

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**PESQUISA DE *PLASMODIUM SP* EM
CALLITHRIX JACCHUS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

LAÍS DARIO BELAZ DA SILVA

BOTUCATU, SP

Abril, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**PESQUISA DE *PLASMODIUM SP* EM
CALLITHRIX JACCHUS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

LAÍS DARIO BELAZ DA SILVA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professora Titular Jane Megid
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP/Botucatu, SP
Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e
Segurança Alimentar

BOTUCATU, SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Lais Dario Belaz.

Pesquisa de *Plasmodium sp* em *Callithrix jacchus* no
nordeste brasileiro / Lais Dario Belaz Silva. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Jane Megid

Coorientador: Julio Benavides Tala

Coorientador: Mateus Mioni

Capes: 50502000

1. Plasmodium. 2. Malária. 3. *Callithrix*. 4. Reação em
Cadeia da Polimerase.

Palavras-chave: *Callithrix jacchus*; Malária; Nested PCR;
Plasmodium.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família que tornou tudo possível.

Ao Guilherme, pelo apoio incondicional nessa jornada de cooperativa.

*Aos amigos e colegas que me acompanharam em todo trajeto desde a
graduação e são meus exemplos para a vida.*

*À Professora Jane, inspiração como profissional e pessoal, que me
orienta e me ensina em todas as etapas.*

*Aos colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular do
Departamento de Saúde Pública e Higiene Veterinária -
UNESP/Botucatu pelo excelente trabalho, colaboração e
ensinamentos.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -
Código de Financiamento 001.*

SUMARIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Ecologia do sagüi de tufo branco (<i>Callithrix jacchus</i>)	4
2.2 Malária	5
2.3 Malária símia.....	12
2.4 Malária e os sagüis de tufo branco.....	13
3 OBJETIVOS.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 Comissão de Ética	14
4.2 Coletas das Amostras	14
4.3 Extração do DNA	15
4.4 Reação em cadeia da Polimerase	16
5 RESULTADOS	17
6 DISCUSSÃO	17
7 CONCLUSÕES.....	19
8 REFERENCIAS.....	20
9 ANEXOS.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS *

CENP – Centro Nacional de Primatas

CEVS – Centro Estadual de Vigilância em Saúde

CISS – Centro de Informações em Saúde Silvestre

DNA – Deoxyribonucleic Acid - ácido desoxirribonucleico

IUCN – International Union for Conservation of Nature's - União Internacional para a Conservação da Natureza

MS – Ministério da Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction – reação da cadeia da polimerase

PNHs – primatas não humanos

SESAB – Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

TDRs – técnicas de diagnóstico rápido

WHO – World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, determinadas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SILVA, L.D.B. **PESQUISA DE *Plasmodium SP* EM *Callithrix jacchus* NO NORDESTE BRASILEIRO**. Botucatu, 2023. 31p.

Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

A malária é a protozoose de maior impacto no mundo e distribui-se por extensas regiões tropicais e subtropicais, sobretudo nas nações em desenvolvimento e subdesenvolvidas. O Brasil é o país que concentra o maior número de casos no continente americano. Os primatas da família Cebidae são considerados como hospedeiros ou reservatórios de parasitos com potencial risco biológico, dentre eles se encontra o sagüi de tufo branco (*Callithrix jacchus*). Estes se estendem por vasta área do território nacional e podem conviver em áreas urbanas, facilitando a transmissão de patógenos. São animais usados como modelos experimentais para o *Plasmodium*, apresentando diagnóstico e sinais clínicos semelhantes aos humanos. Foram analisadas 125 amostras de *C. jacchus* oriundos do nordeste brasileiro, com a técnica de nested PCR para *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, obtendo-se somente resultados negativos. A pesquisa por plasmódios humanos em primatas se faz necessário devido possibilidade de atuarem como reservatório/sentinelas e pela ausência de literatura abrangente sobre o assunto. Caracteriza-se, também, como uma ferramenta importante para controle e vigilância epidemiológica, impactando nos planos de redução de morbimortalidade e de eliminação da doença no país. A não positividade para *Plasmodium* em sagüis do tufo branco reflete a situação epidemiológica da população humana, em que se observam casos isolados, porém ainda são necessários estudos para a identificação ou não desses animais como fontes de infecção, visto que tem potencial para serem reservatórios.

Palavras chave: *Plasmodium*, *Callithrix jacchus*, malária, nested PCR

SILVA, L.D.B. INVESTIGATION OF *Plasmodium sp* IN *Callithrix jacchus* FROM BRAZILIAN
NORTHEASTERN. Botucatu, 2023. 31p.

Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

Malaria is the protozoan with the greatest impact in the world and is distributed over extensive tropical and subtropical regions, especially in developing and underdeveloped nations. Brazil is the country with the highest number of cases on the American continent. Primates of the Cebidae family are considered hosts or reservoirs of parasites with potential biological risk, among them is the white-tufted marmoset (*Callithrix jacchus*). These extend over a vast area of the national territory and can coexist in urban areas, facilitating the transmission of pathogens. They are animals used as experimental models for *Plasmodium*, presenting diagnoses and clinical signs similar to humans. 125 Exceptions were observed for *C. jacchus* originating in northeastern Brazil, using the nested PCR technique for *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, with only negative results. The search for human plasmodia in primates is necessary due to the possibility of acting as reservoir/sentinels and the lack of comprehensive literature on the subject. It is also characterized as an important tool for epidemiological control and surveillance, impacting plans to reduce morbidity and mortality and to eliminate the disease in the country. The non-positivity for *Plasmodium* in white-tufted marmosets reflects the epidemiological situation of the human population, in which isolated cases are observed, but studies are still needed to identify or not these animals as sources of infection, since they have the potential to be reservoirs.

Keywords: *Plasmodium*, *Callithrix jacchus*, malaria, nested PCR

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 75% das doenças que têm afetado a saúde humana são de origem animal e muitas delas apresentam potencial de difusão global (WHO, 2008). Devido essa visão baseada em Saúde Única e a proximidade filogenética, os primatas da família Cebidae são considerados pela Fundação Nacional de Saúde como hospedeiros ou reservatórios de parasitos com potencial risco biológico, dentre eles se encontra o sagüi de tufo branco (*Callithrix jacchus*) (WOLFE *et al.*, 1998).

O sagüi de tufo branco é um mamífero, pertencente à ordem Primata, família Callitrichidae e gênero *Callithrix*. É originário da região nordeste do Brasil, ao norte do rio São Francisco e leste do rio Parnaíba; foi trazido do nordeste pelo tráfico ilegal de animais selvagens e colonizou fragmentos de Mata Atlântica das regiões sudeste e sul, sendo avistado até no estado do Rio Grande do Sul (ERWIN & SACKETT, 1990; MIRANDA, 1997). Devido a sua rusticidade, grande capacidade de locomoção e adaptabilidade, *Callithrix jacchus* pode viver em áreas com os mais diversos graus de influência antrópica, chegando até áreas urbanas, favorecendo seu contato com seres humanos e proporcionando a propagação de doenças (EMMONS, 1990; AURICCHIO, 1995).

A malária é a protozoose de maior impacto no mundo, acometendo 212 milhões de pessoas com 429.000 mortes, 90% concentrado na África (WHO, 2017). Distribui-se por extensas regiões tropicais e subtropicais, flagelando expressivo contingente da população, sobretudo nas nações em desenvolvimento e subdesenvolvidas. O Brasil é o país que concentra o maior número de casos no continente americano, estimando-se a ocorrência de mais de 300.000 casos anuais (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). No Brasil temos registros de 3 espécies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* que afetam humanos (BRASIL, 2005) A constante circulação de primatas não humanos torna se um risco para eventuais surtos da doença, devido ao potencial de serem hospedeiros amplificadores (ABREU, 2019).

Segundo Barbosa *et al.* (2011), a busca de conhecimentos sobre os animais silvestres de vida livre como potenciais reservatórios de agentes etiológicos zoonóticos se faz constante, visando trazer melhorias relacionadas à medicina da conservação e à promoção da Saúde Pública.

Nesse contexto de Saúde Única e proximidade com animais de vida silvestre, buscou-se identificar o *Plasmodium sp* em *C. jacchus* e seu potencial como reservatório/hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecologia do Sagüi do Tufo Branco (*Callithrix jacchus*)

O sagüi de tufo branco é um mamífero, pertencente à ordem Primata, família Callitrichidae e gênero *Callithrix*. Ocorre no cerrado (manchas florestais em caatinga seca) e na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Pernambuco e Piauí, onde é endêmico, originalmente se estendendo ao sul até o Rio São Francisco. A extensão de ocorrência de *C. jacchus* é superior a 20.000 km², e sua área estimada de ocupação superior a 2.000 km² (IUCN, 2008). A espécie apresenta grande flexibilidade ecológica ao permear com sucesso por áreas florestais primárias e secundárias, vegetações xerófitas, clareiras, habitats de borda e florestas de galeria (REIS, 2008).

A espécie foi trazida pelo tráfico ilegal de animais selvagens e colonizou fragmentos de Mata Atlântica das regiões sudeste e sul, sendo avistada no estado do Rio Grande do Sul e se estendendo ao estado de Goiás. A dentição, o aparelho digestivo especializado, o tamanho e a forma corporal, associados à alta capacidade de exploração de recursos e adaptação social (RYLANDS & FARIA, 1993; BICCA-MARQUES & GARBER, 2005), conferem à espécie um sistema de características importantes no que compete ao sucesso ecológico e adaptação a ambientes distintos (AMORA *et al.*, 2013), sendo animais com rusticidade e adaptabilidade, chegando até áreas urbanas (EMMONS, 1990; AURICCHIO, 1995). Os padrões de atividades em primatas podem ser diretamente tendenciados pelo nível de socialização antrópica, ou seja, o grau de contato com humanos que o grupo animal pode vir a ter em determinada área; visto o impacto da intervenção humana na disponibilidade de recursos alimentares e, portanto no comportamento do grupo, que responderá diretamente aos estímulos do ambiente, podendo ser negativos ou positivos, como, por exemplo, em situações de supressão da vegetação ou fornecimento de alimento aos animais, respectivamente (ROCHA & CARVALHI, 2011).

A atividade destes animais é muito intensa, passam a maior parte do tempo se locomovendo (MIRANDA, 1997) e despendem mais de 60% do dia em atividades de forrageamento (ERWIN & SACKETT, 1990). Pereira (2015) comparou a área de forrageamento conforme o habitat e notou que em matas com maior disponibilidade de alimentos, os animais tendem a percorrer uma área menor; porém em áreas urbanas (campus do estudo) no qual a disponibilidade alimentar é menor, os sagüis tendem a percorrer uma área maior, gerando assim maior possibilidade de contato interespécies (HILÁRIO & FERRARI, 2010; TISOVEC *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos de conscientização com a população que convive com os sagüis de tufo branco demonstraram o desconhecimento do risco de transmissão de doenças e dos hábitos alimentares da espécie (MOTA & QUEIROZ, 2013; ALBUQUERQUE & OLIVEIRA, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Potkay (1992) fez um compilado das diferentes doenças que acometem a família Callitrichidae, incluindo doenças transmitidas por vetores como Trypanossomose e Leishmaniose, além da presença de pulgas, mosquitos e flebotomíneos, sendo assim potenciais reservatórios para hemoparasitas (CARRILLO-BILBAO *et al.*, 2021).

2.2 Malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, família *Plasmodiidae* classe *Sporozoa* e transmitidos pela picada da fêmea infectada do mosquito do gênero *Anopheles*, também conhecido como mosquito-prego. Dentre as doenças transmitidas por mosquitos, a malária e as diversas arboviroses apresentam grande importância na atualidade, pois têm causado epidemias emergentes e reemergentes de dimensões continentais ou globais (WEAVER & BARRETT, 2004; VASILAKIS *et al.*, 2011; MS, 2019). O gênero *Plasmodium* é o único da Família Plasmodiidae, a qual inclui mais de 125 espécies de parasitos que infectam répteis, aves e mamíferos. Quatro espécies são consideradas parasitos do homem: *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. No Brasil, ocorrem apenas as três últimas espécies.

Todos os vetores do *Plasmodium* são dípteros, culicídeos do gênero *Anopheles*, destacando-se as espécies *A. gambiae* (África) e *A. darlingi* (América). Este último é a espécie de maior importância epidemiológica pela sua abundância, ampla distribuição no território brasileiro, alto grau de antropofilia e endofilia e

capacidade de transmitir diversas espécies de *Plasmodium*. É encontrado em altas densidades e com ampla distribuição no território nacional, visto que a ovoposição ocorre, normalmente, em águas de baixo fluxo, profundas, límpidas, sombreadas e com pouco aporte de matéria orgânica e sais. Estes mosquitos são mais abundantes nos horários crepusculares, ao entardecer e ao amanhecer. Todavia, são encontrados picando durante todo o período noturno (MS, 2019).

No Brasil, a grande extensão geográfica da área endêmica e as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos transmissores e agentes causais da malária das espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (este último com menor frequência). Especialmente na Amazônia Legal, a transmissão é instável e geralmente focal, alcançando picos principalmente após o período chuvoso do ano (BRASIL, 2005).

2.2.1 Situação Epidemiológica

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo, sendo uma das doenças de maior impacto na morbidade e na mortalidade da população dos países situados nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2022), 247 milhões de casos de malária foram registrados em 2021 em 84 países endêmicos.

No Brasil, a região amazônica é considerada área endêmica para malária no país, registrando 99% dos casos autóctones. Nas áreas fora da região Amazônica, menos de 20% dos casos registrados são autóctones. Apesar disso, existe transmissão residual de malária em estados da região extra-amazônica, principalmente em áreas de Mata Atlântica (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo) (MS, 2022). Áreas não endêmicas para a doença apresentam casos humanos graves em razão, principalmente, da falta de conhecimento, falhas de diagnóstico e, conseqüentemente, do tratamento tardio. Nestas regiões apenas 19% dos casos são diagnosticados e tratados dentro de 48h após o início dos sintomas. Conseqüentemente, a taxa de mortalidade da malária pode ser maior do que na região Amazônica (LORENZ *et al.*, 2015).

A região extra-amazônica do Brasil, considerada não endêmica para malária é composta por 17 estados e o Distrito Federal, sendo responsável por menos de 1%

dos casos de malária registrados no Brasil (BRASIL, 2020). Apesar de serem áreas livres de malária, há a possibilidade de reintrodução da malária nestes estados, por serem áreas receptivas e haver o deslocamento de casos importados da Amazônia e de outros países endêmicos para a região, o que ocasionalmente desencadeiam surtos de malária (CERUTTI-JÚNIOR *et al.*, 2007; LIMONJI *et al.*, 2008; BRASIL, 2012; SESAB, 2019).

Entre os anos de 2010 a 2021 foram realizadas 37.749 notificações de malária na região extra-amazônica do Brasil, sendo 22,0% (8.317) casos positivos (MS, 2022). Nesse período, os 10 municípios com maior número de casos, foram responsáveis por 45,2% (3.762) dos positivos na região extra-amazônica. São eles: São Paulo/SP (849), Rio de Janeiro/RJ (743), Goiânia/GO (520), Brasília/DF (328), Teresina/PI (320), Belo Horizonte/MG (300), Campinas/SP (210), Fortaleza/CE (203), Recife/PE (145) e Santos/SP (144) (MS, 2022).

Analisando a distribuição dos casos por meses do ano nota-se aumento nos meses de janeiro e fevereiro durante todos os anos, correspondendo ao intervalo de tempo com aumento da pluviosidade. Quanto à distribuição dos casos autóctones por agente etiológico, dos 1.178 casos autóctones 83,7% (986) foram causados por *P. vivax* e 15,5% por *P. falciparum*. Os casos autóctones tiveram 182 municípios da região extra-amazônica como local provável de infecção, sendo o Espírito Santo (38,2%) o estado com maior percentual de casos autóctones, seguido da Bahia (13,7%) e São Paulo (12,3%) (MS, 2022).

Os primatas não humanos são particularmente os hospedeiros mais numerosos e vulneráveis a infecções por *Plasmodium*, ocorrendo em várias espécies de prossímios, macacos do Velho Mundo Africanos e Asiáticos e macacos do Novo Mundo (COATNEY, 1971). Atualmente são descritas 65 espécies de primatas não humanos infectados naturalmente por *Plasmodium* (CORMIER, 2011).

As espécies da família Callitrichidae são menos susceptíveis a infecção por *Plasmodium* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). Somente duas espécies da família Callitrichidae foram descritas com plasmódio, *Saguinus geoffroyi* e *S. midas*, apresentando uma taxa de infecção muito baixa, entre 2 a 3% (PORTER *et al.*, 1966; BAERG, 1971; DE ARRUDA, 1985; FANDEUR *et al.*, 2000; THOISY *et al.*, 2000; VOLNEY *et al.*, 2002). No entanto, algumas espécies da família Callitrichidae

214 são experimentalmente susceptíveis tanto ao *P. simium* quanto a alguns plasmódios
215 humanos (DEANE, 1967).

216 Estudos recentes mostraram que as espécies de *Plasmodium* que infectam
217 primatas, como *P. brasilianum* e *P. simium*, são geneticamente similares a *P.*
218 *malariae* e *P. vivax* de humanos, respectivamente (TAZI & AYLA, 2011). Essa
219 similaridade levou alguns pesquisadores a concluir que estas espécies podem
220 infectar tanto humanos quanto macacos e, neste caso, os macacos poderiam manter
221 a malária na natureza (TAZI & AYLA, 2011; FANDEUR *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*,
222 2008). Em razão disso, a vigilância da infecção em primatas foi sugerida como de
223 alta importância para os programas de controle da malária (DUARTE *et al.*, 2008).

224 Em primatas não humanos de diferentes espécies, Araujo (2013) observou no
225 estado de Rondônia a prevalência de infecções por *Plasmodium* em 10,3% (19/184),
226 sendo mais frequente em animais selvagens do que em cativeiro. A maioria das
227 infecções observadas foi por *P. brasilianum* (18/19). No entanto, foram observados 3
228 casos de infecção por *P. falciparum*, sendo dois dos casos infecções mistas com *P.*
229 *brasilianum*. Figueiredo *et al.* (2017) detectaram parasitemia pela microscopia
230 eletrônica em 5/161 animais da região da Amazônia maranhense, sendo um na
231 espécie *C. jacchus*. Em testes moleculares, a prevalência para *P. malariae/P.*
232 *brasilianum* ficou entre 29,81 e 34,16%, demonstrando a circulação do patógeno nos
233 primatas da região.

234 Na região da Mata Atlântica, o diagnóstico positivo para malária já foi descrito
235 em PNHS como bugios, macaco-prego e muriqui-do-sul, com a identificação de *P.*
236 *simium* e/ou *P. brasilianum* (CISS, 2018). Nessa região, a transmissão da malária
237 para humanos é acidental e se dá principalmente quando as pessoas adentram as
238 matas, o que vem ocorrendo com maior intensidade em razão do turismo ecológico.
239 Durante os anos de 2015-2016, no Rio de Janeiro, pacientes diagnosticados com
240 malária e que adentraram as matas, foram diagnosticados com *P. simium*,
241 anteriormente considerado parasita específico de macacos, cuja capacidade de
242 infectar humanos só havia sido relatada uma vez, há 50 anos na região. A
243 identificação recente de *P. simium* aponta a possibilidade de este parasita ter sido
244 confundido durante anos com *P. vivax* e só agora, com técnicas moleculares
245 específicas, essa distinção pode ser feita (BRASIL *et al.*, 2017). No Nordeste

brasileiro, nenhuma identificação positiva para malária foi realizada até o momento em PNHs (MS, 2022).

2.2.2 Patogenia

Plasmodium se desenvolve de forma diferente em cada hospedeiro. Nos hospedeiros invertebrados (definitivos), ou seja, mosquitos do gênero *Anopheles*, o desenvolvimento é sexuado, iniciando-se quando a fêmea do mosquito pica um hospedeiro vertebrado infectado para se alimentar, ingerindo cerca de cinco picolitros de sangue e, com ele, macro e microgametócitos. No estômago do mosquito, os gametócitos rompem as hemácias e ficam livres. Durante esse processo, o núcleo do microgametócito se divide em diversas partículas de cromatina, em forma de flagelo, que aderem à superfície do citoplasma agitando-se continuamente. Pelo processo de “exflagelação”, os microgametas se desprendem do corpo residual e movimentam-se à procura do macrogametócito. Quando o encontra, penetram e com o encontro dos núcleos dá-se a fertilização, formando o zigoto, o qual se movimenta, penetrando no epitélio da parede do estômago do mosquito (ANTINORI *et al.*, 2012). Então se transforma em oocisto dentro do epitélio, onde se dá a esporogonia. Quando estão maduros, os oocistos rompem-se liberando os esporozoítas na hemocèle (período de maturação do oocisto que, em condições ótimas de temperatura, se dá por volta de quatro a 15 dias, período considerado como incubação extrínseca). Os esporozoítas movimentam-se atingindo praticamente todo o corpo do mosquito e, principalmente, as glândulas salivares, de onde são liberados durante o repasto sanguíneo.

Os hospedeiros vertebrados (intermediários) são infectados quando picados por fêmeas do mosquito contendo esporozoítas nas glândulas salivares. Estes inoculam os esporozoítas na corrente sanguínea, que migram para o fígado, em até trinta minutos. Por meio das células de Kupffer chegam aos hepatócitos. Os parasitos então se aderem e penetram na célula, passando pela primeira esquizogonia, dando origem aos esquizontes, que evoluem para estágios invasivos, os merozoítas (COWMAN & CRABB, 2006). Ao final do ciclo tecidual, os esquizontes rompem os hepatócitos, liberando milhares de merozoítas na corrente sanguínea. Cada hepatócito rompido libera cerca de 2.000 merozoítas quando a infecção é devida ao *P. malariae*, 10.000 pelo *P. vivax* e 40.000, quando devida ao

278 *P. falciparum* (ANTINORI *et al.*, 2012). Esses eventos caracterizam o período
279 prépatente, que dura entre oito a 15 dias. Os milhares de merozoítas que são
280 lançados na corrente sanguínea e vão invadir os eritrócitos jovens, maduros ou
281 velhos dependem da espécie. A partir daí, inicia-se o segundo ciclo de reprodução
282 assexuada dos plasmódios: o ciclo sanguíneo ou eritrocítico. A espécie *P. malariae*
283 somente invade hemácias velhas (0,1% do total); *P. vivax* e *P. ovale*, por sua vez,
284 invadem preferencialmente as hemácias jovens enquanto o *P. falciparum*, hemácias
285 em qualquer fase do desenvolvimento (ANTINORI *et al.*, 2012). Nos *P. vivax* e *P.*
286 *ovale*, uma parte dos parasitas mantém-se dormente no fígado (os hipnozoítas) e
287 são responsáveis pelas recaídas tardias (SUH *et al.*, 2004). Na fase eritrocítica, os
288 merozoítas sofrem esquizogonia, originando trofozoítas e esquizontes, os quais se
289 rompem e liberam merozoítas que vão invadir novos eritrócitos. Após um período de
290 reprodução assexuada, alguns parasitas evoluem para gametócitos (macro e
291 microgametócitos), os quais são ingeridos pelo mosquito vetor, reiniciando o ciclo.

292 Desta forma, o ciclo de transmissão envolve: o plasmódio (parasito), o
293 anofelino (mosquito vetor) e humanos e eventualmente outras espécies suscetíveis
294 como PNHs (bugios, macacos-prego e saguis). A infecção e/ou doença em PNHs,
295 quando na presença de vetores, permite a continuidade transmissão em ciclos
296 enzoóticos (MS, 2019; CEVS, 2022).

297 2.2.3 Diagnóstico

298 O exame da gota espessa é o método oficialmente adotado no Brasil para o
299 diagnóstico da malária. Mesmo após o avanço de técnicas diagnósticas, este exame
300 continua sendo um método simples, eficaz, de baixo custo e de fácil realização.
301 Quando executado adequadamente, é considerado padrão-ouro pela Organização
302 Mundial da Saúde (OMS) (MS, 2019).

303 Além da hematoscopia, existem outros métodos que vêm sendo
304 desenvolvidos para o estabelecimento do diagnóstico de malária, tais como os
305 testes imunocromatográficos rápidos e a reação de polimerização em cadeia (PCR).

306 Testes rápidos para a detecção de componentes antigênicos de plasmódio –
307 testes imunocromatográficos são métodos de diagnóstico rápido (TDRs) de malária.
308 Em parasitemia superior a 100 parasitos/μl, podem apresentar sensibilidade de 95%

ou mais quando comparados à gota espessa. Grande parte dos testes hoje disponíveis discrimina, especificamente, o *Plasmodium falciparum* das demais espécies. Os TDRs devem ser utilizados para ampliação da rede diagnóstica local e priorizado em situações onde não é possível a realização do exame da gota espessa por microscopista certificado e com monitoramento de desempenho (áreas longínquas e de difícil acesso aos serviços de saúde, áreas de baixa incidência da doença) (MS, 2019).

O diagnóstico molecular para malária começou a ser testado em meados dos anos 80 e tem mostrado grande progresso para aprimoramento e simplificação das técnicas de extração do DNA. As técnicas moleculares mais utilizadas para o diagnóstico da malária são o *nested*-PCR ou PCR convencional e o PCR em tempo real. No entanto, em virtude do custo elevado, da necessidade de infraestrutura e mão de obra especializada seu uso ainda é restrito a laboratórios de referência. Estudos têm demonstrado que técnicas de PCR são mais sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas microscópicas e ao teste imunocromatográfico, portanto com capacidade de detecção do parasito em pacientes com baixa parasitemia (BRASIL, 2005).

O Plano Nacional de Combate à Malária, baseado em estudos realizados no Brasil e em vários países do mundo, considera que pacientes com PCR positivo para malária, mesmo assintomáticos, podem infectar mosquitos e /ou se tornar sintomáticos, sendo assim devem ser tratados quando o diagnóstico for realizado unicamente por essa técnica molecular (MS, 2022).

2.2.4 Sinais Clínicos

Os sintomas da malária envolvem a clássica tríade: febre, calafrio e dor de cabeça. Sintomas gerais – como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura – podem preceder ou acompanhar a tríade sintomática. Contudo, esse quadro clássico pode ser alterado pelo uso de drogas profiláticas ou aquisição de imunidade, e muitos desses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes (BRASIL, 2005). Nos casos complicados, podem ainda ocorrer dor abdominal forte, sonolência e redução da consciência – podendo levar ao coma nos casos de malária cerebral. Na forma grave, o *Plasmodium falciparum* causa danos e disfunção de vários sistemas ou órgãos: sistema nervoso central,

sistema hematopoiético, aparelho respiratório, fígado, sistema circulatório, rins e coagulação sanguínea, sendo considerada uma emergência médica que requer suporte avançado e agilidade no diagnóstico e instituição do tratamento (Gomes *et al.*, 2011). As gestantes, as crianças e as pessoas infectadas pela primeira vez estão sujeitas a maior gravidade da doença, principalmente por infecções pelo *P. falciparum*, que, se não tratadas adequadamente e em tempo hábil, podem ser letais (MS, 2019).

Diversos estudos trazem os sagüis de tufo branco como modelos experimental para infecções do *Plasmodium*, evoluindo desde cura espontânea a casos graves da enfermidade (Pratt-Riccio *et al.*, 2021), indagando o papel desses animais como reservatório da doença (Figueiredo *et al.*, 2017; Carrillo-Bilbao *et al.*, 2021).

O desenvolvimento do parasita nos primatas não humanos é semelhante ao observado nos humanos. A parasitemia geralmente é baixa e as infecções podem durar poucos meses ou persistir por anos, no caso de *P. brasilianum* (DEANE, 1992). Os sintomas nos animais podem ser representados por febre, apatia, perda de apetite e de peso, mas a malária pode ter cura espontânea; em cativeiro a mortalidade por *P. brasilianum* pode ser alta (GARNHAM, 1966; DEANE, 1992).

As informações sobre a dinâmica desses parasitas nos macacos do novo mundo ainda são poucas. Em geral, o parasito não causa sintomas clínicos graves, no entanto, podem ser debilitantes e o estresse pode desencadear a doença. Uma leve anemia pode estar associada ao número pequeno de parasitos em alguns indivíduos, mas não há alterações clínicas aparentes. Os sinais clínicos relatados em primatas com malária consistem em irritabilidade, febre cíclica, depressão, perda de apetite e de peso (TOFT & EBERHARD, 1998). Apesar deste pouco impacto aparente nos primatas, este parasito tem importância para a saúde pública, uma vez que são sentinelas para a malária humana (COATNEY *et al.*, 2003).

2.3 Malária símia

Nos macacos do Novo Mundo foram encontradas, até hoje, apenas duas espécies de plasmódios: o *Plasmodium brasilianum*, comumente encontrado em macacos de diversas espécies na floresta Amazônica, Panamá, Venezuela, Peru e

na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste brasileiras, e o *P. simium*, de ocorrência restrita, predominantemente em macacos bugios (*Alouatta guariba clamitans*) na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo que esses dois parasitos, similar com *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente, estão envolvidos em situações zoonóticas no bioma Mata Atlântica, sendo o seu vetor o *Anopheles cruzii* (VIEIRA, 2021).

Acreditava-se que o parasita que causava a malária humana, infectava apenas humanos, não tendo importância epidemiológica em relação a outros reservatórios (TAUIL *et al.*, 1985; CUROTTO *et al.*, 2012), contudo estudos vem mostrando que os parasitas símios não possuem especificidade de hospedeiro e são muito mais diversos do que os parasitas humanos, tendo em vista esses aspectos não podemos afirmar que plasmódios de símios só infectam símios e plasmódios de humanos, só infectam humanos, pois sabemos que o *P. simium* e o *P. brasilianum* não possuem distinção morfológica, genética ou imunológica com os *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente (COATNEY, 1971; DEANE, 1992; DUARTE *et al.*, 2006, 2008; LIU *et al.*, 2014; ALVARENGA *et al.* 2015; ASSIS *et al.*, 2016;).

2.4 Malária e os sagüis de tufo branco

Assim como outras doenças que circulam em animais silvestres, a malária está fortemente associada às alterações ambientais, incluindo o desmatamento, mudanças climáticas, redução de áreas florestadas que interferem no equilíbrio do ecossistema, limitam geograficamente a distribuição das espécies, com prejuízos diretos para a saúde humana, dos animais domésticos e silvestres (ABDALLA *et al.*, 2015). A relação entre malária e desmatamento também já foi descrita na Amazônia, em outros estados brasileiros e na África (VASCONCELOS *et al.*, 2006; PINA-COSTA *et al.*, 2014). A perda da biodiversidade implica em elevado risco de doenças transmitidas por vetores, como a malária, uma vez que a baixa oferta de animais nas áreas naturais os estimula a buscar novas fontes sanguíneas, como humanos e animais domésticos, que estão no solo, e a se adaptarem a ambientes degradados e abrigos ao redor ou mesmo dentro das casas.

Desta forma, buscou-se o diagnóstico para malária em animais presentes em centros urbanos da região nordeste, considerada não endêmica para a doença e avaliar se reflete a situação epidemiológica na população humana e se são possíveis reservatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Detectar a presença de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* em sagüis do tufo branco (*Callithrix jacchus*) em região extra-amazônica (não endêmica) por meio de técnica molecular qualitativo – nested PCR

3.2 Específicos

- ✓ Analisar possíveis dos fatores de riscos associados à positividade para *Plasmodium* nos animais estudados

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética

Foram analisadas amostras de sangue de saguis *Callithrix jacchus* já coletadas em trabalho em andamento denominado “Fatores Ecológicos e Antropogênicos associados à Transmissão da Raiva em Primatas”, com autoria de Júlio Benavides e orientação da Professora Doutora Jane Megid e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais com protocolo 258/2018 e aprovado como subprojeto com Protocolo 029/2022.

4.2 Coletas das Amostras

As coletas foram realizadas, por conveniência, a campo e em locais que recebem animais de vida livre e dos quais se conhece com precisão a área de procedência (por exemplo, Centro de Resgate de Animais Acidentados, Clínicas de Animais Selvagens e Secretaria de Saúde Ambiental), podendo assim associar a ocorrência com a localização geográfica. A região estudada não é endêmica para malária em humanos (MS, 2022).

Os animais foram capturados em armadilhas Tomahawk tendo banana como atrativo, e em seguida, sedados utilizando as drogas recomendadas no Guia do Ministério da Agricultura, que incluem o protocolo anestésico recomendado pelo

Centro Nacional de Primatas (Cenp/SVS/MS), e que também é utilizado com sucesso pela equipe da Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde (CEVS/SES) do Rio Grande do Sul. O protocolo consistiu na seguinte associação de drogas: Cloridrato de Cetamina (concentração 50 mg/ml), sendo dose de 10 – 15 mg/kg ou 0,2 – 0,3 ml/kg; Midazolan (concentração 5 mg/ml), sendo dose de 0,2 – 0,5 mg/kg ou 0,04 – 0,1 ml/kg; e Levomepromazina (concentração 5 mg/ml), sendo dose de 0,2 – 0,5 mg/kg ou 0,04 – 0,1 ml/kg (MS, 2017). Após a coleta de amostra biológica de sangue com anticoagulante, os animais foram soltos no mesmo local da captura e as amostras congeladas a -80°C.

As coletas foram realizadas em 4 estados brasileiros e suas respectivas cidades nos quais os sagüis são originários, conforme a tabela 1 abaixo e mapa em anexo.

Tabela 1: Localização das coletas realizadas por conveniência e distribuição dos animais em região não endêmica para malária em humanos

Estado	Cidade	Número de animais
Bahia	Salvador	12
	Alagoinhas	7
Pernambuco	Recife	5
	Olinda	2
	Caruaru	11
	Gravatá	11
Rio Grande do Norte	Natal	4
	Tibau do Sul	20
	São Miguel do Gostoso	2
Paraíba	João Pessoa	19
	Princesa Isabel	4
	Catolé do Rocha	3
	Conde	14
	Campina Grande	7

4,3 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada com kit de extração comercial (Qiagen®) conforme as normas do fabricante.

O DNA obtido foi armazenado em alíquotas a -80°C com identificação do processo e da data.

4,4 Reação em cadeia pela Polimerase

A pesquisa de *Plasmodium sp* foi realizada com o emprego da técnica de nested PCR, que consistem em uma seqüência de dois PCR, devido a maior sensibilidade e especificidade com as demais técnicas.

A primeira técnica foi adaptada de Mapua *et al.* (2016), buscando diagnóstico para *P. falciparum*, amplificando na primeira reação um fragmento de DNA de aproximadamente 930 pares de base do Gene do Citocromo B como alvo, como descrito por Prugnolle *et al.* (2010) e com os primers DW2 e DW4. A segunda reação consistiu em amplificar região menor do fragmento anterior com os primers Cytb1/F e Cytb1/R. A primeira reação de PCR foi realizada com uma solução de 25µL, contendo água Mili Q, buffer 10x, MgCl₂, dNTP, polimerase Taq, e 0,5µL de cada primer DW2 e DW4 na concentração de 10pmol com a descrição do programa na tabela 2.

Tabela 2. Descrição do protocolo adaptado Prugnolle *et al.* (2010) para a reação de PCR – *P. falciparum*

PCR				
Reagente	Volume (µL)	Programa		
Água Mili Q	15,85	95°C	15minutos	
Buffer 10X	2,5	94°C	30 segundos	X35
MgCl ₂ (50mM)	1	60°C	1min30s	
DW2 (10pmol/µL)	0,5	72°C	1min30s	
DW4 (10pmol/µL)	0,5	72°C	10min	
dNTP (2,5mM)	0,5	10°C	10min	
Taq	0,15			
Amostra	4			

A segunda reação de PCR ocorreu com os mesmos reagentes anteriores, além de 2µL de amplicon (resultado da PCR 1) e com 0,16µL de cada primer sendo Citocromo B1/F e CitocromoB1/R, totalizando 25µL de solução, como descrito na tabela 3.

Tabela 3. Descrição do protocolo adaptado de Mapua *et al.* (2016) para a neted-PCR – *P. falciparum*

nested PCR				
Reagente	Volume (µL)	Programa		
Água Mili Q	18,54	95°C	5minutos	
Buffer 10X	2,5	94°C	30 segundos	X35

MgCl ₂ (50mM)	1	45°C	30s	
CitocromoB1/R (25pmol/μL)	0,16	72°C	1min30s	
CitocromoB1/F (25pmol/μL)	0,16	72°C	10min	
dNTP (2.5mM)	0,5	10°C	10min	
Taq	0,15			
Amplicon	2			

A técnica de PCR foi adaptada de Liu *et al.* (2014), tendo como objetivo a identificação de *P. vivax*, sendo os primers Pv2768p e Pv3287 utilizados na primeira reação de PCR, enquanto os primers Pv2870p e Pv3185 na reação de nested PCR, produzindo um amplicon de 297 pares de bases. A alteração na técnica consistiu no uso dos reagentes descritos anteriormente e com mesmo programa (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição do protocolo adaptado Liu *et al.* (2014) para nested PCR – *P. Vivax*

PCR – <i>P. vivax</i>			
PCR		Nested PCR	
Reagente	Volume (μL)	Reagente	Volume (μL)
Primer Pv2768p (10pM)	0,2	Primer Pv2870p (10pM)	1
Primer Pv3287 (10pM)	0,2	Primer PV3185n (10pM)	1
Amostra	4	Amplicon	1

As leituras de ambas as técnicas foram realizadas em gel de agarose a 1,5% com voltagem de 100V e corrente de 1000mA.

5 RESULTADOS

As 125 amostras foram submetidas à ambas as técnicas de nested PCR, buscando assim identificar tanto *Plasmodium falciparum* como *P. vivax* porém todas resultaram negativas.

6 DISCUSSÃO

A escassez de literatura para as zoonoses que acometem primatas não humanos e seu papel como possível hospedeiro e/ou reservatório é um tema amplo abordado no âmbito de Saúde Única – One Health. A rusticidade dos sagüis de tufo branco, as mudanças climáticas e a degradação de áreas ambientais, aproximaram a espécie dos seres humanos, possibilitando transmissão de hemoparasitas. Na população, o desconhecimento da possibilidade de transmissão de zoonoses e também dos hábitos alimentares e comportamentais dos *Callithrix jacchus*, propicia acidentes e

496 manejo inadequado dos animais (MOTA & QUEIROZ, 2013; ALBUQUERQUE &
497 OLIVEIRA, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

498 A técnica de contenção física, química e de coleta de amostras biológicas são
499 obstáculos na produção de literatura relacionada aos sagüis, visto que necessitam
500 de armadilha específica e a punção venosa não produz grandes volumes
501 sanguíneos para alíquotas numerosas, assim uma das maiores limitações desse
502 estudo é o número amostral, visto que não é representativo da população.

503 A escolha do nested PCR como técnica diagnóstica para pesquisa de
504 *Plasmodium* é viável em centros de pesquisa e se faz importante devido
505 acondicionamento e transporte das amostras. A especificidade e sensibilidade da
506 técnica a tornam uma importante ferramenta para diagnóstico e tratamento em
507 humanos; em primatas, a técnica é importante para pesquisa de animais positivos e
508 elucidação do potencial destes como reservatórios/sentinelas (DUARTE *et al.*,
509 2008), tendo assim impacto no controle e eliminação da malária (FIGUEIREDO *et*
510 *al.*, 2017). A baixa parasitemia nos animais estudados faz com que o PCR se torne
511 mais sensível quando comparados com técnicas de microscopia e sorologia em
512 primatas neotropicais (FIGUEIREDO, 2015).

513 A prevalência de *P. brasilianum* em primatas não humanos capturados em
514 área próxima a habitações humanas, bem como casos de *P. malariae* na população
515 humana local e casos positivos de *P. falciparum* em primatas não humanos
516 constituem evidências adicionais da possível inter-relação entre malária humana e
517 de primatas não humanos e que estes podem eventualmente constituir em
518 reservatório natural para a malária humana, o que implicaria em futuras ações de
519 controle da doença na região e na necessidade de busca ativa de diagnóstico em
520 primatas não humanos (ARAUJO, 2013).

521 Figueiredo *et al.* (2017) confirmou a circulação de *P. malariae*/*P. brasilianum*
522 em primatas da região da Amazônia maranhense com baixos níveis de parasitemia
523 e de anticorpos circulantes. Devido à sensibilidade como modelos experimentais
524 para malária humana, a importância destes como reservatório ainda é
525 desconhecido, tendo impacto no controle e eliminação da doença na região.

Abreu (2019) investigou dois surtos zoonóticos de febre amarela e malária no sudeste brasileiro em estados sob a influência da mata Atlântica. A única espécie infectada com *Plasmodium sp.* foi *Alouatta guariba clamitans*, sendo cinco com *P. simium/vivax*, quatro com *P. brasilianum/malariae* e dois co-infectados. Em relação à febre amarela, detectou-se vírus em duas espécies de PNHs, *Callithrix jacchus* e *A. g. clamitans*. Este estudo corroborou o papel central dos bugios na epidemiologia destes dois agravos, ressaltando a importância de pesquisa com os PNHs para processos de vigilância e controle.

O estado da Bahia concentrou 13.7% dos casos autóctones da região extra-amazônica e a cidade de Recife entre as 10 cidades extra-amazônicas com mais casos positivos para malária entre os anos de 2010 e 2021 (MS, 2022). Mesmo com maior frequência da doença nas regiões de estudo, não conseguimos identificar nenhum animal positivo. A detecção de infecção natural em *C. jacchus* é recente no país e seu papel como potencial reservatório ainda não é elucidado (ALVARENGA *et al.*, 2017), sugerindo que a infecção pode ser favorecida pela presença de vetores e pela proximidade entre hospedeiros conhecidos (e desconhecidos) da malária.

A reduzida quantidade de amostras obtidas para estudo é um importante fator limitante para avaliar a verdadeira importância desses animais como possíveis elos da cadeia epidemiológica da malária no meio silvestre e sua interação com os humanos.

Os estudos de vigilância epidemiológica se caracterizam como ferramentas importantes para a caracterização e detecção precoce de possíveis reservatórios e necessitam ser continuados para que medidas de controle e profilaxia assim como educação em saúde sejam implementadas.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A não positividade para *Plasmodium* em sagüis do tufo branco reflete a situação epidemiológica da população humana, em que se observam casos isolados, porém ainda são necessários estudos para a identificação ou não desses animais como fontes de infecção, visto que tem potencial para serem reservatórios.

8 REFERENCIAS

- ABDALLA LS, KREMPSE E, CHAME M. 2015. A influência da cobertura vegetal na circulação de malária em cinco municípios do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais do VII Simpósio Nacional de Geografia da Saúde - GeoSaúde**, Brasília-DF, Brasil, 22 a 25 de setembro, Universidade de Brasília, UNB
- ABREU FVS. 2019. FEBRE AMARELA E MALÁRIA: INVESTIGAÇÃO DE DOIS SURTOS ZOONÓTICOS NO SUDESTE BRASILEIRO. 2019. **Tese (Doutorado)** - INSTITUTO OSWALDO CRUZ Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.
- ALBUQUERQUE JR. & OLIVEIRA MAB. 2014. Interações entre humanos e *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) no Parque Estadual Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil In: Passos, FC & Miranda, JMD (Eds.) **A Primatologia no Brasil**. Vol. 13 Curitiba: SBPr, 2014.
- ALVARENGA DAM, PINA-COSTA A, BIANCO JR C, MOREIRA SB, BRASIL P, PISSINATTI A, DANIEL-RIBEIRO CT, BRITO CFA. (2017) New potential Plasmodium brasilianum hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malar J** (2017) 16:71 DOI 10.1186/s12936-017-1724-0
- AMORA TD, BELTRÃO-MENDES R, FERRARI SF. 2013. Use of Alternative Plant Resources by Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) in the Semi-Arid Caatinga Scrub Forests of Northeastern Brazil. **American Journal of Primatology**. 75:333–341.
- ANTINORI S, GALIMBERTI L, MILAZZO L, CORBELLINO M. 2012. Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.4, n. 1, 2012.
- ARAÚJO MS. 2013. Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. 2013. 80f. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP), Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, 2013.
- ASSIS GMP, ALVARENGA DAM, COSTA DC, JUNIOR JCS, HIRANO ZMB, KANO FS, SOUSA TN, BRITO CFA. 2016. Detection of Plasmodium in faeces of the New World primate *Alouatta clamitans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 111, sep. 2016.
- AURICCHIO P. Primatas do Brasil. Guarulhos, **Projeto Editorial UnG**; 1995.
- BAERG DC. 1971. A naturally acquired infection of Plasmodium brasilianum in the marmoset, Saguinus geoffroyi. **J Parasitol**. 1971; 57(1): 8.
- BARBOSA AD, MARTINS NRS, MAGALHÃES DF. 2011. Zoonoses e Saúde Pública: Riscos da Proximidade Humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.14, nº1/2/3, pp. 1 – 9, 2011.
- BICCA-MARQUES JC & GARBER PA. 2005. Use of social and ecological information in tamarin foraging decisions. **International Journal of Primatology**, 26(6): 1321-1344.
- BRASIL PM, ZALIS MG, PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, BIANCO JÚNIOR C, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHADO M, DE ALVARENGA DAM, SANTELLI ACFS, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, DE ABREU FVS, PETERKA CL, ZANINI GM, MUTIS MCS, PISSINATTI A, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DE BRITO CFA, FERREIRA-DA-CRUZ MF, CULLETON R, DANIEL-RIBEIRO CT. 2017. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, 5:1038–46.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. 112 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária - 2020. Boletim Epidemiológico Número Especial. Brasília: Ministério da Saúde. 2020. 116p. Acesso: 01/08/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surto de malária no assentamento Três Pontões, município de Nova Venécia, estado do Espírito Santo, 2012. Boletim Epidemiológico n.º 43. Brasília: Ministério da Saúde. 2012. p.10-1.

BRASIL. **Monitoramento de Febre Amarela Brasil** 2019. [Internet]. Acesso em 15/06/2022. Disponível em: < <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Informe-FAn16.pdf> >

CARRILLO-BILBAO G, MARTIN-SOLANO S, SAEGERMAN C. 2021 Zoonotic Blood-Borne Pathogens in Non-Human Primates in the Neotropical Region: A Systematic Review. **Pathogens** 2021, 10(8), 1009; <https://doi.org/10.3390/pathogens10081009>

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (CEVS). Rio Grande Do Sul. Vigilância Ambiental da Malária. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/vigilancia-ambiental-da-malaria-5dc9ab9d9e3d1>> . Acesso em: 21/10/2022.

CERUTTI-JÚNIOR C, BOULOS M, COUTINHO AF, HATAB MCLD, FALQUETO A, REZENDE HR, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malar J.** 2007; 6 (33): 1-12

CISS. CENTRO DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE SILVESTRE, Fiocruz, 2018. Boletim Informativo BI-CISS/010 - Janeiro 2018. Disponível em: <https://www.biodiversidade.ciss.fiocruz.br/sites/www.biodiversidade.ciss.fiocruz.br/files/boletim_janeiro2018K.pdf>. Acesso em 30/06/2023.

COATNEY GR. 1971 The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? **Am J Trop Med Hyg.** 1971; 20(6): 795-803.]

COATNEY GR, COLLINS WE, WARREN M, CONTACOS PG. 2003. The primate malarias: *Plasmodium knowlesi* (CD-ROM) Version 1.0. Atlanta: **Centers for Disease Control and Prevention.**

CORMIER LA. 2011. The Ten-thousand year fever: Rethinking human and wild-primate malaria. **Walnut Creek, California, 2011.**

COWMAN AF & CRABB BS. 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

CUROTTO SM, BASSO TG, BARROS FILHO IR. 2012. Malária em mamíferos selvagens. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, Vol. 15, jun. 2012.

DE ARRUDA ME. 1985. Presença do Plasmodium brasilianum em macacos na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1985; 68(3): 367-369.

DEANE LM. 1967. Monkey malaria in Brazil. A summary of studies performed in 1964-1966. **Rev Brasil Biol.** 1967; 27: 213-228.

DEANE LM. 1992. Simian Malaria in Brazil. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 87, 1992.

DUARTE AM, PORTO MA, CURADO I, MALAFRONTES RS, HOFFMANN EH, DE OLIVEIRA SG, DA SILVA AM, KLOETZEL JK, GOMES ADE C. 2006. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **J Med Primatol.** 2006 Apr;35(2):87-96. doi: 10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x. PMID: 16556295.

DUARTE, AMRC.; MALAFRONTES, RS.; CERUTTI-JÚNIOR, C.; CURADO, I.; PAIVA, BR.; MAEDA, AY.; YAMASAKI, T.; SUMMA, MEL.; NEVES, DVDA.; OLIVEIRA, SG.; GOMES, AC.(2008) Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? **Acta Tropica.** Volume 107, Issue 2, August 2008, Pages 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.020>

EMMONS LH. 1990. **Neotropical Rain Forest Mammals: a Field Guide.** Chicago, Emmons, L. H; 1990.

647 ERWIN J & SACKETT GP. 1990. Effects of management methods, social organization, and physical
648 space on primate behavior and health. **American Journal of Primatology**, v. 20 p. 23-30, 1990.

649 FANDEUR T, VOLNEY B, PENEAU C, DE THOISY B. 2000. Monkeys of the rainforest in French
650 Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology** 120:11–21.

651 FIGUEIREDO MAP. 2015. Identificação de *Plasmodium spp.* em primatas neotropicais e em
652 anofelinos em municípios da ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Tese (doutorado)** -
653 Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.

654 FIGUEIREDO, MAP.; DI SANTI, SM.; MANRIQUE, WG.; ANDRE, MR.; MACHADO, RZ. (2017)
655 Identification of *Plasmodium spp.* in Neotropical primates of Maranhense Amazon in Northeast Brazil.
656 **PLoS ONE** 12(8): e0182905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182905>

657 GARNHAM PCC. Malaria parasites and other heamosporidia. Blackwell Scientific, **Oxford** 1966

658 GOMES AP, VITORINO RR, COSTA AP, MENDONÇA EG, OLIVEIRA MGA, SIQUEIRA-BATISTA R.
659 2011. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista brasileira de terapia intensiva** 23
660 (3) • Set 2011 • <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000300015>

661 HILÁRIO RR & FERRARI SF. 2010. Feeding ecology of a group of buffy-headed marmosets (*Callithrix*
662 *flaviceps*): fungi as a preferred resource. **American Journal of Primatology**, v. 72, p. 515–521.

663 IUCN SSC **Primate Specialist Group**. VALENÇA-MONTENEGRO, MM.; BEZERRA, BM.; RUIZ-
664 MIRANDA, CR.; PEREIRA, DG.; MIRANDA, JMD.; BICCA-MARQUES, JC.; OLIVEIRA, L.; DA CRUZ,
665 MAOM.; VALLE, RR.; MITTERMEIER, RA.; COTTON, A.; MOLUR, S.; SCHWITZER, C.; ANGELICO,
666 M. Common Marmoset *Callithrix jacchus* (2008). Disponível em:
667 <<https://www.iucnredlist.org/species/41518/191705043#geographic-range>>. Acesso em: 21/05/2022.

668 LIMONGI JE, CHAVES KM, DE PAULA MBC, DA COSTA FC, SILVA ADA, LOPES ÍDS, et al. Malaria
669 outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2008; 41(3): 232-7. 13.

670 LIU W, LI Y, SHAW KS, LEARN GH, PLENDERLEITH LJ, MALENKE JA, SUNDARARAMAN SA,
671 RAMIREZ MA, CRYSTAL PA, SMITH AG, BIBOLLET-RUCHE F, AYOUBA A, LOCATELLI S,
672 ESTEBAN A, MOUACHA F, GUICHET E, BUTEL C, AHUKA-MUNDEKE S, INOGWABINI BI,
673 NDJANGO JB, SPEEDE S, SANZ CM, MORGAN DB, GONDER MK, KRANZUSCH PJ, WALSH PD,
674 GEORGIEV AV, MULLER MN, PIEL AK, STEWART FA, WILSON ML, PUSEY AE, CUI L, WANG Z,
675 FÄRNERT A, SUTHERLAND CJ, NOLDER D, HART JA, HART TB, BERTOLANI P, GILLIS A,
676 LEBRETON M, TAFON B, KIYANG J, DJOKO CF, SCHNEIDER BS, WOLFE ND, MPOUDI-NGOLE
677 E, DELAPORTE E, CARTER R, CULLETON RL, SHAW GM, RAYNER JC, PEETERS M, HAHN BH,
678 SHARP PM. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nat Commun**. 2014;5:3346. doi:
679 10.1038/ncomms4346. PMID: 24557500; PMCID: PMC4089193.

680 LORENZ C, VIRGINIO F, AGUIAR BS, SUESDEK L, CHIARAVALLOTI-NETO F. 2015. Spatial and
681 temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malaria Journal**, 14:408.

682 LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R & DEANE LM. 1995 Simian Malaria at Two Sites in the Brazilian
683 Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1995; 90(3): 331-339.

684 MAPUA MI, PETRZELKOVA KJ, BURGUNDER J, DADOKOVA E, BROOVA K, HRAZSILOCA K,
685 STWART FA, PIEL AK, VALLO P, HUEHRER HP, HASHIMOTO C, MODRY D, QABLAN MA. 2016. A
686 comparative molecular survey of malaria prevalence among Eastern chimpanzee populations in Issa
687 Valley (Tanzania) and Kalinzu (Uganda). **Malaria Journal** volume 15, Article number: 423 (2016)

688 MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022). Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico Malária
689 na região extra-amazônica do Brasil série histórica de 2010 a 2021, Volume 53, agosto de 2022,
690 disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria-1/boletins-epidemiologicos-de-malaria/boletim-epidemiologico-vol-53-no30-2022-malaria-na-regiao-extra-amazonica-do-brasil-serie-historica-de-2010-a-2021/view>. Acesso
691 em 04/02/2023.

694 MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019. Malária. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria)
695 [br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria). Acesso em 25/02/2023

696 MIRANDA GHB. 1997. Observações preliminares sobre a atividade do mico estrela (*Callithrix*
697 *penicillata*), no cerrado denso e cerradão da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF. In: LEITE; L.L.;
698 SAITO, C. H. Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado. Brasília, **UCL-UnB**, 1997. 325p.

699 MOTA GT & QUEIROZ GS. 2013. Educação ambiental em empresa privada como ferramenta para
700 construção de uma relação harmônica entre o homem x sagui. **Trabalho de Conclusão de Curso**
701 apresentado ao curso de licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Superior de Educação da
702 Serra, como requisito parcial para obtenção do grau de licenciado em Ciências Biológicas. Serra,
703 2013.

704 NASCIMENTO KF, ALMEIDA GC, DE SOUSA FF, NASCIMENTO KKF, ALBUQUERQUE DL, MAIA
705 LA. 2019 Campanha de alerta sobre o risco zoonótico na domiciliação e semi-domiciliação de saguis-
706 de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) em Sousa – PB. **Revista Práxis: saberes da extensão, João**
707 **Pessoa**, v. 7, n. 15, p. 82-89, maio/set., 2019.

708 OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA M,; BRASIL P, LADISLAU JL, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT.
709 2010. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. 2010;9:115.

710 PEREIRA AS. (2015) TÉCNICAS DE FORRAGEIO DE *Callithrix jacchus* (CALLITRICHIDAE,
711 PRIMATES) EM DUAS ÁREAS DE MATA ATLÂNTICA COM DIFERENTES GRAUS DE
712 ANTROPIZAÇÃO. **Trabalho de conclusão de curso** apresentado ao Departamento de Ecologia da
713 Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em
714 Ecologia.

715 PINA-COSTA A., BRASIL P., DI SANTI S. M., ARAUJO M. P., SUÁREZ-MUTIS M. C., SANTELLI A.
716 C. F. S.; OLIVEIRA-FERREIRA J., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R.; DANIEL-RIBEIRO C. T. 2014.
717 Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.
718 109, n.5.

719 PORTER JR AJ, JOHNSON CM, DE SOUSA L. 1966 Prevalence of malaria in Panamanian primates.
720 **J Parasitol**. 1966; 52(4): 669-670.

721 POTKAY S. 1992 Diseases of the Callitrichidae: A review. **Journal of Medical Primatology** 1992:21:
722 189-236.

723 PRATT-RICCIO LR, PRATT-RICCIO EK, BIANCO-JUNIOR C, ALVES FA, BAPTISTA BO, TOTINO
724 PRR, MUNIZ JAPC, CASTRO PHG, CARVALHO LJM, DANIEL-RIBEIRO CT. 2021. Uso de modelos
725 de primatas neotropicais para pesquisa em malária: um histórico dos 25 anos de colaboração entre o
726 Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS)
727 **Revista Pan-Amazônica de Saúde** vol.12 no.esp Ananindeua jun. 2021 Epub 07-Jul-2021.
728 <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202100462>.

729 PRUGNOLLE F, DURAND P, NEEL C, OLLOMO B, AYALA FJ, ARNATHAU C, ETIENNE L,
730 MPOUDI-NGOLE E, NKOGHE D, LEROY E, DELAPORTE E, PEETERS M, RENAUD F. 2010.
731 African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium*
732 *falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.
733 2010;107:1458–63.

734 REIS NR. 2008. Primatas Brasileiros. 1 ed. **Technical Books**, 259 p.

735 ROCHA A & CARVALHI S. 2011. Comportamento Alimentar *Callithrix penicillata* Em Fragmento
736 Urbano No Município De Campinas/SP: Implicações Etológicas. **X Congresso de Ecologia do**
737 **Brasil**, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço – MG.

738 RYLANDS AB & FARIA DS. 1993. Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus
739 *Callithrix*. In: Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology. **New York: Oxford**
740 **University Press**. p 262–272.

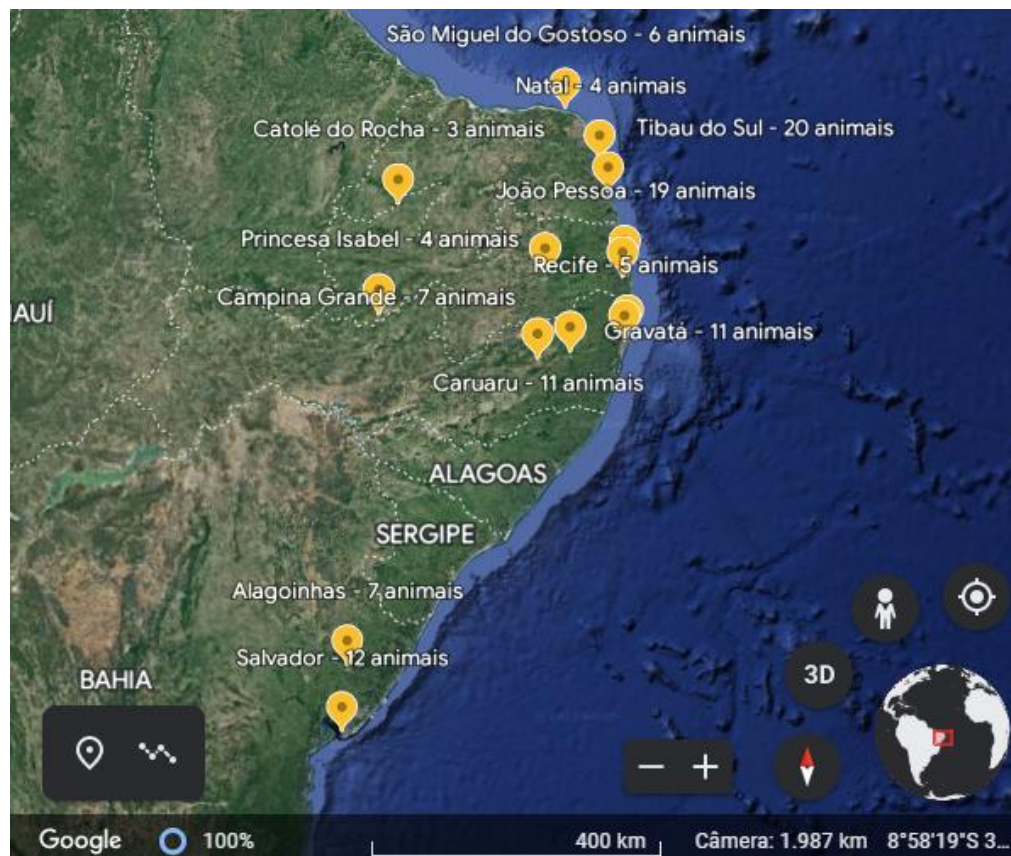
741 SESAB. Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Boletim
742 Epidemiológico da Malária no Estado da Bahia, 2019. 2019; 1-2

- 743 SUH KN, KAIN KC, KEYSTONE JS. Malaria. **Canadian Medical Association Journal**. v. 170, n. 11,
744 p. 1693-1701, 2004.
- 745 TAUIL P, DEANE L, SABROZA P, RIBEIRO C. 1985. A malária no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio
746 de Janeiro, Vol. 1, mar. 1985.
- 747 TAZI L & AYALA FJ. 2011. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium*
748 and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infection, Genetics and Evolution** 11, 209–221.
- 749 THOISY B, MICHEL JC, VOGEL I, VIÉ JC. 2000. A survey of hemoparasite infections in free-ranging
750 mammals and reptiles in French Guiana. **J Parasitol.** 2000; 86(5): 1035- 1040.
- 751 TISOVE KC, CASSANO CR, BOUBLI JP, PARDIN, R. 2014. Mixed-species Groups of Marmosets and
752 Tamarins Across a Gradient of Agroforestry Intensification. **Biotropica**, v. 46, n. 2, p. 248-255.
- 753 TOFT JD & EBERHARD ML. 1998. Parasitic diseases. In T. Bennett, C. R. Abee, & R. Henrickson.
754 Nonhuman primates in biomedical research, Vol. 2: **Diseases** (pp. 111–206). London: Elsevier
755 Academic Press.
- 756 VASCONCELOS CH, NOVO EMLM, DONALISIO MR. 2006. Uso do sensoriamento remoto para
757 estudar a influência de alterações ambientais na distribuição da malária na Amazônia brasileira. **Cad.**
758 **Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 517-526, Mar.
- 759 VASILAKIS N, CARDOSA J, HANLEY KA, HOLMES EC, WEAVER SC. Fever from the forest:
760 prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health.
761 **Natural Reviews Microbiology** [Internet]. 2011; 9(7):532–41.
- 762 VIEIRA AC. 2021. Malária símia: detecção de plasmodium em fezes de primatas não humanos.
763 **Trabalho de conclusão de curso de especialização**, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo,
764 Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.
- 765 VOLNEY B, POULIQUEN J F, THOISY B, FANDEUR T. A sero-epidemiological study of malaria in
766 human and monkey populations in French Guiana. **Acta Trop.** 2002; 82(1): 11-23.
- 767 WEAVER SC & BARRETT ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of
768 arboviral disease. **Natural Reviews Microbiology** [Internet]. 2004 2(10):789–801.
- 769 WHO. World Health Organization. Disponível em:
770 <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acesso em: 31/06/2023.
- 771 WHO. **World Health Organization**. Zoonoses (2008). Disponível em:
772 <http://www.who.int/zoonoses/vph/en/>. Acesso em 07/06/2022.
- 773 WOLFE ND, ESCALANTE AA, KARESH WB, KILBOURN A, SPIELMAN A, LAL AA. (1998). Wild
774 primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. **Emerging infectious**
775 **diseases**, 4(2), 149.

776

777 9 ANEXOS

778 Mapa 1: Localização das coletas realizadas por conveniência e distribuição dos animais em
779 região não endêmica para malária em humanos



780

781

782

Fonte: Google.Earth (earth.google.com)