as Amazonas (AM), where 49% of the cases were reported in indigenous villages (MS/ SVS 2013). Despite this critical malaria burden in indigenous areas of the Amazon Region, few studies have reported in detail how malaria transmission is sustained in these remote areas or the ecology of anopheline larvae in such settings.

In Brazil, *Anopheles darlingi*, *Anopheles albitarsis s.l.* and *Anopheles aquasalis* are considered the main malaria vectors in different areas of the Amazon Region. *Anopheles nuneztovari s.l.* and *Anopheles trian-*

nulatus s.l. also play a role in malaria transmission as secondary or occasional vectors in some areas (Deane et al. 1948, 1986, Rosa-Freitas et al. 1998, Pimenta et al. 2015). Studies of anophelines in undisturbed and remote indigenous areas of the Amazon rainforest are difficult to perform due to their location and restricted access to these areas, which require the use of light aircrafts, boats and/or many walking hours to reach them. This is the case of the Yanomami areas studied herein. The Yanomami are a numerous, semi-isolated indigenous group living in the northern part of the Brazilian Amazon and southern Venezuela (Pithan et al. 1991).

For the ecological study of anopheline larvae, it is crucial to correctly identify and classify the main breeding sites in the area and thus to monitor their dynamics over time.

Lakes along the floodplains of Amazonian white-water rivers, known as *várzeas*, have been classified by Junk et al. (2012) into four types: scroll lakes (i.e., elongated lakes that are narrow and mostly covered by aquatic macrophytes), oxbow lakes (OX) (originating from abandoned river meanders with a horseshoe shape), depression lakes (located in floodplain depressions) and upland ria-lakes (i.e., dendritic lakes formed in drowned valleys of tributary rivers). OX may be connected in various degrees to the river and this connection greatly influences the seasonal water quality and volume as well as the macrophyte and invertebrate fauna composition (Mormul et al. 2013). According to the Strahler (1957) stream order classification, rivers are categorised based on a hierarchy of tributaries. The flood pulse, defined

doi: 10.1590/0074-02760150168

Financial support: CNPq (479559/2013-9), FAPERJ (E-26/ 110.803)

JO-F is recipient of a Research Productivity Fellowship from CNPq,

JS-R is recipient of a fellowship from IOC-FIOCRUZ.

+ Corresponding author: teresa.karti@gmail.com

Received 29 April 2015

Accepted 5 August 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br

as the pulsing events of a river discharge, has been proposed as the principal driving force of biota dynamics in river-floodplain systems (Junk et al. 1989). Therefore, in the Amazonian rivers and their tributaries, characteristics such as river order level and relation with flood pulsing, river width and watercourse sinuosity will determine the abundance and characteristics of the natural breeding habitats, the distribution of anopheline species and their densities, and will thus influence local malaria patterns of transmission.

In general, studies of anopheline larvae present difficulties related to the great diversity of larval habitats used by anopheline females, some of which are difficult to access (Rejmankova et al. 2013). Larval habitats of the major African malaria vectors within the *Anopheles gambiae* species complex, for example, are typically small, sunlit, temporary and with turbid waters. These larval habitats are typically created as a result of human or animal activities and they may be difficult to locate, especially during the wet season (Mutuku et al. 2006). However, within the Amazon Basin, some breeding habitats may be relatively large (Deane et al. 1948) and may present microhabitats. These large breeding habitats require specific tools to cover all potential breeding microhabitats within their water body in order to avoid biased sampling results.

In this paper, we propose a comprehensive classification of larval habitats and present a new methodology to investigate the natural breeding habitats of anopheline larvae in areas of low-order rivers in the Brazilian Amazon. We also included some preliminary results regarding the application of a new larval field methodology.

MATERIALS AND METHODS

Study area - We conducted a longitudinal study from January 2013-July 2014 in two remote Yanomami areas of Brazil, the communities of Parafuri (3°17'1.68"N 63°51'2.16"W, 440 m) and Toototobi (1°45'54.72"N 63°37'7.68"W, 128 m), which are located in western state of Roraima (RR) and northern AM, respectively (Fig. 1). Parafuri and Toototobi are communities composed of six and seven villages, respectively, and each village may comprise one big, circular, central open hut (called a *shabono*) or by smaller and separated huts. We selected four villages to study in each community based on malaria incidence and for logistical reasons. In Parafuri and Toototobi, systematic ground surveys were conducted at two-month intervals for 19 months; during each survey we performed anopheline collections for 15 consecutive days. The Yanomami are the major indigenous ethnic group living semi-isolated in an area of 192,000 km², spanning the northern Brazilian Amazon and adjacent areas of the southern of Venezuela (Fig. 1) (Pithan et al. 1991). The Parafuri and Toototobi communities occupy different ecological areas, with diverse geomorphologic, hydrologic and larval habitat dynamics and with different malaria vector species compositions and abundances. Parafuri is located in a submontane tropical rainforest ecoregion. The submontane ecoregion of RR is located exclusively inside the Yanomami reserve at 350-650 m in altitude, while Toototobi, which is lo-

cated 170 km south of Parafuri, lies in a lowland tropical rainforest ecoregion of Amazon with a maximum of 150 m in altitude (Rosa-Freitas et al. 2007).

Classification of anopheline breeding habitats - During fieldwork, we observed that there were many different types of breeding habitats for which there existed no classification that would fulfil our needs. Therefore, we classified the breeding habitats where we collected anopheline larvae based on three main environmental variables: seasonality (permanent or temporary), sun exposure (shadowed, partially or fully exposed to the sun) and association with low-order river flood pulses (larval habitats associated with large fluctuations in water river levels). All breeding habitats were georeferenced. During the dry season, ponds in small and medium sized forest streams of Toototobi were mapped and terrain data were acquired with a hand-held global positioning system (GPS) (GPSMAP 78 s, Garmin®, USA). We also mapped most forest streams in Toototobi, typically starting at the nearest point from each Yanomami hut, following the watercourse in both the upstream and downstream directions up to 1 km distance from the hut.

Methodology of sampling of anopheline larvae in natural breeding habitats in the Brazilian Amazon - In the two Yanomami communities, Parafuri and Toototobi, systematic mosquito collections were conducted in each of the eight villages (4 in Toototobi and 4 in Parafuri) and individuals were asked to note the location of known water bodies within a 1 km range of the village. An initial sketch was made of the location of each water body with respect to the village. Afterwards, all of the water bodies were located with the help of a Yanomami guide and mapped by GPS; almost all breeding habitats were surveyed and anopheline larvae were sampled.

We carried out a pilot study in September 2012 in both Yanomami areas with the following objectives: (i) to map all breeding habitats, (ii) to establish a local sampling strategy according to time constraints for each village, (iii) to test the new sampling larvae methodology for sampling larvae and refine possible pitfalls on-site and (iv) to obtain a preliminary idea of the composition of anopheline fauna around the eight Yanomami villages.

We observed that only some microhabitats inside the breeding habitat were suitable for anopheline immature stages to thrive and calculated the effective breeding area (EBA). The EBA was defined as the area in m² of a given breeding habitat that is suitable for the occurrence of immature stages of Neotropical anophelines. One EBA unit equals 1 m². To calculate the EBA and sample the different breeding habitats, we used a laser measurement tool (Laser Rangefinder Scout DX 1000 ARC, Bushnell®, USA) and a small inflatable boat (Atlantic 200, Nautika®, Brazil). The laser tool was able to accurately measure distances under dense canopy and under low light conditions. One limitation of this technique is that the laser tool cannot measure distances ≤ 5 m. Therefore, such short distances needed to be visually estimated, which may lead to some measurement inaccuracies. Thus, the EBA measurement technique may be less suitable for anopheline species that prefer to thrive in very small water bodies.

In the case of aquatic habitats with difficult access, where a part of the perimeter could not be tracked and measured either on foot or by boat, we used a trigonometric approach to calculate the total EBA of the perimeter (pEBA) (Fig. 2). pEBA of a larval habitat is the sum of all 1 m² along its shoreline. Basically, two distances on each extreme of the segment were calculated and we subsequently estimated the angle between both measurements with a half circle protractor marked in degrees.

The final distance of the unknown segment was calculated using equation 1.

$$D = \sqrt{A^2 + B^2 - 2AB\cos\alpha_1} \quad 1$$

In the case of circular-shaped breeding habitats, after measuring the diameter with the laser tool, we calculated the total perimeter EBA using equation 2.

$$\text{total perimeter EBA} = \pi \times \text{diameter} \quad 2$$

For large OX, we standardised accurate measurements by first measuring the perimeter only on the external side of the lake (typically the more accessible side, either by foot or by boat) and the width followed by an estimation of the internal perimeter of the water body. We used EBA measurement mainly due to time constraints and accessibility issues. EBA measurement was considered the most appropriate approach to calculate the total perimeter of a determined oxbow lake on the field within our timetable. Each oxbow lake was calculated following the same parameters in each survey. Equation 3 estimates the internal perimeters of OX.

$$B = 2B_1 + B_2 = 2C_1 + \pi \left(\frac{C_2}{\pi} - A \right) \quad 3$$

where B = total internal perimeter, B₁ = linear segments of internal perimeter, B₂ = curved segment of internal perimeter, C₁ = linear segment of external perimeter, C₂ = curved segment of external perimeter and A = width of the oxbow lake (Fig. 3).

If an oxbow lake presented a markedly irregular form, we applied the above approach but fragmented the external perimeter into fewer subunits, each consisting of two linear and one curved segments. Finally, for those OX that were nearly circular in shape, we simplified the previous equation considering that C₁ = 0, resulting in equation 4.

$$B = \pi \left(\frac{C_2}{\pi} - A \right) \quad 4$$

For breeding habitats where it was impossible to determine the EBA accurately, such as the massive flooded areas not associated with the river (FANAR) during the peak of the rainy season, we arbitrarily assigned a value of 500 m² EBA to allow for comparisons between areas and seasons. In the case of small forest streams (SFS) and medium forest streams (MFS), microhabitats suitable for anopheline larvae are not uniformly distributed along the water courses. In order to consider these types of water bodies in the total EBA (tEBA) quantification per village, we also arbitrarily allocated 500 m² EBA to those SFS and MFS that presented a substantial part of its course within a 1 km radius of the Yanomami village hut. For those forest streams that were shorter or situated

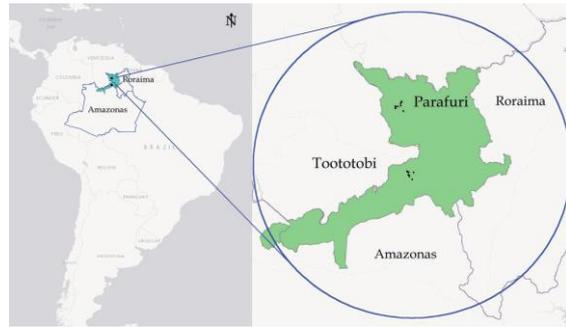


Fig. 1: Brazil, the states of Roraima and Amazonas, the Yanomami indigenous communities, Parafuri and Toototobi.

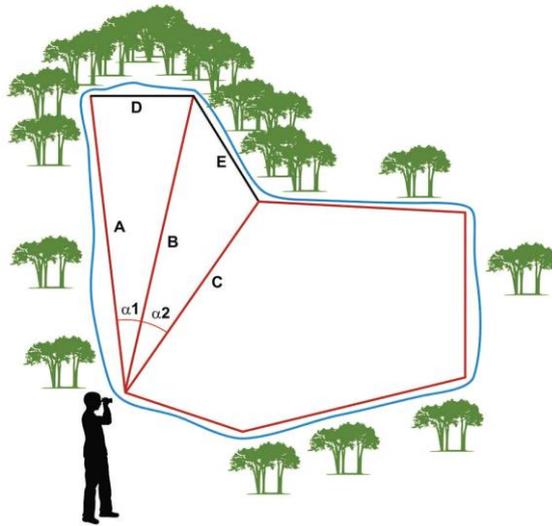


Fig. 2: effective breeding area measurement. Schematic approach of how was calculated difficult-to-walk-through breeding perimeter areas using a laser measurement tool. D is calculated from the measurement of A + B and angle alpha₁, while E is calculated from B + C and angle alpha₂.

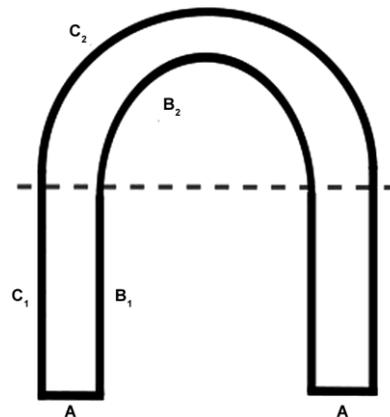


Fig. 3: schematic representation of the linear and curved segments of an oxbow lake used to calculate the total perimeter effective breeding area.

distant from the village hut, we allocated 250 m² EBA each. During the dry season, forest stream pools were accurately quantified if, when summed, they comprised less than 500 m² EBA, otherwise a maximum of 500 m² of EBA was also assigned.

Once the total pEBA was calculated per breeding site, we added 0%, 10%, 25% or 50% of additional EBA in respect to the pEBA depending on whether we found no (0%), low (10%), medium (25%) or high (50%) abundance of additional EBA other than the pEBA along the water body margins. These additional EBA subtypes could be patches of floating debris, clusters of submersed and emergent macrophytes or small terrain “islands” inside the water body that could create additional “internal” perimeter-like EBA in addition to those of the global perimeter of the water body shoreline. Adjusting for the additional EBA, we obtained the tEBA for each larval habitat. In the case of lakes associated with the river (LAR) where different subtypes of EBA were present, we quantified the EBA for each of the EBA subtypes. During our pilot study in September 2012, we detected high aggregation patterns of immature anopheline stages; some breeding sites were classified as positive if the majority of its tEBA was sampled. Therefore, we established a rule to try to sample the 50% of EBA for water bodies up to 200 m² tEBA. From the calculated tEBA, we determined the total number of dips. For example, if a larval habitat computed 110 m² of tEBA, we equally distributed 55 sampling points along the breeding site. For breeding sites larger than 200 EBA units in m² and for those whose size did not allow measurement, we established a maximum of 100 sampling points to cover as many possible different subtypes of EBA and water body surfaces. If different subtypes of EBA were present, we uniformly distributed sampling points in the different microhabitats (for example: 60 dippings in each EBA subtype). For sampling, we used a 350 mL, 13 cm diameter dipper (BioQuip, USA) and two dippings were conducted per EBA unit/m²/sampling point. The total number of larvae per stage for each dip was recorded and all immature stages were kept in small plastic tubes. The larvae were later transferred to tubes with 80% ethanol for morphological identification in the laboratory. Sampling based on tEBA was preferred to capturing by units of time since there was different accessibility among breeding habitats, which improved collection efficiency. The relative abundance of culicines and the total number of predatory macroinvertebrates were recorded, along with different environmental variables such as association with the river flood pulses, distance to the village huts, degree of sunlight exposure, presence of macrophytes and filamentous algae, water turbidity and movement. The following physicochemical variables were also evaluated: pH and temperature (pH meter AK95, AKSO®, Brazil), salinity, total dissolved salts and conductivity (conductivity meter AK50, AKSO®) and dissolved oxygen (dissolved oxygen meter AK84, AKSO®). We estimated the degree of sun exposure using three categories: shadowed (0-25%), partially sun-exposed (25-50% and 50-75%) and sun-exposed (75-100%) breeding habitats. In other words, sun-exposed breeding habitats had between 75% and 100% of their tEBA exposed to

the sun during sunlight hours. Shadowed breeding sites were typically under dense canopy and almost no sunlight reached their water surface during the day. During each survey, all breeding habitats were photographed and identified with a unique code and EBA subtypes that could be present were highlighted.

We conducted exploratory samplings in all of the three low-order rivers, including the Toototobi River in the Toototobi area and the Inajá and Parima Rivers in the mountainous area of Parafuri. River samplings were conducted up to 1 km down and upstream from each Yanomami village in Parafuri and Toototobi. We looked for typical river anopheline microhabitats such as riverbed sunlight pools, slow-flowing edges of the river with emergent, submersed vegetation or filamentous algae and microdams. Microdams are considered primary oviposition sites along rivers and have been defined as points of natural blocking of the river/stream current typically by a fallen stump or bamboo clumps with dense root systems that impede water flow and favour the accumulation of floating debris, allowing anopheline larvae to thrive (Manguin et al. 1996, Barros et al. 2011, Rejmankova et al. 2013). For small and MFS, we conducted our sampling in the areas in which we were most likely to find anopheline immature stages, such as slow-flowing margins with emergent vegetation, clusters of floating debris and other microhabitats of filamentous algae and submersed macrophytes in those few spots in the dense forest where sunlight had access to the water body surface.

RESULTS

Classification of anopheline natural breeding habitats in low-order rivers of the Brazilian Amazon - Breeding habitats were categorised into seven types: LAR, which are subdivided in OX and non-OX (NOX), flooded areas associated with the river (FAAR), flooded areas not associated with the river (FANAR), rainfall pools (RP), SFS, MFS and rivers (RIV) (Fig. 4).

A detailed description of the classified breeding habitats follows:

LAR - All anopheline breeding habitats located in the river floodplain were directly associated with river levels fluctuations. This is because breeding habitats get flooded when rivers overflow their banks; when flooding water recedes, stagnant water remains in these habitats (Drago et al. 2008). LAR may undergo variable isolation phases during rainy and dry seasons, which fluctuate in time between each flood pulse event. During the isolation phase, other sources of water, such as smaller forest streams draining into the lake, groundwater and rainfall, may maintain the lake. However, evaporation forces tend to diminish the lake water volume (Lesack & Melack 1995). According to the shape, geomorphologic origin and abundance, LAR can be further separated into OX and NOX lakes.

OX - OX are LAR formed by old river paths and may have a U-shaped form. U-shaped LAR were formed from the isolation of a river meander through erosion and sedimentation forces along the river edges (Esteves 1998). OX sizes vary considerably depending on the old river path that was isolated from the active river canal.

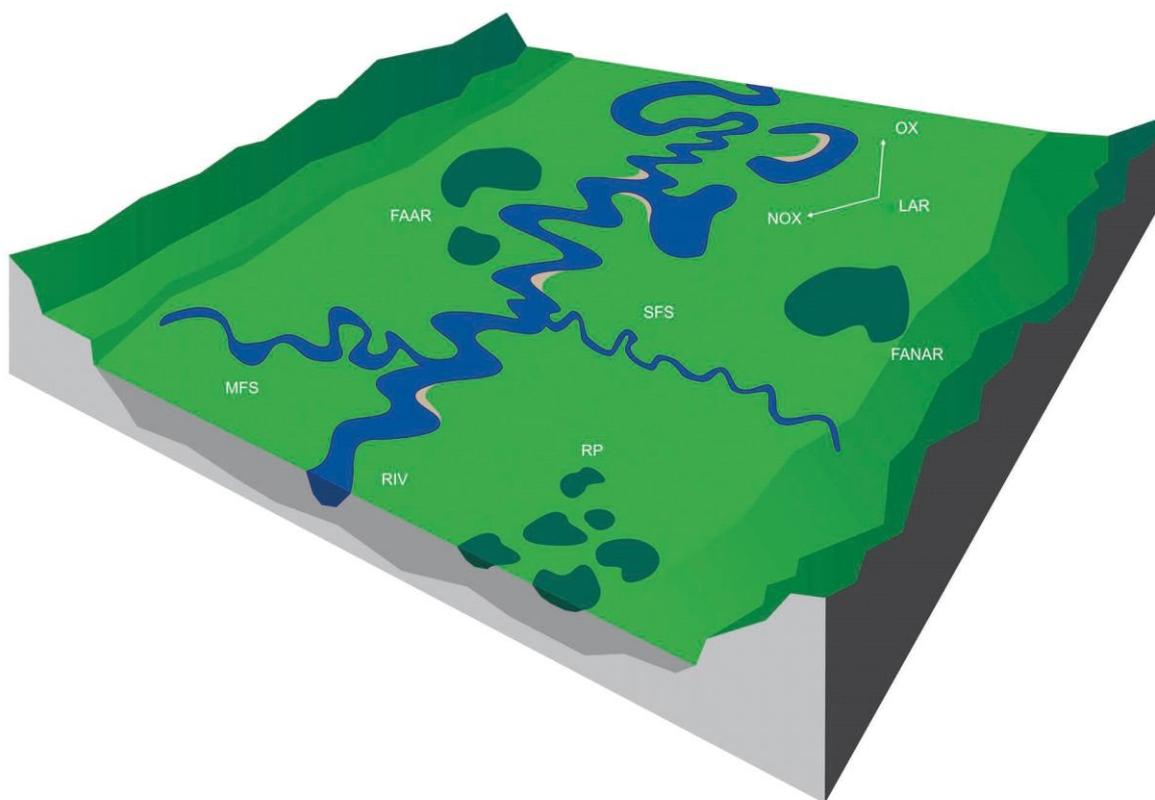


Fig. 4: classification of the different anophelines breeding habitats and their association with low-order rivers found in the Yanomami area, Brazilian Amazon. FAAR: flooded areas associated with the river; FANAR: flooded areas not associated with the river; LAR: lakes associated with the river; MFS: medium forest streams; NOX: nonoxbow lakes; OX: oxbow lakes; RIV: rivers; RP: rainfall pools; SFS: small forest streams.

The 17 OX sampled during January 2013-July 2014 were permanent even during the driest months of the year and were mostly partial or well exposed to the sun. Two LANDSAT images illustrate different segments of the Parima River that cross the Parafuri Yanomami area. Makabey village is located along a segment of the river that is more meandering and thus presented a considerable number of OX, while Xaruna village is located upstream along a river segment that did not present any U-shaped LAR near the village (Fig. 5).

NOX lakes - NOX lakes are non-U-shaped LAR permanent aquatic habitats and are typically partially or well exposed to the sun. NOX were generally smaller than OX. We classified small bodies of water $\leq 200 \text{ m}^2$ as NOX based on water permanence and the association with river fluctuations. NOX lakes are not derived from the old river path and thus lack a clear U-shaped form. NOX lakes may be more important in regions of larger rivers where typical U-shaped LARs are less commonly found (Junk 2005). LAR are likely to play a major role in the local malaria transmission patterns, as LAR are important breeding habitats for some of the main Amazonian malaria vectors.

FAAR - FAAR are temporary breeding habitats where the main source of water comes from the river flood

pulses. FAAR may have highly variable sizes and different levels of exposure to the sun. River flooding occurs frequently during the rainy season, though a few unpredictable flood pulses that lead to short floodplain inundations may also occur during the dry season months in low-order river systems (Junk et al. 2011). FAAR are a common type of breeding habitat found in Parafuri and Toototobi and because of their variable sun exposure characteristics, FAAR seasonally amplify a wide range of different anopheline species. As in the case of LAR, the place where the river feeds each of the identified FAAR was identified. As FAAR remain dry for many months, we did not find submersed macrophytes in these water bodies, but in cases where there was plentiful sun exposure, filamentous algae proliferated.

FANAR - FANAR are typically shadowed water bodies that are far and disconnected from the rivers. The origin of FANAR is related to increased rainfall during the wettest months of the year. FANAR sizes varied from vast areas in the peak of the rainy season to mostly dried spots during the driest months of the year. Most FANAR in the Yanomami area were seasonal and did not present submersed macrophytes or filamentous algae. Anopheline species that prefer fully shadowed breeding habitats are expected to predominate in FANAR.

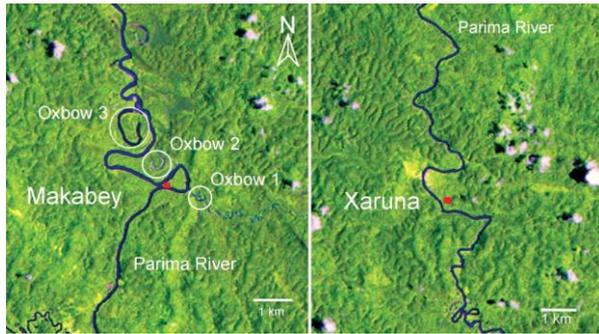


Fig. 5: Makabey and Xaruna villages along the Parima River in Parafuri community Yanomami indigenous area, Brazilian Amazon [LANDSAT images (MCTI 2011)]. Location of oxbow 1 and 2 of Makabey village where anopheline larvae were detected. Oxbow 1 corresponds to a U-shaped lake associated with the river that is fully connected to a small tributary of the Parima River, while oxbow 2 was an old Parima River path well disconnected from the actual river course and with very high abundance of emergent and submersed macrophytes. Only extreme flood pulses from Parima River will feed the oxbow 2. Oxbow 3 was not sampled, as it was located more than 1 km from the Yanomami huts. Within 1 km radius of Xaruna no oxbow lake was found since the Parima River is less meandering.

RP - *RP* are temporary breeding habitats occurring in shallow, well-defined and typically small depressions in the forest soil that depend on rainfall to be filled. *RP* presented some similarities with *FANAR* as they are not associated with river flood pulses and are typically shadowed. However, *RP* are more ephemeral breeding sites than *FANAR*. In the Yanomami area *RP* were found to be located inside the preserved forest. *RP* exposed to the sun were also found after deforestation due to crop growing near the Yanomami huts. Like *FANAR*, anopheline species that prefer shadowed breeding habitats are expected to prevail in *RP*.

SFS - *SFS* are forest stream breeding habitats of ≤ 5 m of width that are typically shadowed. They are present in drained forested areas near the closest river or a bigger forest stream. Many *SFS* interconnect with other types of breeding habitats. For example, a distant *FANAR* may be connected through an *SFS* to an *FAAR* that receives water directly from the river flood pulses. Most *SFS* dry out towards the middle of the dry season. *SFS* tend to gradually change into ponds earlier during the dry season, potentially increasing anopheline densities of certain species during this period.

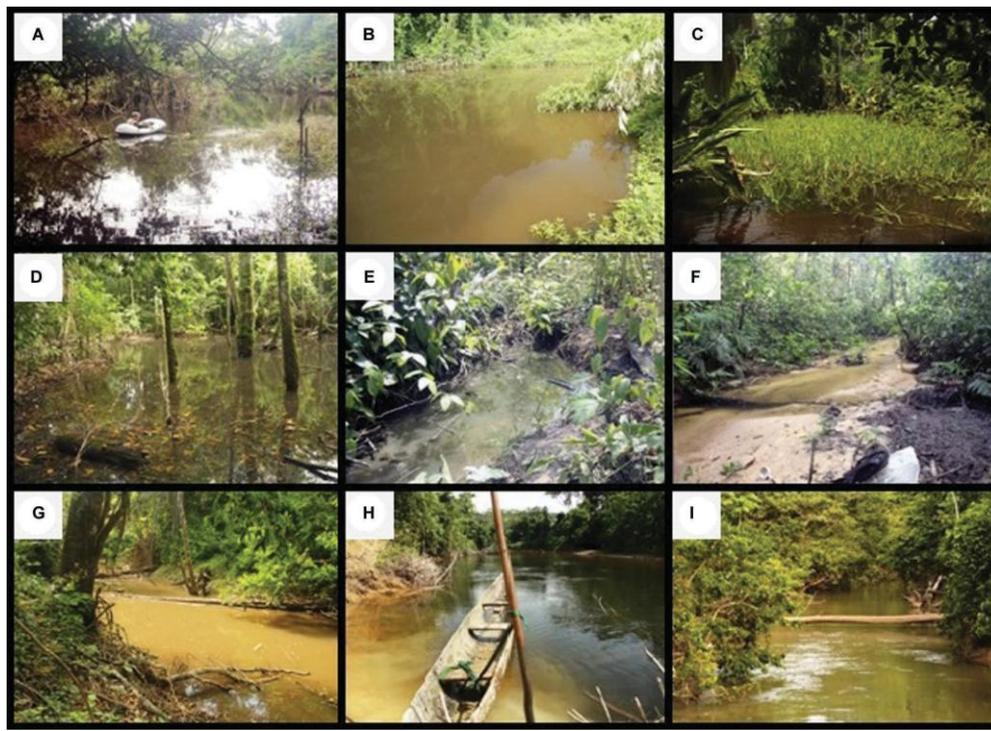


Fig. 6: natural anopheline breeding habitats in the Brazilian Amazon. A: U-shaped lakes associated with the river (LAR) or oxbow lake. Many *Anopheles darlingi* larvae were collected from submersed macrophytes-effective breeding area (EBA) using the small inflatable boat, a spot otherwise inaccessible on foot near Komomassipe village, Parafuri; B: non-U-shaped LAR with circular shape. As many oxbow lakes, they are permanent and well exposed to the sun; C: flooded area associated with the river, shallow and temporal breeding habitat. In this case, well exposed to the sun and with abundant additional emergent vegetation-EBA. This breeding site would correspond to the type that we would increase by 25% the EBA of the perimeter to obtain the total EBA. *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles triannulatus* s.s. and *Anopheles oswaldoi*.l. were retrieved in high numbers from this site; D: flooded area not associated with the river, fully shadowed breeding site. A potential larval habitat for *An. oswaldoi* s.l., *Anopheles intermedius*/*Anopheles guarao*-like and *Anopheles costai*-like, Apiahik village, Toototobi; E: rainfall pools, very ephemeral larval habitat, these ones were exposed to sun after forest clearance for crop cultivation and yielded many *An. darlingi* larvae, Komomassipe area; F, G: example of small (< 5 m wide) and medium (5-10 m wide) forest streams, respectively; H, I: medium-sized Inaja River in the hilly Parafuri area and Toototobi River, respectively. No *Anopheles* larvae were retrieved from these low-order rivers.

MFS - MFS are forest stream breeding habitats of 5-10 m in width that are almost always shadowed. They are present in drained forested areas near the closest river. In the submontane rainforest area of Parafuri, most forest streams, independent of their size, had a current flow, even during the driest months of the year. MFS form ponds more frequently through the mid-end of the dry season. Depending on the water flow and the amount of ponds formed by MFS, different anopheline species will be favoured.

RIV - All rivers located in the Yanomami study area can be classified as low-order rivers (Junk et al. 2011). We further subdivided low-order rivers into small (5-15 m width), medium (15-100 m width) and large rivers (≥ 100 m width). Sizes and widths of LAR, especially for the OX, follow RIV sizes. Characteristics of large Amazon rivers differ from smaller rivers, which affects the dynamics of potential associated natural breeding sites for *Anopheles*. We present an example of each type of breeding site surveyed in Fig. 6.

Anopheline natural breeding habitat classification in the Yanomami area studied - During the 19 month longitudinal study in the Brazilian Yanomami area, 112 breeding sites were located, classified and sampled whenever water was present. The number of each breeding habitat type encountered in the two communities was compiled in the Table. We sampled 30 FANAR (26.8% of the total larval habitats), constituting the most abundant type of water body. The second most abundant larval habitat was LAR and we included in our study 27 of this type, which represented 24.1% of all larval habitats surveyed. Among the studied LAR, 17 LAR (63% of all LAR) were LAR-OX and 10 (37%) were LAR-NOX. The submontane area of Parafuri presented more LAR of both types (17 out of 27) than the lowland rainforest region of Toototobi (10 out of 27), with a remarkably higher number of NOX lakes (8 out of 10). However, in the Toototobi area, we encountered approximately double the amount of seasonal flooded areas than in Parafuri;

both were associated with river flood pulses (FAAR - 11 out of 16) and were not associated with river fluctuations (FANAR - 20 out of 30). MFS prevalence was similar in both areas, but SFS were more predominant in Parafuri (11 out of 16), draining the numerous hills of the region to the closest river. The less common breeding site type was the ephemeral RP, which were only encountered on one occasion in Toototobi and twice in Parafuri.

Larval habitat characteristics - Some larval habitats showed variable characteristics. A summary of the main features for the breeding habitats is presented in the Table. We considered the association with river flood pulses, seasonality and sun exposure as the three key variables to classify the larval habitats with a frequency scale of 0 (absent), 1 (low), 2 (medium) and 3 (high). For example, sun exposure classified as 0-3 for OX means that we encountered some LAR-OX that were fully shadowed while others were well exposed to the sun. When looking at water permanence in breeding habitats, all LAR were always classified as permanent (3). FAAR and RP always dried up for some months of the year (0) and some breeding habitats such as FANAR, MFS and SFS presented variability in this characteristic (0-1). For instance, of the 30 FANAR included in the study, only four (13.3%) had water in all the surveys and were considered permanent inland water bodies. Finally, the two types of LAR and all FAAR (3) were mainly formed because of the influence of river flood pulses, whereas FANAR and RP originated from rainfall waters (0). Forest streams, SFS and MFS experienced a variable influx of water from the river at high river water levels (1).

Anopheline larvae collections, preliminary data - We collected 6,295 anopheline immature stages, including species such as *An. darlingi*, *Anopheles oswaldoi* s.l., *An. triannulatus* s.s., *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles intermedius*/*Anopheles guarao*-like and *Anopheles costai*-like. Anopheline larvae were more abundant in certain breeding habitats, as we retrieved 3,777 anophelines in LAR (of which 3,342 were obtained from U-

TABLE

Breeding habitats types and their main characteristics in the Yanomami Indian Reserve, Brazilian Amazon Region

Breeding habitat type	Associated to flood pulse	Permanent	Sun exposure	Submerse macrophytes	Emergent vegetation	Filamentous algae	Current water
LAR-OX (n = 17)	3	3	0-3	0-3	2	0-3	0
LAR-NOX (n = 10)	3	3	0-3	0-3	2	0-3	0
FAAR (n = 16)	3	0	0-3	0	2	0-3	0
FANAR (n = 30)	0	0-1	0-1	0	0-1	0	0
RP (n = 3)	0	0	0-1	0	0-1	0-1	0
SFS (n = 16)	1	0-1	0-1	0-1	1	0-1	2
MFS (n = 15)	1	0-1	0-1	0-1	1	0-1	1
RIV (n = 5)	3	3	2	0	1	0	3

larval habitat characteristics were described as absent (0), low (1), medium (2) and high (3) [total number of breeding habitats in Parafuri and Toototobi (n)]. FAAR: flooded areas associated with the river; FANAR: flooded areas not associated with the river; LAR-NOX: lakes associated with the river-non-oxbow lakes; LAR-OX: LAR-oxbow lakes; MFS: medium forest streams; RIV: rivers; RP: rainfall pools; SFS: small forest streams.

shaped LAR), representing 60% of all larvae captured. Therefore, LAR and especially OX constituted a major breeding habitat for some of the anopheline species collected. For example, 1,356 (96.93%) *An. darlingi* and 133 (92.46%) *An. triannulatus* s.s. were collected in LAR.

Larvae sampling methodology for anopheline natural breeding habitats in the Brazilian Amazon - The use of a small, portable and light inflatable boat allowed us to conduct a stratified sampling covering most EBA subtypes of every LAR surveyed. The reduced size of the boat allowed us great flexibility to navigate the very shallow waters (as shallow as 25 cm in depth) and reach almost every corner of interest inside of a LAR. The pEBA encountered in the lake margins were sampled either on foot or by boat. Apart from enhanced accessibility, this device conferred excellent tested safety against life-threatening hazards that may inhabit LAR, such as the Amazonian electric eel (*Electrophorus electricus*). Plastic boats confer excellent isolation from their electrical shocks. Sampling EBA distant from the LAR shoreline without properly using this device is not recommended. When a LAR was sampled for the first time when lake levels were very low or when water was semi-turbid or turbid, careful navigation was performed and internal navigation routes for each LAR and condition were traced. These approaches allowed us to reach most EBA subtypes within the lake and minimise boat punctures by submersed sticks. Two people, each in one boat, can collect simultaneously from the same LAR, increasing the security of the team. The use of regular metal boats or traditional indigenous wood canoes may be impractical in most LAR, especially those that are not fully and continuously connected to the river. Using this method, we saved time and the need for substantial human resources to move a heavy regular boat across the jungle, which in most cases would make larvae sampling impossible.

Heterogeneity of EBA availability at a microscale level - The tEBA per breeding site type in each of the eight Yanomami villages included in the study is reported in Fig. 7. The data shown is from September 2013 fieldwork for Toototobi and from July 2013 for Parafuri, which corresponds approximately to the transitional period of the wet-to-dry season for both areas. During this period, larval habitat sizes tend to have already stabilised and most seasonal larval habitats contain water. Therefore, flooded forest areas of some larval habitats associated with the river and vast FANAR areas that are impossible to quantify during the rainy season were not encountered. We showed EBA data for Parafuri from previous field work because Parafuri anticipated the beginning of the dry season compared to Toototobi. Indeed, some aquatic sites of Parafuri during the collection of September 2013 were already dry and others presented a significantly retracted maximum EBA (especially for FANAR larval habitat type).

A marked heterogeneity of EBA availability for anopheline proliferation was encountered between both Yanomami areas and even within very close Yanomami huts of the same region. For example, while U-shaped LAR EBA was relatively abundant in communities such

as Apihik and Mahaxipoha, both in Toototobi, and Komomassipe, Warareu and Makabey located in Parafuri, U-shaped LAR EBA was not present in Xaruna (Parafuri) and Koiopi (Toototobi). However, within 1 km of the dwellings, these last two communities presented EBA available from larval habitats such as forest streams and FANAR. This variability on EBA-type occurrence will greatly influence the anopheline repertory that will predominate in the proximities of certain Yanomami communities. For example, forest-loving mosquitoes such as *An. oswaldoi* s.l., *An. intermedius*/*An. guarao*-like and *An. costai*-like were predominant in Xaruna and Koiopi.

DISCUSSION

Malaria epidemiology in relatively undisturbed areas of the Amazon Region may vary considerably between regions, depending on if they are located in areas of low or higher-order rivers and the nature of breeding sites associated to the river floodplain system. This will determine to a great extent which Neotropical malaria vectors will occur and at what densities. All rivers in our study area were low-order rivers, which are subject to short, polymodal and generally unpredictable flood pulses. These flood pulses may also occur during the drier months of the year, overflowing again the larval habitats associated with rivers during this period. This type of wetland dynamic is associated with low-order rivers between first-fifth stream order and depends to a great extent on the intensity of local rainstorms (Junk et al. 2011). Large Amazonian rivers and their floodplains are influenced by long-lasting, monomodal and predictable flood pulses (Junk et al. 2014). This flood pulse pattern is encountered along the Amazon River and its major tributaries (rivers of more than 5th stream order) (Junk et al. 2011).

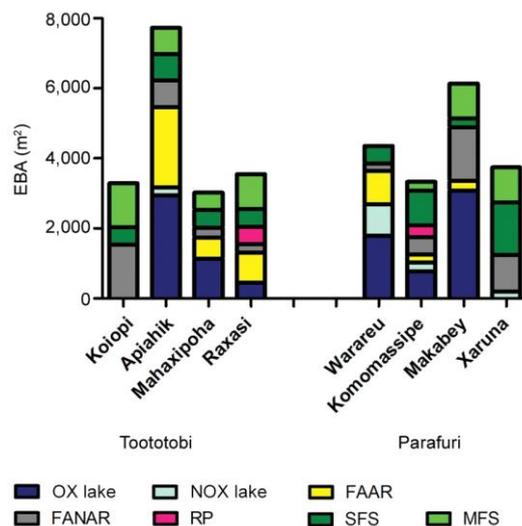


Fig. 7: effective breeding area (EBA) per larval habitat type in each of the Yanomami villages surveyed in September and July 2013 for Toototobi and Parafuri communities, respectively. FAAR: flooded areas associated with the river; FANAR: flooded areas not associated with the river; MFS: medium forest streams; NOX: nonoxbow lakes; OX: oxbow lakes; RP: rainfall pools; SFS: small forest streams.

There have been various classifications of larval habitats that have been used for many mosquito species (Silver 2008). Few comprehensive attempts to classify breeding sites of Neotropical anophelines have been proposed. In one proposal, larval habitats for *Anopheles albimanus* were classified in 16 clusters or habitat types and were strictly defined according to dominant botanical and limnological characteristics. The authors also ranked these 16 habitat types based on larval densities (Rejmankova et al. 1992). In their review, Sinka et al. (2010) provided a list of studies that reported the occurrence of the main Neotropical malaria vectors in some of the most commonly defined larval habitats. They were classified as large and small water bodies and as either natural or man-made. Lagoons, lakes, marshes, bogs and slow flowing rivers were considered the main large natural breeding sites, while small streams, seepage springs, pools, wells and dips in the ground were found as the most common small natural breeding sites for Neotropical anophelines. LAR would include some previously reported permanent water bodies such as lagoons and lakes.

In our study, we introduced the concept of LAR for malaria ecology, which combines the two types of larval habitats (OX and NOX lakes) that may have the most influence on malaria transmission in unaltered areas of the Amazon Basin, such as many of the indigenous areas located within low-order river systems. OX are the most frequent type of lake in the Brazilian territory, especially in the Pantanal wetlands and Amazon Basin, where a flat landscape and numerous meandering rivers favours the formation of many of these lakes (Esteves 1998). More meandering rivers tend to form more OX and thus areas with these characteristics may be more prone to become breeding habitats for *An. darlingi*, leading to malaria transmission landscapes. Different levels of hydrological connectivity propitiate colonisation by different species of macrophytes, different composition and water heaviness (Junk 2005), thus converting some LAR to a suitable breeding place for certain species of *Anopheles*. In addition, anopheline-washing episodes will be more frequent in fully connected LAR than in those that are more disconnected.

In a study carried out in the Solomon Islands, Belkin (1954) introduced the term “effective breeding surface” or “effective breeding site” to define those areas within a larval habitat suitable for anopheline breeding. Areas of open and deep standing water and water habitats with open flowing water were considered not effective breeding surfaces. In a posterior study, the “effective breeding area” in an irrigated pastureland was stratified into different microenvironments and, according to their contribution to the total breeding area, a proportional number of dips from each microenvironment were taken (Silver 2008). We used the term EBA to define those water surface areas that were productive for the different anopheline species encountered in our study areas. We refined the use of this concept by accurately quantifying the EBA of the different larval habitats with the use of a fine-scale precision and easy-to-use laser rangefinder.

With our classification, we propose a comprehensive nomenclature that attempts to simplify different denominations of natural breeding sites for low-order river sys-

tems of the Amazon. The main characteristics that we used for our classification were association to river flood pulses, seasonality and degree of sun exposure. We found that these were the best parameters to help us explain the occurrence of density hotspots of certain anopheline species and to characterise how they are dispersed during the dry and wet seasons (J Sánchez-Ribas et al., unpublished observations). Immature stage habitats were also previously classified, including water permanence (permanent, semi-permanent and temporary) and sun exposure (sunlight, partial shade and complete shade) as some of the main classification criteria (Almirón & Brewer 1996). In a larval survey in West Virginia, 15 larval types were described and mainly classified by their exposure to the sun. Habitats within the sunlit category had water surface and thus had immature mosquito stages exposed to sunlight during most daylight hours. Larval habitats located inside forests protected from direct sunlight were classified as shaded (Joy & Clay 2002).

Manguin et al. (1996) reported the use of an inflatable raft to sample microdams along the margins of the Sibun River in Belize. In our study area, the use of a smaller inflatable device was key to thoroughly sample the main breeding habitats of *An. darlingi* in our study area, the LAR. Otherwise, important anopheline microhabitats a few meters from the lake shoreline, such as submersed macrophytes EBA and floating debris exposed to the sun, would not have been accessible by foot, resulting in potential information bias regarding anopheline occurrence, larval habitat preferences and population densities.

The flight range of different anopheline species may vary, although it has been considered that the maximum distance that anophelines may flight is up to 2 km.

However, it is believed that most of the flights occur at shorter distances in the 0-2 km distance range (Service 1997). According to previous reports in the literature for the flight range of Neotropical malaria vectors, we determined to collect sample from larval habitats in a range of 1 km from the Yanomami huts. This distance was considered epidemiologically relevant with a potential influence on the intra, peri and immediate extra-domiciliary transmission environments of each village. However,

few studies have reported consistent data on dispersal dynamics of Neotropical anophelines. In a mark-release-recapture experiment, Charlwood and Alecrim (1989) reported most recaptures to be up to 1 km away, although a couple of *An. darlingi* were recaptured 7.2 km away from the release point. It was also noted that other Amazonian vectors such as *Anopheles strodei*, *An. triannulatus* or *An. oswaldoi* may have a more limited flight range. Achee et al. (2005) also performed a mark-release-recapture study in which they confirmed that the recapture rate for *An. darlingi* was greatest at 0 m (29%; 124/428) and decreased by 11.6% (37/318) and 5.8% (21/361) at the 400 m and 800 m recapture sites, respectively.

Disease transmission and vector ecology studies have consistently used tools such as remote sensing (RS) and Geographic Information Systems, greatly facilitating the ability to analyse relationships of vectors and diseases over time and space (Rejmankova et al. 2013). However, within the quite homogeneous landscape of undisturbed

areas of the Amazon rainforest, RS may be particularly difficult to perform in areas associated with low-order river systems. For example, high-resolution satellite imagery (i.e., IKONOS images) does not exist for most of the Brazilian Yanomami area and many small FAAR and LAR, and all habitats that are under the dense canopy may be undetected on the freely available satellite images (LANDSAT images) and thus it is impossible to precisely locate and measure EBA and habitat size fluctuations. On-site accurate measurement of water bodies with this new field laser measurement approach may be the only feasible way to quantify the EBA dynamics of the different larval habitats in these remote areas of the Amazon.

Concluding remarks - We have proposed an easy-to-use and accurate methodology for quantifying the EBA dynamics of the main larval habitats of some key malaria vectors of the Brazilian Amazon. We believe that our classification of natural larval habitats and the new larval sampling methodology will contribute to the understanding of the influence of breeding habitat types on anopheline species-specific production and malaria transmission seasonality in low-order river systems of the Amazon. OX had enormous epidemiological relevance in our study areas, as important Amazon vectors such as *An. darlingi*, *An. triannulatus* s.s. and *An. oswaldoi* s.l. thrived in abundance within their domains. We recognise that this larvae methodology is especially suitable for some Neotropical malaria vectors, as they may breed in considerable large, spatially fixed and size variable breeding habitats. However, we also foresee applicability of the larvae methodology to accurately determine the EBA dynamics for larval habitats of other dominant malaria vectors that exploit relatively large and size-variable aquatic habitats. The larvae sampling methodology may also assist in the planning of effective control measures directed at the immature mosquito stages by precisely quantifying the tEBA (and EBA subtypes) that must be targeted during time-limited larval source management activities. Finally, with the reviewed larval habitat nomenclature, we attempted to simplify and standardise the classification of natural breeding sites in low-order river systems of the Amazon Basin.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Yanomami people that allowed us to work in their villages and vicinities and extensively helped us in many ways during our fieldwork, to the SESAI and the DSEI-Y and their employees, for logistic support and help in the fieldwork, to the IOC-Fiocruz, for overall support, to Dr Maria Anice Salum, for assistance on the identification of immature anopheline stages, and to Leônidas Leite Santos, for the graphic layout of the Fig. 4.

REFERENCES

- Achee NL, Grieco JP, Andre RG, Rejmankova E, Roberts DR 2005. A mark-release-recapture study using a novel portable hut design to define the flight behavior of *Anopheles darlingi* in Belize, Central America. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 366-379.
- Almirón WR, Brewer ME 1996. Classification of immature stage habitats of Culicidae (Diptera) collected in Córdoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 1-9.
- Barros FS, Arruda ME, Gurgel HC, Honorio NA 2011. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bull Entomol Res* 101: 643-658.
- Belkin JN 1954. Simple larval and adult mosquito indexes for routine mosquito control operations. *Mosq News* 14: 127-131.
- Charlwood JD, Alecrim WA 1989. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Ann Trop Med Parasitol* 83: 569-576.
- de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFS, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT 2014. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 618-633.
- Deane LM 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl. II): 5-14.
- Deane LM, Causey OR, Deane MP 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 1: 827-966.
- Drago E, Paira A, Wantsen K 2008. Channel-floodplain geomorphology and connectivity of the Lower Paraguay hydrosystem. *Ecology Hydrology* 8: 31-48.
- Esteves FA 1998. A gênese dos ecossistemas lacustres. In FA Esteves (ed.), *Fundamentos de limnologia*, 2nd ed., Interciência, Rio de Janeiro, p. 84-103.
- Joy J, Clay J 2002. Habitat use by larval mosquitoes in West Virginia. *Am Midl Nat* 148: 363-375.
- Junk W 2005. Flood pulsing and the linkages between terrestrial, aquatic and wetland systems. *Verh Int Ver Theor Angew Limnol* 29: 11-38.
- Junk W, Bayley PB, Sparks RE 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In DP Dodge (ed.), *Proceedings of the International Large River Symposium*. *Can Spec Publ Fish Aquat Sci* 106: 110-127.
- Junk W, Fernandez M, Schongärt J, Cohn-Haft M, Adeney J, Wittmann M 2011. A classification of major naturally-occurring Amazonian lowland wetlands. *Wetlands* 31: 623-640.
- Junk W, Piedade M, Lourival R, Wittmann F, Kandus P, Lacerda L, Bozelli R, Esteves F, da Cunha CN, Maltchik L, Schongärt J, Schaeffer-Novelli Y, Agostinho A 2014. Brazilian wetlands: their definition, delineation and classification for research, sustainable management and protection. *Aquat Conserv* 24: 5-22.
- Junk W, Piedade M, Schongärt J, Wittmann F 2012. A classification of major natural habitats of Amazonian white-water river floodplains (*várzeas*). *Wetl Ecol Manag* 20: 461-475.
- Lesack L, Melack J 1995. Flooding hydrology and mixture dynamics of lake water derived from multiple sources in an Amazon floodplain lake. *Water Resour Res* 31: 329-345.
- Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Rejmankova E, Hakre S 1996. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol* 33: 205-211.
- MCTI - Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação 2011. Projeto PRODES. LANDSAT images. Available from: obt.inpe.br/prodes/index.php.
- Mormul R, Thomaz S, Vieira L 2013. Richness and composition of macrophyte assemblages in four Amazonian lakes. *Acta Sci Biol* 35: 343-350.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2013. *Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011, Boletim epidemiológico nº 44*, MS/SVS, Brasília, 16 pp.

- Mutuku FM, Bayoh MN, Gimnig JE, Vulule JM, Kamau L, Walker ED, Kabiru E, Hawley WA 2006. Pupal habitat productivity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a rural village in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 74: 54-61.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Taui PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
- Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, Pessoa FAC, Oliveira GA, Campos KMM, Villegas LM, Rodrigues NB, Nacif-Pimenta R, Simões RC, Monteiro WM, Amino R, Traub-Cseko YM, Lima JBP, Barbosa MG, Lacerda MVG, Tadei WP, Secundino NFC 2015. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 23-47.
- Pithan OA, Confalonieri UE, Morgado AF 1991. The health status of Yanomami Indians: diagnosis from the Casa do Índio, Boa Vista, Roraima, 1987-1989. *Cad Saude Publica* 7: 563-580.
- Rejmankova E, Grieco J, Achee N, Roberts DR 2013. Ecology of larval habitats. In S Manguin (ed.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*, 9th ed., InTech, Rijeka, p. 397-446.
- Rejmankova E, Savage H, Rodriguez M, Roberts D, Rejmanek M 1992. Aquatic vegetation as a basis for classification of *Anopheles albimanus* Weideman (Diptera: Culicidae) larval habitats. *Environ Entomol* 21: 598-603.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 651-655.
- Rosa-Freitas MG, Tsouris P, Peterson AT, Honório NA, de Barros FSM, de Aguiar DB, Gurgel HC, de Arruda ME, Vasconcelos SD, Luitgards-Moura JF 2007. An ecoregional classification for the state of Roraima, Brazil: the importance of landscape in malaria biology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 349-357.
- Service MW 1997. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal - the long and short of it. *J Med Entomol* 34: 579-588.
- Silver J 2008. Sampling the larval population. In JB Silver (ed.), *Mosquito ecology: field sampling methods*, Chapter 3, Springer, Dordrecht, p. 137-310.
- Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precursors. *Parasit Vectors* 3: 72.
- Strahler A 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions American Geophysical Union* 38: 913-920.