

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS
NEOTROPICAIS E EM ANOFELINOS EM MUNICÍPIOS
DA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO,
BRASIL**

Mayra Araguaia Pereira Figueiredo

Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS
NEOTROPICAIS E EM ANOFELINOS EM MUNICÍPIOS
DA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO,
BRASIL**

Mayra Araguaia Pereira Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Patologia Animal.

F475i Figueiredo, Mayra Araguaia Pereira
Identificação de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais e em anofelinos em municípios da Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. / Mayra Araguaia Pereira Figueiredo. -- Jaboticabal, 2015
x, 138 p. il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Rosangela Zacarias Machado

Banca examinadora: Rosely dos Santos Malafrente, Tiago Wilson Patriarca Mineo, Marcos Rogério André, Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Bibliografia

1. Diagnóstico molecular. 2. *Anopheles* spp. 3. Malária. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.936..636.97



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS NEOTROPICAIS E EM ANOFELINOS EM MUNICÍPIOS DA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

AUTORA: MAYRA ARAGUAIA PEREIRA FIGUEIREDO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROSELY DOS SANTOS MALAFRONTTE
Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Profa. Dra. ANA PATRÍCIA YATSUDA NATSUI
Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO
Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 22 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAYRA ARAGUAIA PEREIRA FIGUEIREDO – nasceu na cidade de Imperatriz, Maranhão, no dia 25 de agosto de 1983. É médica veterinária, formada pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Câmpus de São Luís-MA, em 2009. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica do PIBIC-CNPq. Prestou serviços para o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – Escritório Maranhão (IICA-MA) nos anos de 2008 e 2009, como coordenadora de cursos para trabalhadores rurais e profissionais do campo (Técnicos Agrícolas, Agrônomos, Zootecnistas e Médicos Veterinários). Em agosto de 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV-Unesp, câmpus de Jaboticabal- SP, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado e coorientação da Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi, com bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP, Processo 10/01598-9). Mestre em Medicina Veterinária em 2012. Iniciou curso de doutorado em Medicina Veterinária (área de concentração Patologia Animal) em março de 2012, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado e coorientação da Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi, com bolsa concedida pela FAPESP (Processo 12/03961-9). Entre agosto e dezembro de 2012 ministrou a disciplina de Parasitologia no curso de Ciências Biológicas da FCAV-Unesp, com bolsa didática da instituição, e nesse período orientou estágio docência de doutoranda da FCAV-Unesp.

“Os homens fazem a sua própria história, mas não a fazem como querem, não a fazem sob circunstâncias de sua escolha e sim sob aquelas com que se defrontam diretamente, legadas e transmitidas pelo passado.”

Karl Marx

“Só erra quem produz. Mas só produz quem não tem medo de errar.”

Autor Desconhecido

Ao meu filho, Olivier Nolan, em especial, por
me ensinar o que há de mais importante na vida,
ser um cidadão consciente dotado de compaixão.

Aos meus pais, Valter Cezar e Tereza, pelo amor e carinho
incondicional e pelos exemplos de vida.

Á minha irmã, pelo carinho, zelo e pelos momentos
compartilhados.

Ao meu marido, Wilson, pelos incentivos, pela
compreensão e parceria no trabalho e por todo
o amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado por ter me orientado, pelos ensinamentos e desafios.

À profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi pelos ensinamentos, dedicação, respeito e acima de tudo, pelo carinho com que sempre tratou a mim e a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 12/03961-9) e auxílio à pesquisa (Processo 10/12820-4), viabilizando a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de São Luís, em especial, Valmir e Claudenir, que sempre me receberam com respeito, carinho e alegria.

Ao amigo Roberto Veloso, que sempre contribuiu com minha vida acadêmica desde a graduação, no qual me orientou no meu primeiro estágio, no CETAS de São Luís. E desde então, sempre auxiliou em tudo que precisei para realizar meus trabalhos.

Aos funcionários do Sítio Aguahy, em especial Dona Maria e seu João, pela ajuda e carinho com que sempre me recebem.

Aos amigos e professores da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) que sempre disponibilizaram os laboratórios.

Aos funcionários da FUNASA de São Luís pelo apoio técnico na captura e identificação dos anofelinos. Em especial a Orzinete Rodrigues Soares Chefe do Departamento de Endemias da Secretaria de Estado da Saúde (SES-MA) e Elizaldo Costa.

Aos biólogos Agostinho Pereira e Joudellys Andrade pela disposição em auxiliar nas capturas e pela identificação de anofelinos.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Márcia, Carla, Aline, Paulo, Otávio, Jenevaldo, Carlos, Luís, e Marquinhos (prof. Marcos), por compartilhar seus conhecimentos, pela colaboração e claro, pelas boas risadas.

Aos queridos colegas doadores de sangue para a cultura de *Plasmodium falciparum*, Jean, João, Renan, Adoni e Simone. Que deram “o sangue” para essa pesquisa.

À Rafa pelas boas conversas, colaboração e algumas vezes terapia.

Às amigas do Laboratório de Malária da SUCEN, Gisele, Juliana, Angélica, e Dida, que sempre me receberam com novidades e carinho.

Aos meus pais pelo apoio dado sempre que solicitado e principalmente nos períodos de trabalho de campo.

Ao meu esposo pela fundamental participação na captura dos primatas e anofelinos. Que não literalmente deu seu sangue para me ajudar

A todos os funcionários do Departamento de Patologia Veterinária.

Ao Arvelino pelo seu trabalho.

A todos os animais do CETAS de São Luís, no qual devo meu aprendizado, minhas indagações e meu amor por trabalhar com o desconhecido. Sem os quais, este trabalho e os outros que o precederam, não teriam existido.

A todos,

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Malária: aspectos gerais.....	2
2.2 Malária no Mundo e no Brasil.....	5
2.3 Malária no Estado do Maranhão.....	9
2.4 Malária em primatas não humanos.....	11
2.5 Anofelinos: mosquitos vetores.....	14
2.6 Anofelinos e malária simiana.....	17
2.7 Métodos de diagnóstico da malária.....	21
2.7.1 Diagnóstico morfológico.....	21
2.7.2 Teste imunocromatográfico de diagnóstico rápido (TDR).....	22
2.7.3 Diagnóstico sorológico.....	23
2.7.4 Diagnóstico molecular.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Aspectos éticos.....	28
4.2 Áreas de estudo.....	28
4.2.1 Centro de Triagem de Animais Silvestres de São Luís.....	29
4.2.2 Reserva Particular Sítio Aguahy, São José de Ribamar.....	30
4.2.3 Sítio Mangalho, Área de Proteção Ambiental do Maracanã (APA), São Luís.....	31
4.3 Espécies amostradas.....	32
4.4 Captura de primatas.....	32
4.5 Contenção física e química.....	33
4.6 Colheita de amostra biológica de sangue.....	33
4.7 Captura e identificação de anofelinos.....	36
4.8 Processamento das amostras.....	43
4.8.1 Confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo e gota espessa.....	43
4.8.2 Diagnóstico imunocromatográfico – Teste de Diagnóstico Rápido (TDR).....	43
4.8.3 Diagnóstico molecular.....	45
4.8.3.1 Extração de DNA de amostras de sangue de primatas neotropicais.....	45
4.8.3.2 Extração de DNA de “pool” de anofelinos.....	46
4.8.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR convencional.....	46
4.8.3.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	51
4.8.3.5 Sequenciamento.....	52
4.8.3.6 Análise das sequências.....	52
4.8.3.7 PCR em tempo real para identificação do gênero <i>Plasmodium</i> baseada no gene 18S em amostras de sangue de primatas neotropicais e em “pools” de anofelinos.....	53
4.8.3.7.1 Amplificação de fragmento do gene 18S de DNA para construção de plasmídeos.....	53
4.8.3.7.2 Preparo de plasmídeo para uso em PCR em tempo real.....	53
4.8.3.7.3 Descrição da reação da PCR em tempo real para <i>Plasmodium</i>	56

4.8.3.8 Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico – Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) para identificação de <i>Plasmodium</i> em amostras de sangue de primatas neotropicais e em ‘pollos’ de anofelinos	56
4.8.4 Testes sorológicos	57
4.8.4.1 Manutenção de cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	57
4.8.4.1.1 Obtenção de antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i> para confecção de lâminas de Imunofluorescência Indireta	58
4.8.4.1.2 Preparação do antígeno solúvel de proteínas de roptrias de <i>P. falciparum</i> para ELISA-teste	59
4.8.4.2 Infecção de camundongos BALB/c com cepa de <i>Plasmodium berghei</i> ..	60
4.8.4.2.1 Obtenção de antígenos de <i>Plasmodium berghei</i> para confecção de lâminas de imunofluorescência indireta	60
4.8.4.2.2 Preparação do antígeno solúvel de proteínas de roptrias de <i>Plasmodium berghei</i> para ELISA-teste	61
4.8.4.3 Visibilização das proteínas solúveis de roptrias de <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i> em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	61
4.8.4.4 Reatividade das proteínas solúveis de roptrias de <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i> pelo Western blotting	62
4.8.4.5 Análise da reação das proteínas solúveis de roptrias de <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i> pelo Dot-ELISA	63
4.8.4.6 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	64
4.8.4.6.1 Descrição da RIFI para <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>P. berghei</i>	64
4.8.4.6.2 Descrição da RIFI para <i>Plasmodium malariae</i>	65
4.8.4.7 Descrição da reação do ELISA-teste usando antígeno solúvel de proteínas de roptrias de <i>P. falciparum</i> e de <i>P. berghei</i>	65
4.8.5 Identificação molecular da fonte alimentar de anofelinos.....	66
5. RESULTADOS	69
5.1 Espécies de primatas não humanos amostradas.....	69
5.2 Diagnóstico morfológico: gota espessa e esfregaço sanguíneo	69
5.3 Diagnóstico imunocromatográfico – Teste de Diagnóstico Rápido (TDR)....	70
5.4 Diagnóstico molecular	70
5.4.1 PCR convencional para pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp. em amostras de sangue de primatas neotropicais.....	70
5.4.1.1 Análise das sequências de <i>Plasmodium</i> de amostras de primatas neotropicais	73
5.4.1.2 Pesquisa de DNA de <i>Plasmodium</i> pela PCR em tempo real (qPCR).....	74
5.4.1.3 Pesquisa de DNA de <i>Plasmodium</i> pela técnica de LAMP	74
5.5 Diagnóstico sorológico	76
5.5.1 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> spp. em amostras de soro de primatas neotropicais pela RIFI, utilizando antígenos de <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	76
5.5.2 Confirmação da separação das proteínas solúveis de roptrias de <i>P. falciparum</i> e <i>P. berghei</i> pelo SDS-PAGE e Western blotting.....	77
5.5.3 Pesquisa de reatividade anti- <i>Plasmodium</i> spp. pelo ELISA-teste indireto em soro de humanos (controles positivos e negativos), usando antígenos de proteínas de roptrias de <i>P. falciparum</i> e de <i>P. berghei</i>	79
5.6 Pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp. em “pools” de anofelinos	81
5.6.1 Espécies de anofelinos e pontos de captura	81
5.6.2 Diagnóstico molecular em amostras de DNA de “pool” de anofelinos	83
5.6.2.1 PCR convencional e sequenciamento	83
5.7 Identificação molecular de fonte alimentar de anofelino.....	84
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	96

8. REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A	115
APÊNDICE B	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* no vetor e no hospedeiro vertebrado, ilustrando as fases pré-eritrocítica e eritrocítica. Fonte: adaptado de Suh, Kain e Keystone (2004)..... 5
- Figura 2. Áreas de transmissão da malária no mundo: em vermelho, área de transmissão de malária; amarelo, área onde a doença ocorre em algumas partes; em verde, área onde não se conhece casos de malária autóctone. Fonte: adaptado de CDC (2015)..... 7
- Figura 3. Fases do ciclo biológico de *Anopheles*: ovo, larva, pupa e adulto. Fonte: Carmo (2006). 15
- Figura 4. Interações entre mosquitos-hospedeiros e a possível resposta de mosquitos antropofílicos aos odores voláteis de hospedeiros humanos e primatas não humanos. Adaptado de Verhulst, Smallegange e Takken, 2012. 18
- Figura 5. Vista aérea das instalações do CETAS de São Luís-MA (à esquerda) e imagem da entrada do centro (à direita). Fonte: Digital Globe..... 29
- Figura 6. Imagem de satélite da Reserva Particular Sítio Aguahy mostrando a delimitação da reserva. Fonte: Google Maps..... 30
- Figura 7. Imagem de satélite da Ilha de São Luís do Maranhão identificando a localização do Sítio Mangalho na APA do Maracanã, município de São Luís. 31
- Figura 8. Colheita de sangue em primata neotropical sob efeito de contenção química: A – venopunção da veia jugular de *Sapajus* sp.; B – venopunção da veia femoral de *Saimiri sciureus*. 34
- Figura 9. Espécime de *Sapajus* sp., macho, capturado no Sítio Aguahy, município de São José de Ribamar-MA, marcado com tinta vermelha após colheita de sangue.... 35
- Figura 10. Punção digital em exemplar de *Saimiri sciureus* para o preparo das lâminas de esfregaço sanguíneo e gota espessa. 35
- Figura 11. Fluxograma com o número de amostras de sangue colhidas e os respectivos exames realizados no período 2009 a 2015. 36
- Figura 12. Armadilha tipo CDC montada no Sítio Aguahy, São José de Ribamar-MA: A – armadilha sendo colocada na copa das árvores; B- ponto de captura de anofelinos próximo à coleção de água..... 37
- Figura 13. Demonstração do uso do capturador de sucção tipo Castro (seta grossa) e transferência do mosquito diretamente para gaiola telada de armazenamento (seta fina). 38
- Figura 14. Armadilha Shannon montada em trilha do Sítio Aguahy, São José de Ribamar, Estado do Maranhão..... 38

- Figura 15. Pesquisa de criadouros de anofelinos em área de mangue no Sítio Aguahy, São Jose de Ribamar, Maranhão: A – área de mangue no período seco (janeiro de 2013); B – mangue bem próximo da área de praia..... 39
- Figura 16. Imagem dos pontos de capturas de anofelinos no período de junho a julho de 2013 no Sítio Aguahy, São José de Ribamar-MA: A – imagem de satélite dos pontos de capturas; B - Laguinho artificial (área de mata aberta), primeiro ponto de captura no Sítio Aguahy. Nesse ponto foi utilizada atração humana protegida; C – armadilha luminosa tipo CDC colocada a dois metros do solo, na parte do córrego que leva água ao laguinho artificial; URA de 86% e temperatura de 26,7°C; Coordenadas 02.644.35’S, 04.413.955’O..... 40
- Figura 17. Captura de anofelino no Sítio Mangalho, localizada na APA do Maracanã, São Luís, Maranhão, no mês de julho de 2013. Armadilha Shanonn com uso de isca luminosa e iscas humanas protegidas. 41
- Figura 18. Fluxograma dos trabalhos realizados com os anofelinos, desde a captura até o processamento das amostras de DNA..... 42
- Figura 19. Características do kit imunocromatográfico “First response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo *P.f.* and PAN Detection Card Test” mostrando teste válido e negativo para as quatro espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*: setas – indicação na membrana onde ocorre a reação antígeno-anticorpo; poço para depósito da amostra; e poço para depósito do tampão..... 45
- Figura 20. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos)..... 54
- Figura 21. Imagem de gel de agarose 2% do protocolo gênero-específico de Gama et al. (2007) que resulta em um fragmento de 84 pb. Usou-se na primeira canaleta o marcador molecular de 50 pb (Life Technologies); Canaleta 2 e 3: controles positivos usados como DNA molde de *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente. Canaletas 4 a 10: clones de *P. falciparum* (PF1, PF2, PF3 e PF4) e *P. malariae* (PM1, PM2 e PM3), respectivamente. 55
- Figura 22. Fotomicrografia dos parasitas visualizados por microscopia de luz em lâminas de esfregaço sanguíneo de primatas neotropicais amostrados no CETAS-São Luís: A – trofozoítas em forma de anel de amostra de *Sapajus* sp. (macho); B – trofozoíta de amostra de *Callithrix jacchus* (macho). Coloração de Giemsa, objetiva 100x. 70
- Figura 23. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados são relativos a primeira reação da PCR descrita por Rubio et al. (1999) para identificação de *Plasmodium*, na qual podem ser visualizados um fragmento de 231pb referente ao gene endógeno (fragmento 18S de DNA conservado entre as espécies de mamíferos); e outro fragmento maior, gênero-específico de 783 a 821 pb, que identifica positividade para *Plasmodium* (o tamanho varia de acordo com a espécie). Foi usado marcado de peso molecular de 100 pb (primeira canaleta), seguido do controle negativo (água ultrapura), dos controles

positivos para *P. vivax* (PV), para *P. malariae* (PM) e para *P. falciparum* (PF), respectivamente, e amostras-teste..... 71

Figura 24. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os produtos mostrados são relativos à primeira reação da PCR padronizada por Kimura et al. (1997) para o gênero *Plasmodium*. Foi usado marcador de peso molecular de 50 pb (primeira canaleta), seguido do controle positivo de *P. falciparum* (PF), controle negativo (água ultrapura) e as amostras-teste de *Callithrix jacchus* (107 a 109) e de *Saimiri sciureus* (110 a 113). As amostras positivas amplificaram na altura de 110pb (106 a 113)..... 72

Figura 25. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos mostrados são relativos à primeira reação da PCR padronizada por Snounou et al. (1993) para identificação do gênero *Plasmodium*. Foi usado marcador molecular de 100 pb (primeira canaleta), seguido do controle positivo de *P. falciparum* (PF), controle negativo (água ultrapura) e as amostras-teste de *Sapajus* sp. do CETAS-São Luís. As amostras positivas amplificaram na altura de 1200pb (127, 128, 129, 131 e 65)..... 73

Figura 26. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. O produto amplificado é da reação espécie-específica para *P. malariae*, que gera fragmento de 144pb (SNOUNOU et al. 1993). Primeira canaleta: marcador molecular de 100pb, seguido de controles positivos para *P. malariae*, da água ultrapura (controle negativo) e das amostras-teste (120 a 130). A amostra 123 é de exemplar de *Sapajus* sp. do CETAS-São Luís. 73

Figura 27. Curva de amplificação do DNA de *Plasmodium* spp. pela técnica de LAMP usando controles positivos para *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) e *P. falciparum* (Pf) e plasmídeo construído a partir de fragmento de DNA de *P. falciparum* diluídos na base 10..... 75

Figura 28. Curvas de dissociação de produtos amplificados pelo LAMP de *Plasmodium* spp. Controles positivos para *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) e *P. falciparum* (Pf) e plasmídeo construído a partir de fragmento 18S de DNA de *P. falciparum* diluídos na base 10..... 76

Figura 29. Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos contra *P. malariae*: A – soro humano controle positivo, objetiva de 100x; B – soro controle humano negativo, objetiva de 40x; C – amostra sororreagente na diluição 1:20 de exemplar de *Sapajus* (macho) do CETAS-São Luís, objetiva de 40x. 77

Figura 30. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corado com Comassie Brilliant Blue R-250, de amostras protéicas de roptrias de cultura de *P. falciparum* e de inoculação em camundongos BALB/c com cepa de *P. berghei*. Foi usado na linha 1 marcador de peso molecular Unstained Protein (Thermo Scientific), seguido (2 a 5) de fração de proteínas de roptrias de *P.falciparum* e *P. berghei* (6 a 9). 78

Figura 31. Visibilização da fração de proteínas de roptrias de *P. berghei* em membrana de nitrocelulose pelo Western blotting após incubação da membrana com amostras de soros humanos, controle positivo e negativo para *P. falciparum*. Foi usado marcador de peso molecular (linha 1) Prestained Protein (Thermo Scientific), seguido de soro humano positivo para *P. falciparum* nas diluições de 1:20 (linha 2), 1:50 (linha 4) e 1:100 (linha 6); soro humano negativo para *Plasmodium* spp. nas diluições de 1:20 (linha 3); 1:50 (linha 5) e 1:100 (linha 7). 79

Figura 32. Fotografia da reatividade dos antígenos solúveis de proteínas de roptrias com amostras de soros humanos e de camundongos em membranas de nitrocelulose pela técnica de Dot-ELISA na diluição 1:100: **A** – reatividade entre o antígeno de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e as amostras de soros humanos positivos para *P. falciparum* (**PF**), *P. vivax* (**PV**), *P. malariae* (**PM**) e soro de paciente curado de *P. vivax* há um ano (**PC**), **1**, **2**, **3** e **4** são soros humanos negativos para *Plasmodium* spp.; **B** – reatividade entre o antígeno de roptrias de *P. berghei* e o soro de camundongo infectado com *P. berghei* (**PB**) e soros humanos positivos para **PF**, **PV** e **PM**, respectivamente, e soro de camundongo negativo (**C**), seguido de soros humanos negativos (**1**, **2** e **3**). 80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Espécies de primatas neotropicais amostradas no período de 2009-2014, nome comum, local de captura e sexo..... 32
- Tabela 2. Dosagens anestésicas da associação de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam (Zoletil®) aplicadas via intramuscular para a imobilização química de diferentes espécies de primatas neotropicais..... 33
- Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores, e descrição das sequências térmicas utilizadas para detecção molecular das espécies de *Plasmodium* segundo protocolo de Kimura et al. (1997)..... 47
- Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores, sequências térmicas e tamanho de fragmento de DNA gerados pelas reações de PCR descrito por Rubio et al. (1999) utilizados na detecção molecular de *Plasmodium* spp. e do controle endógeno (gene 18S rRNA)..... 48
- Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e das sequências térmicas de dois protocolos, Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999), realizados em associação para detecção molecular do gênero *Plasmodium* (18s rRNA). 50
- Tabela 6. Descrição da reação gênero-específica (SNOUNOU et al., 1993) para detecção molecular do gênero *Plasmodium* e sequências térmicas..... 51
- Tabela 7. Oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação do gene 18S rRNA pela reação de LAMP..... 57
- Tabela 8. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores, baseados no gene citocromo B (Cit B) usados na identificação da fonte alimentar de mosquitos anofelinos (CHANG et al. 2008). 68
- Tabela 9. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores baseado na região intron 2 do gene β 2-microglobulina de primatas neotropicais (CANAVEZ et al., 1999), usados na identificação da fonte alimentar de mosquitos anofelinos..... 68
- Tabela 10. Número de exemplares de *Anopheles* sp. por subgênero, espécie de anofelino e o local de captura na Ilha de São Luís, Maranhão, no ano de 2013. 83

IDENTIFICAÇÃO DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS NEOTROPICAIS E EM ANOFELINOS EM MUNICÍPIOS DA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

RESUMO – A malária é a endemia de maior impacto na Saúde Pública de países tropicais, devido à alta morbidade e mortalidade. Considerando a malária como uma zoonose, nos quais primatas podem funcionar como reservatórios de espécies de *Plasmodium* que podem infectar seres humanos nos levam a realizar estudos de malária em primatas com inquestionável relevância. Sabendo-se que geralmente a distribuição da malária humana e de primatas segue a mesma distribuição dos anofelinos, mosquitos vetores, neste trabalho investigaram-se a presença de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais e em anofelinos na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. Colheram-se amostras de sangue de primatas neotropicais do CETAS-São Luís (n=141) e de vida livre (n=20) da Reserva Particular Sítio Aguahy, município de São José de Ribamar. Mosquitos anofelinos foram capturados nesta mesma reserva (n=380) e no Sítio Mangalho (n=36), localizado na Área de Proteção Ambiental do Maracanã, município de São Luís, totalizando em 54 “pools”. As amostras de sangue de primatas foram submetidas a testes morfológicos, sorológicos (RIFI e ELISA-teste) e moleculares (qPCR e PCR convencional) para identificação de *Plasmodium*. Os “pools” de mosquitos foram ensaiados por testes moleculares para identificação de *Plasmodium*. Cinco primatas tiveram lâminas positivas (3,10%) com observação de formas trofozoíticas. Na RIFI quatro amostras de soro de primatas sororeagiram frente ao antígeno de *P. malariae*. Amplificaram para *Plasmodium* sp. na qPCR 34,16% (55/161) das amostras de primatas. Na PCR convencional 30,43% (49/161) foram positivas, sendo 47 (47/49) para *P. brasilianum/P. malariae* e 2 (2/49) para *P. simium/P. vivax*. Foram sequenciadas quatro amostras de DNA de primatas, que apresentaram identidade com *P. malariae* (n=2), com *Plasmodium* ZOOBH (n=1) e com *P. falciparum* (n=1). Três “pools” de anofelinos foram positivos para *Plasmodium* na qPCR (3/54) e na PCR convencional. No sequenciamento as amostras apresentaram identidade com *P. falciparum* (n=1), *P. vivax* (n=1) e com *Plasmodium* ZOOBH (EF090276). Devido à contínua e crescente invasão do ambiente silvestre pelas populações humanas, o potencial zoonótico sempre deve ser considerado. Assim como, o comportamento e a capacidade de adaptação de parasitas e vetores de populações silvestres para a população humana. Dessa forma, estratégias com base em mais pesquisas precisam ser desenvolvidas para a prevenção e o diagnóstico da malária zoonótica.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, *Anopheles* spp., malária, ciclo zoonótico, sorologia.

IDENTIFICATION of *Plasmodium* spp. IN NEOTROPICAL PRIMATE AND ANOPHELES IN MUNICIPALITIES OF SÃO LUÍS ISLAND, STATE MARANHÃO, BRAZIL

ABSTRACT: Malaria is a disease of greater impact on Public Health in tropical countries because of the high morbidity and mortality. Considering malaria as a zoonosis in which primates can act as reservoirs of species of *Plasmodium* that can infect humans lead us to conduct malaria studies in primates with unquestionable relevance. It is generally known that the distribution of human and primate malaria following the same distribution of *Anopheles* mosquitoes vectors, in this study we investigated the presence of *Plasmodium* spp. in neotropical primates and *Anopheles* in São Luís Island, Maranhão State, Brazil. Samples were blood neotropical primates CETAS-São Luís (n = 141) and wild life (n = 20) Private Reserve Sítio Aguahy, São José de Ribamar. *Anopheles* mosquitoes were captured in the same reserve (n = 380) and Mangalho site (n = 36), located in the Environmental Protection Area of the Maracanã, São Luís, totaling 54 pools. The primate blood samples were subjected to morphological, serological (IFA and ELISA-test) and molecular (qPCR and conventional PCR) to identify *Plasmodium*. The "pools" of mosquitoes were assayed by testing for molecular identification of *Plasmodium*. Five primates had positive slides (3.10%) with observation trofozoíticas forms. In IFA four primate serum samples sororreagiram against the antigen of *P. malariae*. Amplified *Plasmodium* sp. qPCR at 34.16% (55/161) of samples of primates. In conventional PCR 30.43% (49/161) were positive, 47 (47/49) for *P. brasilianum/P. malariae* and 2 (2/49) to *P. simium/P. vivax*. Were sequenced DNA samples from four primates which showed identity with *P. malariae* (n = 2), *Plasmodium* ZOOBH (n = 1) and *P. falciparum* (n = 1). Three pools of *Anopheles* were positive for *Plasmodium* in qPCR (3/54) and conventional PCR. The sequencing samples showed identity to *P. falciparum* (n = 1), *P. vivax* (n = 1) and *Plasmodium* ZOOBH (EF090276). Due to the continued and increasing encroachment to forests by human populations, the zoonotic potential should always be considered. As well as the behavior and the adaptability of parasites and vectors of wild populations to human population. Thus, strategies based on further research must be developed for the diagnosis and prevention of zoonotic malaria.

Keywords: molecular diagnosis, *Anopheles* spp, malaria, zoonotic cycle, serology.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento e o controle das zoonoses são importantes para o presente e para as gerações futuras, visto que cerca de 75% das doenças humanas emergentes, nos últimos 10 anos, foram causadas por agentes patogênicos provenientes de animais (WHO, 2014a). Consequência do crescimento sócioeconômico que aproxima o ser humano do ambiente silvestre e vice-versa, implicando em mudanças ecoepidemiológicas que representam um risco para a Saúde Pública (DHIMAN et al., 2014).

Recentemente, pode ser observada a mudança na ecoepidemiologia do *Plasmodium knowlesi*, espécie de protozoário que originalmente acomete primatas do gênero *Macaca*. Com a aproximação dos humanos do ambiente silvestre, no qual a cadeia epidemiológica estava em equilíbrio, surtos da doença em humanos na Ásia passaram a ser notificados nos últimos 15 anos. Hoje, essa espécie é responsável pelo maior número de casos de malária humana na Malásia (68%) (HANSEN et al., 2013).

Essa possibilidade de adaptação dos patógenos de hospedeiros primatas não humanos para hospedeiros humanos se dá pela estreita relação filogenética. Fato já observado em doenças como a febre amarela, o vírus Chikungunia, a *Giardia lamblia* e, claro, espécies de *Plasmodium* (VERHULST; SMALLEGANGE; TAKKEN, 2012).

Tal fato reforça o retorno das pesquisas de malária em primatas neotropicais no Brasil, iniciadas na década de 70. Essas pesquisas produziram uma vasta literatura de identificação de plasmódios em primatas neotropicais (DEANE et al., 1971; DEANE, 1976). Um estudo soroepidemiológico revelou que humanos e primatas neotropicais, coexistindo em áreas de mata, possuíam anticorpos frente às mesmas espécies de plasmódios. Esse estudo corrobora a hipótese de que em áreas de florestas no Brasil (Floresta Amazônica e Mata Atlântica) possa ocorrer malária zoonótica (ARRUDA et al., 1989; ALVARENGA et al., 2015).

O Estado do Maranhão possui área de Floresta Amazônica, a qual concentra o maior número de casos humanos de malária (OLIVEIRA-PEREIRA; REBÊLO, 2000). No entanto, nos últimos dez anos, o Estado tem registrado menor número de notificações da enfermidade. Contudo, nenhum

monitoramento foi realizado por parte das autoridades em saúde deste Estado sobre plasmódios em primatas neotropicais desde a década de 70, quando foram diagnosticados com *P. malariae* sete bugios (*Alouatta belzebul belzebul*) (FERREIRA-NETO; DEANE; CARNEIRO, 1970).

Dessa forma, dando continuidade aos trabalhos iniciados no ano de 2009 sobre pesquisa de malária em primatas neotropicais na Ilha de São Luís (FIGUEIREDO, 2012; FIGUEIREDO et al., 2015) e com indagações intrigantes sobre como os primatas se mantêm infectados com plasmódios nesta localidade, objetivou-se pesquisar a presença de plasmódios em primatas neotropicais de cativeiro e de vida livre e em anofelinos em municípios da Ilha de São Luís, Maranhão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Malária: aspectos gerais

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*.

A classificação taxonômica do *Plasmodium* utilizada neste trabalho é de Levine et al. (1980), a qual faz parte do Filo Apicomplexa, que inclui parasitos de importância veterinária e humana. São parasitos intracelulares obrigatórios (na maioria dos casos), apresentam ciclo de vida complexo e geralmente tem dois hospedeiros (um invertebrado e outro vertebrado); Classe Sporozoea, subordem Haemosporina e o único gênero da família Plasmodiidae. O modo de transmissão é bem sucedido, graças à presença do

complexo apical dotado de organelas com enzimas especializadas na lise de membranas das células alvo de invasão (PREISER et al., 2002; COWMAN;CRABB, 2006).

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, devido aos movimentos de contração e expansão, 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 no vértice de uma pequena elevação do seu citoplasma. Com o encontro dos núcleos dá-se a fertilização, formando o zigoto, o qual se movimenta (o oocineto), penetrando no epitélio da parede do estômago do mosquito (ANTINORI et al., 2012). Então transforma-se em oocisto dentro do epitélio, onde se dá a esporogonia. Quando estão maduros, os oocistos rompem-se liberando os esporozoítas na hemocele (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. As moléculas de adesão da proteína circunsporozoíta (CSP), uma das principais proteínas de superfície do esporozoíta, reconhecem as moléculas sulfatadas das membranas dos 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 *P. falciparum* (ANTINORI et al., 2012).

Esses eventos caracterizam o período exoeritrocítico (período pré-patente), que dura entre oito a 15 dias. Os milhares de merozoítas que são lançados na corrente sanguínea e vão invadir os eritrócitos jovens, maduros ou velhos dependem da espécie. A partir daí, inicia-se o segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo sanguíneo ou eritrocítico. A espécie *P. malariae* somente invadem hemácias velhas (0,1% do total); *P. vivax* e *P. ovale*, por sua vez, invade preferencialmente as hemácias jovens; e o *P. falciparum*, hemácias em qualquer fase do desenvolvimento (ANTINORI et al., 2012). Em *P. vivax* e *P. ovale*, uma parte dos parasitas mantém-se dormente no fígado (os hipnozoítas) e são responsáveis pelas recaídas tardias (SUH et al., 2004).

Na fase eritrocítica, os merozoítas sofrem esquizogonia, originando trofozoítas e esquizontes, os quais se rompem e liberam merozoítas que vão invadir novos eritrócitos. Após um período de reprodução assexuada, alguns parasitas evoluem para gametócitos (macro e microgametócitos), os quais são ingeridos pelo mosquito vetor, reiniciando o ciclo. A Figura 1 ilustra de maneira simplificada o ciclo de vida do *Plasmodium*.

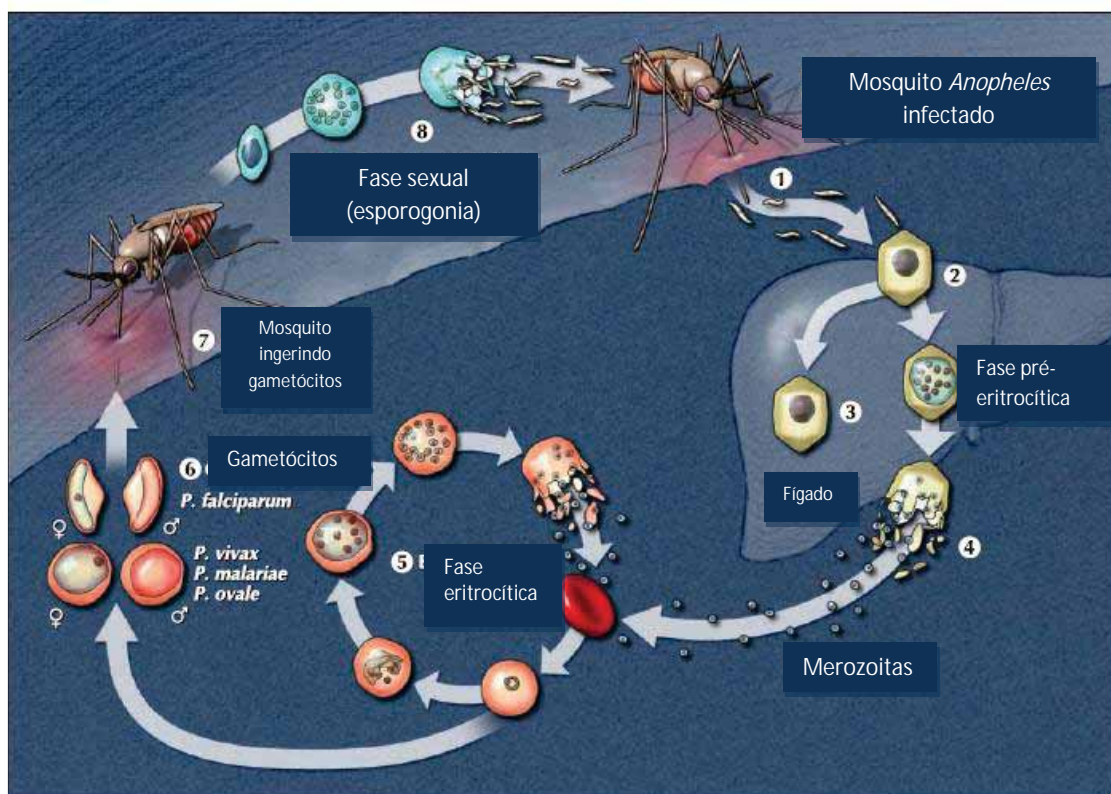


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* no vetor e no hospedeiro vertebrado, ilustrando as fases pré-eritrocítica e eritrocítica. Fonte: adaptado de Suh, Kain e Keystone (2004).

2.2 Malária no Mundo e no Brasil

A malária é a doença parasitária humana responsável pelo maior número de óbitos e encontra-se entre as três mais importantes doenças infecciosas do mundo (COWMAN; CRABB, 2006), com estimativas, no ano de 2013, de 198 milhões de casos anuais em todo o mundo (WHO, 2014b), sendo que 90% desses casos ocorreram na África Sub-Saariana. Globalmente acarreta em 584.000 mortes todos os anos, das quais 90% são na África e, dessas, 78% em crianças menores de cinco anos (WHO, 2014b).

Mesmo com investimentos de vários órgãos internacionais para pesquisas em vacinas, medicamentos e controle, a malária ainda faz parte da lista das doenças negligenciadas, devido ao contexto em que, se encontra a população em área de risco de transmissão da doença.

Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas em mais de 97 países e territórios (Figura 2) estejam em risco de se infectar com *Plasmodium* spp. (WHO, 2014b). Tanto a distribuição de casos quanto a população exposta à malária é bastante heterogênea, sendo *P. falciparum* e *P. vivax* as espécies mais prevalentes no mundo em comparação com as demais espécies que acometem o homem (*P. malariae*, *P. ovale*). Na África, a espécie mais prevalente é *P. falciparum*; no Oriente Médio, Ásia Central e Américas Central e do Sul predomina *P. vivax*. *Plasmodium malariae* é pouco frequente nas Américas, Ásia e Oriente Médio, mas é de comum ocorrência na África. Por outro lado, *P. ovale* é somente encontrado em áreas da África e Sudeste Asiático (Indonésia, Nova Guiné, Oriente Médio, Filipinas e Índia) (MUELLER et al., 2007).

Nos últimos anos, a doença reapareceu em áreas onde estava erradicada, como na República da Coreia, República Democrática da Coreia e Tajiquistão, e em áreas com controle da doença, como Turquia, norte do Iraque e Azerbaijão (WHO, 2003). Devido à migração de populações, viajantes, refugiados e tropas militares, o número de casos importados da malária tem aumentado em áreas onde a doença não era endêmica.

Um estudo realizado por Jelinek et al. (2002) nos países da União Europeia, no período de 1999 a 2000, mostrou a incidência de casos importados de *P. falciparum* (1.659 casos), dos quais 27 apresentavam infecções mistas.

Nos Estados Unidos, estima-se que 1.300 casos são importados por ano. Outro problema é a malária transfusional. No período de 1963 a 1999, registraram-se 93 casos, dos quais 10 pessoas morreram (MUNGAI et al., 2001).

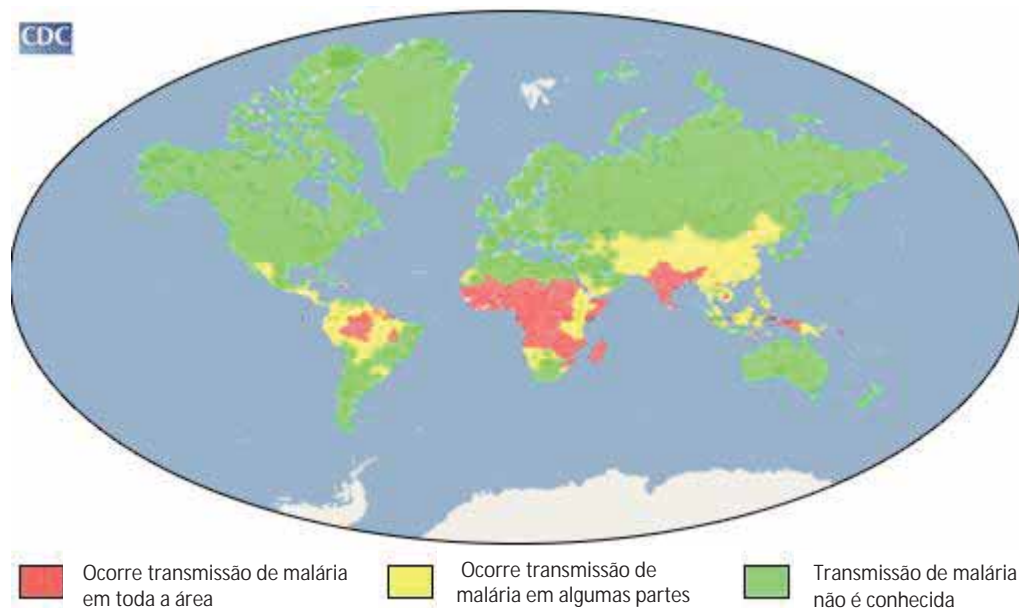


Figura 2. Áreas de transmissão da malária no mundo: em vermelho, área de transmissão de malária; amarelo, área onde a doença ocorre em algumas partes; em verde, área onde não se conhece casos de malária autóctone. Fonte: adaptado de CDC (2015).

No Continente Americano, o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária (42%) e uma situação epidemiológica complexa, com regiões sem transmissão, de baixa transmissão e de alta transmissão de malária. Contudo, a constante migração de pessoas de áreas endêmicas para áreas não endêmicas levanta mais outro problema, que é o risco de malária transfusional. Visto que nem todos os hemocentros de regiões não endêmicas fazem a triagem para malária, eles podem receber sangue de doadores assintomáticos que realizaram viagem ou viviam em área endêmica (SAÉZ-ALQUÉZAR et al., 1998; WHO, 2014b).

Até o final do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, com exceção de algumas áreas da Região Sul (BARCELAR, 1963). Após esse período, o país adotou estratégias estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para erradicação da malária. A doença foi eliminada em diversos Estados e passou a ter seus menores índices no início da década de 1970, quando cerca de 52.000 casos foram registrados (LOIOLA et al., 2002).

No entanto, na Região Amazônica, ocorreu ascensão da incidência da malária no referido período, devido ao aumento populacional repentino e aos incentivos governamentais à colonização. Conseqüentemente, as mudanças na fitogeografia da região, criaram uma nova conjuntura epidemiológica, proporcionada pela construção de rodovias, pelas usinas hidrelétricas, pela pecuária e pelo garimpo (MCGREEVY et al., 1989; MARQUES; GUTIERREZ, 1994). Essa ocupação destruiu o hábitat dos vetores da malária e suas fontes de alimentação natural, fazendo com que esses vetores se deslocassem para regiões peridomiciliares e urbanas (DEANE, 1986).

Em 1999, ocorreu um surto de casos de malária no país, situação na qual a incidência da malária voltou a apresentar um aumento progressivo, atingindo aproximadamente 610.000 casos (BRASIL, 2009). No entanto, devido às intensas campanhas para o controle da malária nos últimos anos na Amazônia Legal, os casos diminuíram de 546.095 em 1990 para 305.639 em 2008. As mudanças mais significativas foram observadas nos Estados do Maranhão, Tocantins, Roraima e Pará, com uma queda de 37,6% entre os anos de 1999 e 2004. Porém, os casos de malária causados por *P. falciparum*, forma mais grave que pode levar ao óbito, vêm aumentando seu percentual nos Estados do Maranhão, Amapá, Rondônia, Amazonas e Pará (PORTAL SAÚDE, 2009).

Hoje, a concentração dos casos de malária está na Região Norte, e nos Estados que compõem a Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins), que respondem por 99% dos casos (WHO, 2005).

Na Região Extra-Amazônica, têm sido registrados casos de malária cada vez mais frequentes, tanto em decorrência dos casos autóctones quanto pela introdução da doença por migrantes infectados oriundos das áreas de transmissão (BRASIL, 2008), com maior representatividade de casos em Goiás, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Esses Estados receberam a maior proporção de casos “exportados” pela Região Norte do país (MARQUES; PINHEIRO, 1982). Traça-se, dessa forma, um cenário desafiador para o Ministério da Saúde, a fim de evitar a reintrodução da doença em áreas onde ela já foi erradicada e eliminar casos autóctones

esporádicos que ocorrem em áreas focais restritas dessas áreas (BRASIL, 2003). Somada a esse fato, a persistência dos vetores e carência de estrutura adequada para enfrentar o problema dos serviços de vigilância em saúde de alguns municípios, representa um risco contínuo de reintrodução da transmissão natural (BRASIL, 2008).

No Brasil, estima-se que a população em risco de infectar-se pelo plasmódio é de pelo menos 30%. No entanto, sabe-se que os dados oficiais não representam a totalidade dos casos, visto que nos locais mais remotos do país os infectados morrem antes mesmos de chegar ao hospital. Nos últimos dez anos, a maior porcentagem de população em risco foi durante os anos de 2003 a 2005 (PAHO, 2011). Isso porque, no ano de 2003, ocorreu um novo aumento da malária no país, tendo sido registrados 403.000 casos, e a ascensão se manteve em 2004 e 2005. Comparando-se o período de janeiro a junho de 2003 com o mesmo período de 2004, verificou-se uma elevação de 21,3% no número de casos, bem como uma maior participação do *P. falciparum* como agente causal (PAHO, 2011).

A incidência de malária no Brasil aumentou nas décadas de 70 e 80, devido, principalmente, aos projetos de colonização, expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração de madeira e mineração. Esses implementos de desenvolvimento foram implantados principalmente nos Estados que compõem a Amazônia Legal, causando um desequilíbrio ambiental e mantendo a malária como endemia de grande importância (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE, 2013), favorecida, principalmente, pelas condições ambientais e socioeconômicas da população local.

2.3 Malária no Estado do Maranhão

O Estado do Maranhão é um dos que compõem a Amazônia Legal, pertence à Região Nordeste e seu bioma é característico de zona de transição. A classificação de transmissão da malária é diferente de acordo com o bioma analisado, sendo de alto risco a região da Pré-Amazônia Maranhense; médio risco nas áreas próximas da Pré-Amazônia Maranhense;

e áreas de baixo risco, as quais atualmente compreendem a maior parte do Estado e cujo bioma preponderante é o Cerrado; e, por fim, as pequenas áreas sem transmissão da doença: Lençóis Maranhenses e Região Centro-Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Antes da entrada do Maranhão no Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), o Estado representava 10% de todos os casos registrados no país. Atualmente, o Maranhão apresenta uma tendência de redução nos níveis de transmissão de malária, sendo um dos Estados da Amazônia Legal com maior redução de casos dos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; MESQUITA et al., 2013). No entanto, ainda ocorrem focos da doença, principalmente relacionados à ocupação desordenada em áreas da periferia da cidade de São Luís. Pode ser exemplificado o foco ocorrido nos anos de 1999 a 2000, em um bairro recém-formado na época, a oeste do município de São Luís, em que foram notificados 129 casos. Constatou-se que a localidade era vulnerável, devido à migração de pessoas de outros bairros e de outros municípios do interior do Estado. O *P. vivax* foi o agente responsável pelas infecções e o *Anopheles aquasalis*, o vetor (XAVIER; REBÊLO, 1999).

Na Ilha de São Luís (composta pelos municípios de São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa), no ano de 1996, foram confirmados 450 casos de malária. No ano seguinte, foram registrados 1.283 casos, sendo 17 casos somente no pequeno município de Raposa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997; XAVIER; REBÊLO, 1999).

Em 2014, foram registrados 1.400 casos de malária no Estado do Maranhão, sendo 129 casos de *P. falciparum*, 1.234 de *P. vivax*, três de *P. malariae* e 33 de co-infecção de *P. falciparum* com *P. vivax*. Do total de casos, 22 foram registrados em São Luís, como sendo *P. vivax*. Em São José de Ribamar não teve registro de casos (SIVEP-Malária, 2014). No presente ano (2015), até o mês de junho, foram registrados 208 casos de malária no Estado, sendo 189 casos importados. A espécie com maior número de casos registrados foi *P. vivax*; e a com menor número foi *P. malariae*, com um caso. No mesmo ano, São Luís registrou dois casos da espécie *P. vivax*, no entanto, eram importados de outro Estado. Já, em São José de Ribamar, nesse período não houve registro de casos (SIVEP-Malária, 2015).

2.4 Malária em primatas não humanos

A dinâmica da transmissão da malária envolve a tríade: mosquitos vetores (espécies de *Anopheles*), protozoários parasitas (espécies de *Plasmodium*) e hospedeiros vertebrados. São conhecidas mais de 150 espécies de *Plasmodium* acometendo répteis, aves e mamíferos. Dessas, 29 parasitam primatas, humanos e não humanos (COATNEY; COLLINS; CONTACOS, 1971; GYSIN, 1998; LECLERC et al., 2004).

Dentre os hospedeiros vertebrados temos as aves, os répteis e diversos mamíferos, que são considerados hospedeiros finais de espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, excetuando-se os primatas não humanos. Ou seja, quando um anofelino infectado com plasmódio de humanos faz repasto sanguíneo e inocula os esporozoítos em uma ave ou em um roedor, essas formas evolutivas não sobrevivem no hospedeiro para infectar outro mosquito (BRUCE-CHWATT, 1965).

Os mecanismos de mudança e adaptação dos plasmódios de primatas não humanos para humanos ainda não são bem conhecidos, assim como seus hospedeiros e a enfermidade desenvolvida. O primeiro relato de malária simiana foi feita por Daniels, em 1908, em um macaco malaio. E, desde então, assumiu-se que não seria possível a transmissão entre primatas não humanos e humanos (VYTHILINGAM; HIL, 2013). Essa afirmação começou a ser desacreditada quando ocorreu um acidente de laboratório em Atlanta, Estados Unidos da América (EUA), em um experimento com *P. cynomolgi* (COATNEY, 1961). Em 1965, foi descrita infecção natural em um trabalhador (agrimensor) americano na selva da Malásia. Na época, o primeiro diagnóstico realizado nos EUA identificou *P. malariae*, porém mais tarde identificaram como *P. knowlesi* (CHIN et al., 1965).

Ao longo dos anos, já se comprovou que diversas espécies de *Plasmodium* de primatas não humanos podem infectar experimental (*P. schwetzi*, *P. rodhaini*, *P. inui*, *P. cynomolgy*, *P. brasilianum* e *P. simium*) ou naturalmente o ser humano (*P. cynomolgy*, *P. simium* e *P. knowlesi*) (COATNEY; COLLINS; CONTACOS, 1971).

Pela semelhança morfológica e genética entre as espécies que infectam humanos e primatas não humanos o diagnóstico é confuso, e pessoas que frequentam áreas com malária simiana podem se infectar com espécies de plasmódios simianos e obter um diagnóstico para espécies que ocorrem em humanos. Como exemplo, podem-se citar os casos que ocorreram na Ásia com *P. knowlesi*, nos quais o diagnóstico inicial era *P. falciparum*, ou com maior frequência, *P. malariae* (SINGH et al., 2004).

Relatos de casos de *P. knowlesi* demonstram que esse parasito emergente pode ser ainda mais abrangente pela Ásia, não sendo restrito a Malásia (COX-SINGH et al., 2008), mas ocorrendo também nas Filipinas (LUCHAVEZ et al., 2008), na Tailândia (JONGWUTIWES et al., 2004) e em Cingapura (NG et al., 2008).

O perigo de um diagnóstico equivocado está na severidade de cada espécie, porque, enquanto o *P. malariae* mostra baixa parasitemia (por parasitar hemácias velhas) e ser quartã (ciclo assexual de 72 horas), o *P. knowlesi* apresenta alta parasitemia (por parasitar todos os tipos de hemácias) e multiplicação diária, podendo causar a morte do hospedeiro (HELLEMOND et al., 2009).

Com o crescente número de casos de *P. knowlesi*, inquestionavelmente, é considerado como quinta espécie de *Plasmodium* que infecta os humanos. O parasito tem como hospedeiro natural *Macaca fascicularis*.

No Brasil, Deane et al. (1992) relataram infecção natural de um de seus colaboradores por *P. simium* em um trabalho de campo, sendo o primeiro caso dessa natureza no Continente Americano.

Nas Américas, diversos trabalhos com amostras de sangue de primatas neotropicais e de humanos coexistindo em áreas de floresta têm questionado a importância dos primatas neotropicais como reservatórios de malária humana (ARRUDA et al., 1989; CURADO et al., 1997; VOLNEY et al., 2002). Nesse continente, duas espécies causadoras de malária simiana são conhecidas, *P. brasilianum* e *P. simium*, semelhantes molecular e morfológicamente ao *P. malariae* e ao *P. vivax*, respectivamente. O primeiro, com vasta distribuição pelas Américas, Central e Sul (DEANE, 1964; FAUNDER et al., 2000; CHINCHILLA et al., 2006) e identificados em várias

espécies de primatas neotropicais (Família Cebidae, exceto *Aotus* e raramente exemplares de *Saguinus midas niger* – Callithricinae, classificação taxonômica de Perelman et al., 2011). O segundo, por sua vez, encontra-se restrito à Mata Atlântica na Região Sudeste e Sul do Brasil, tendo sido relatado nos Estados do Espírito Santo, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (DEANE, 1969) e somente nas espécies *Alouatta fusca*, *Brachyteles arachnoides* (DEANE, 1992) e *Alouatta caraya* (DUARTE et al., 2008). A identificação desses dois parasitas foi realizada por Deane e seus colaboradores em várias espécies de primatas neotropicais em diversos Estados brasileiros (DEANE; FERREIRA-NETO, 1973; DEANE, 1992). No entanto, a restrita distribuição de *P. simium* é questionada por alguns pesquisadores, levando-se em consideração que as descrições foram baseadas apenas em análises de microscopia de sangue periférico, método de sensibilidade limitada (DUARTE et al., 2008). Entretanto, mesmo com as atuais técnicas de biologia molecular, somente uma espécie de primata neotropical, *Alouatta caraya*, foi diagnosticada com *P. simium* (DUARTE et al., 2008).

Devido às semelhanças entre as duas espécies de plasmódio do Novo Mundo com as espécies de *Plasmodium* do Velho Mundo, levantam hipóteses sobre a origem da malária nas Américas. A hipótese mais defendida afirma que o gênero *Plasmodium* é recente no Continente Americano, tendo chegado com os primeiros colonizadores europeus que, por transferência lateral, passaram para os primatas neotropicais (CARTER; MENDIS, 2002). Outra hipótese, mas menos aceita, é a de que a malária já existia nas Américas, pelo fato de que nativos peruanos conheciam os efeitos da Cinchona (planta da qual se retira a quinina, antimalárico) e curavam as febres maláricas, transferindo o conhecimento para os jesuítas e colonizadores espanhóis. Com os conhecimentos atuais, sabe-se que essa hipótese não é conclusiva (CARTER; MENDIS, 2002).

Por outro lado, na África e Ásia não se questiona o sentido da transferência lateral de plasmódios primatas não humanos para humanos, mas o continente de origem do parasita. Uma hipótese considera, provavelmente, o surgimento de *Plasmodium* em primatas não humanos no Sudeste da Ásia, em virtude de uma maior variedade de espécies na região e

de lá teria se dispersado para a África e sofrido mutações para se adaptar aos novos hospedeiros, inclusive humanos (COATNEY, 1971). A outra hipótese é que a África seria a origem das espécies de *Plasmodium* e que teria se irradiado inicialmente para a Ásia e depois para a Europa, através da migração de primatas (BRUCE-CHWATT, 1965).

2.5 Anofelinos: mosquitos vetores

Pesquisas paleontológicas indicam que os Culicídeos existiam desde o Eoceno (40 a 60 milhões de anos atrás), mas particularmente se diferenciaram no Oligoceno (40 a 30 milhões de anos atrás). O ancestral do *Anopheles* teve um grupo isolado na separação intercontinental e diferenciação genética entre as espécies ocorreram. Devido a esse fato, acredita-se que os mosquitos anofelinos sejam os hospedeiros originais dos plasmódios, fato corroborado pela fase mais importante (a sexuada) que ocorre nesses invertebrados (BRUCE-CHWATT, 1965).

Existem catalogadas quase 500 espécies de anofelinos, mas apenas 70 são vetores do *Plasmodium* e 20 são importantes transmissores da malária ao homem. No Brasil, foram catalogadas 55 espécies de *Anopheles* spp. (REBÊLO et al., 2007).

Os vetores da malária pertencem ao Reino Animal, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Subclasse Pterygota, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae, Subfamília Anophelinae, gênero *Anopheles* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A classificação tradicional da subfamília Anophelinae inclui três gêneros: *Anopheles* (cosmopolita), *Bironella* (apenas na Austrália) e *Chagasia* (restrito a Região Neotropical). A maioria das espécies de anofelinos pertence ao gênero *Anopheles*, que é subdividido em seis subgêneros: *Anopheles* Meigen, 1818, *Kerteszia* Theobald, 1905, *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, *Cellia* Theobald, 1903, *Stethomya* Theobald, 1902, *Lophopodomyia* Antunes, 1937 (HARBACH, 2004).

Os anofelinos têm ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados em ambientes como os desertos e as florestas tropicais

(KISZEWSKI et al., 2004). Os criadouros de anofelinos geralmente possuem águas límpidas, com certa profundidade, sombreadas, com vegetação flutuante e com pouco teor de sais e matéria orgânica (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Os anofelinos são insetos com metamorfose completa (holometábolos Figura 3), passando pelas fases de ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa até adulto (FORATTINI, 2002).

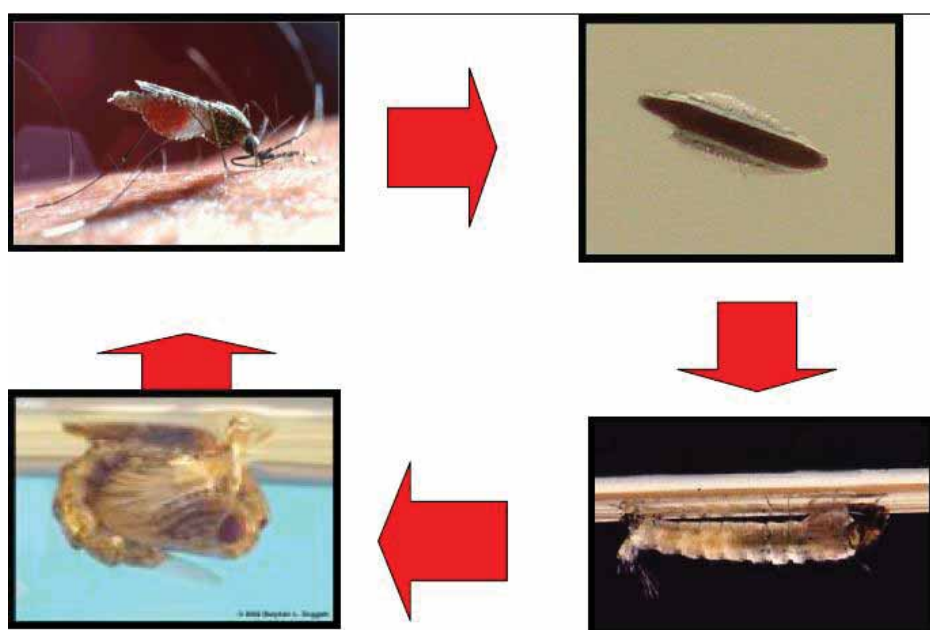


Figura 3. Fases do ciclo biológico de *Anopheles*: ovo, larva, pupa e adulto.
Fonte: Carmo (2006).

No Brasil, os subgêneros de mosquitos anofelinos de importância na transmissão de malária são *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*, sendo que, no primeiro, encontram-se as espécies consideradas vetores primários: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*; *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*; e espécies do complexo *albitarsis*; como *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara*, *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*; já, no segundo, destacam-se vetores primários e secundários, *Anopheles (Kerteszia) cruzii*; *Anopheles (Kerteszia) bellator* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus*. Existem outras espécies, a citar, *Anopheles (Nyssorhynchus) braziliensis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* e *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus*

importantes quando em grande densidade e em ambiente silvestre (FORATTINI, 2002).

A intensidade da transmissão da malária parece estar diretamente relacionada à competência e à capacidade vetorial da espécie anofelina local. Dessa forma, no Brasil, *Anopheles darlingi* é vetor primário, altamente susceptível aos plasmódios e capaz de transmitir malária dentro e fora das casas, mesmo quando sua densidade está baixa; caracteriza-se por ter maior sobrevivência que as outras espécies de anofelinos e pela sua antropofilia e endofilia, ou seja, as fêmeas preferem sugar sangue humano e dentro das habitações, o que favorece a transmissão. Invade os domicílios durante toda a noite e continua entrando nas residências, muitas vezes, até às dez horas da manhã (GALVÃO et al., 1942; DEANE, 1986).

Na Amazônia, onde ocorrem 99% dos casos de malária registrados no Brasil, a transmissão é devida somente às espécies de mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, sendo atribuída ao *A. darlingi* a transmissão da maioria dos casos. A espécie supracitada é o único anofelino no Brasil no qual foram detectadas infecções naturais pelos três plasmódios que causam malária humana nas Américas – *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (RACHOU, 1958; DEANE, 1986; 1989; ARRUDA et al., 1989; KLEIN et al., 1991).

A entomofauna de mosquitos na Região Amazônica vem avançando, paulatinamente, já que o último trabalho sistemático sobre a distribuição dos mosquitos, compreendendo toda a essa região foi realizado em 1961 por Cerqueira (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Mais escassas são as pesquisas com mosquitos com hábitos acrodendrofílicos (encontrados em copa de árvores) (LOPES et al., 1983; SOUTO, 1994), que desempenham importante função na malária simiana. Todavia, trabalhos contemporâneos têm fornecido valiosas informações a respeito desse grupo de mosquitos (SEGURA; CASTRO, 2007).

No Maranhão, diversas são as espécies vetoras de plasmódio. Na Ilha de São Luís, o vetor principal é o *A. aquasalis*, que utiliza água salobra (com teores significativos de cloretos) para se procriar. Sua importância como vetor está ligada à sua densidade, sendo um transmissor potencial quando numeroso. Na Baixada Ocidental, no município de Pinheiro, que apresenta

uma das maiores casuísticas de malária do Estado, já foram identificados *A. argyritarsis*, *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. galvaoi*, *A. triannulatus*, *A. evansae*, *A. strodei*, *A. braziliensis*, *A. nuneztovari*, *A. rondoni*. Em todas as áreas endêmicas do Estado, não houve muita variação do número e das espécies encontradas, mesmo em áreas litorâneas (OLIVEIRA-PEREIRA; REBÊLO, 2000).

O *A. aquasalis* é transmissor menos importante que o *A. darlingi*, porém, é considerado vetor primário da malária nas zonas áridas do Nordeste, em Belém e Amapá, além de ter sido várias vezes detectado com infecção natural nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (GALVÃO et al., 1942; DEANE et al., 1986; RACHOU, 1958). Suas larvas desenvolvem-se em criadouros terrestres com algum teor de cloreto de sódio, advindo daí seu nome específico. De modo geral, é um anofelino exofílico, e as fêmeas costumam ser mais zoófilas que antropófilas, procurando o sangue humano quando há escassez de outros animais que lhes sirvam para repasto sanguíneo; no entanto, no Nordeste, comporta-se como antropofílico. Em determinadas épocas e locais, esse mosquito pode se apresentar em elevadas densidades, o que favorece seu papel como vetor da malária (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Anopheles mediopunctatus e *A. shannoni* são na maioria das vezes encontrados alimentando-se em dossel (copa das árvores). *A. mediopunctatus* exibe predominante comportamento acrodendrófilo em regiões da Amazônia, com 85,5% das fêmeas capturadas na copa das árvores. São considerados vetores secundários e transmissores de *P. vivax* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; LUZ, 1996).

2.6 Anofelinos e malária simiana

Pouco se sabe a respeito da suscetibilidade natural das espécies de anofelinos aos plasmódios de primatas não humanos (VERHULST, SMALLEGANGE; TAKKEN, 2012). Alguns estudos vêm sendo realizados com intuito de se conhecer essa suscetibilidade e assim analisar a importância em Saúde Pública.

A identificação desses vetores nas florestas é importante quando se tenta o controle ou a erradicação de malária humana, porque, possivelmente, pode se transferir *Plasmodium* de primatas não humanos para humanos e vice-versa.

Para encontrar o seu hospedeiro vertebrado para repasto sanguíneo, mosquitos usam sinais físicos como calor, umidade e a visão, além de sinais químicos como dióxido de carbono e odor corporal (TAKKEN; KNOLS, 1999). Os mosquitos usam principalmente odor para distinguir os diversos hospedeiros (Figura 4).

Esses odores voláteis de humanos têm sido bastante estudados, sendo conhecidos 350 componentes (BERNIER et al., 1999; 2000; CURRAN et al., 2005; PENN et al., 2007; GALLAGHER et al., 2008). Por outro lado, menos conhecidos são aos odores de primatas não humanos, suas glândulas corporais e bactérias da pele associadas ao odores voláteis de atração dos mosquitos (SMALLEGANGE et al., 2011).

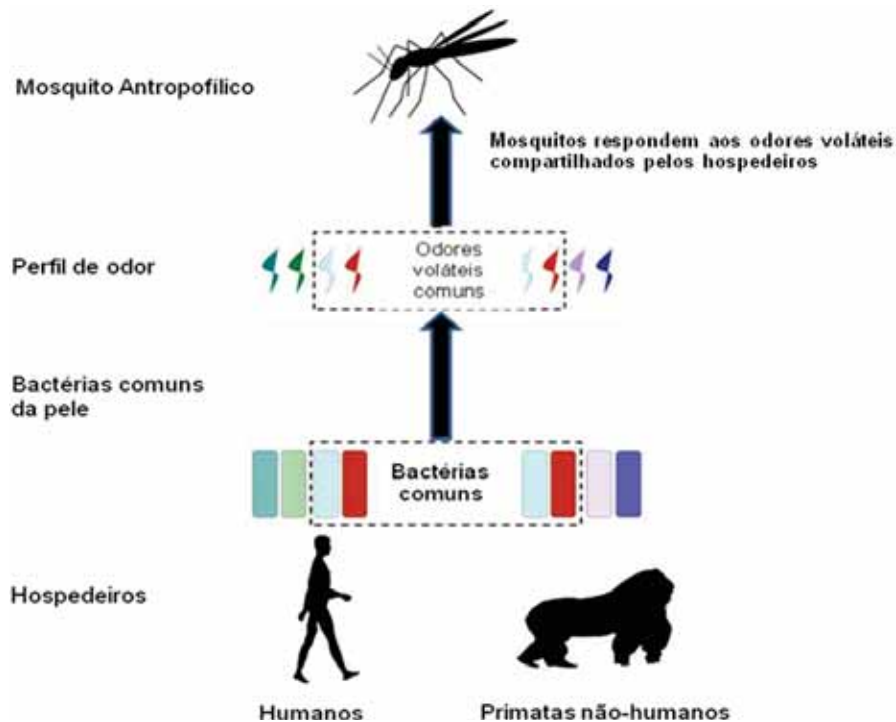


Figura 4. Interações entre mosquitos-hospedeiros e a possível resposta de mosquitos antropofílicos aos odores voláteis de hospedeiros humanos e primatas não humanos. Adaptado de Verhulst, Smallegange e Takken, 2012.

Pesquisas com infecções experimentais mostram as particularidades dos anofelinos aos plasmódios. Por exemplo, um chimpanzé infectado com *P. reichenowi* e exposto a picadas de anofelinos mostrou que as espécies de mosquitos *A. quadrimaculatus*, *A. stephensi*, *A. maculatus*, *A. dirus*, e *A. culicifacies* podem se infectar com esse parasita. Entretanto *A. gambiae* e *A. albimanus* foram refratários à infecção (BLACKLOCK; ADLER, 1922; COLLINS et al., 1986), o que sugere que nem todos os vetores de *P. falciparum* podem igualmente transmitir plasmódio de primatas não humanos.

Espécies acrodendrúfilas são importantes na avaliação da manutenção da malária simiana e na transmissão para o homem. Algumas espécies são particularmente estudadas pela sua inserção na ecoepidemiologia da malária humana e da sua presença em áreas de primatas neotropicais positivos para malária.

Anofelinos do gênero *Chagasia* são abundantes em dadas localidades com primatas neotropicais positivos para malária, no entanto, não se conhece bem a importância epidemiológica desse grupo (FERREIRA-NETO; DEANE; CARNEIRO, 1970; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). São mosquitos essencialmente silvestres, associados à existência de pequenos córregos, especialmente aqueles que descem das encostas das montanhas. Suas larvas criam-se protegidas da correnteza, entre as raízes e detritos vegetais existentes nas margens de riachos de fundo arenoso e águas límpidas. Os adultos são geralmente encontrados em áreas silvestres, preferindo ficar junto à copa das árvores (DEANE; FERREIRA-NETO; SITÔNIO, 1968; 1971; FERREIRA-NETO et al., 1970).

No Maranhão, nas áreas de pesquisa de plasmódio em primatas neotropicais capturou-se *Chagasia bonnae*, no solo e em plataformas junto à copa das árvores. Nestas últimas, a espécie foi mais numerosa e com primatas neotropicais positivos para malária. Porém, pelo fato da pesquisa vetorial ter sido realizada por curto período, os autores não puderam incriminar esses mosquitos como vetores da malária simiana local (FERREIRA-NETO; DEANE; CARNEIRO, 1970).

Características biológicas importantes dos vetores conhecidos da malária simiana são mostradas no trabalho de Vythilingam e Hii (2013) para vetores do Sul e Sudeste da Ásia. Espécies de *A. hackeri* são conhecidas por

picar apenas primatas não humanos e raramente atacar humanos. Também *A. latens*, vetor de malária humana no Leste da Malásia, têm se mostrado mais atraído por primatas não humanos em comparação com os seres humanos. Por outro lado, *A. cracens* é atraído para ambos os primatas e seres humanos (VYTHILINGAM; HII, 2013). Na ilha de Palawan, Filipinas, *A. balabacensis* foi mais atraído por armadilha, usando-se primatas não humanos como atração em comparação com carabao (búfalo) e uso de iscas humanas (MIYAGI, 1973; TSUKAMOTO; MIYATA; MIYAGI, 1978). Também nessa espécie foram encontrados oocistos e esporozoítos, mas não pôde ser confirmado se era de *Plasmodium* de primatas não humanos. No entanto, estudos de infecção realizados pelos mesmos autores revelaram que *A. balabacensis* é o vetor da malária símia em Palawan, Filipinas (TSUKAMOTO, MIYATA; MIYAGI, 1978).

Na Região extra-Amazônica, a espécie mais estudada é o *A. cruzii*, encontrado principalmente em regiões de Mata Atlântica, devido à presença de bromélias, as quais os mosquitos usam como hábitat (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). *Anopheles cruzii* e *A. bellator* são considerados vetores da malária, sendo o primeiro, o principal vetor da malária humana e simiana nessa região (DEANE et al., 1964; DEANE, DEANE; FERREIRA-NETO, 1966; DUARTE et al., 2008). A malária nessa área é chamada de "malária das bromélias", que pode ser considerada como uma zoonose, para a qual os primatas neotropicais possivelmente atuam como reservatórios (DEANE, FERREIRA-NETO; LIMA, 1984). Esses estudos têm mostrado que as fêmeas podem voar para ambiente antrópico, alimentar-se de sangue nas áreas internas do domicílio e peridomicílio, principalmente (KIRCHGATTER et al., 2014), e depois voltar para o ambiente natural (GUIMARÃES et al., 2000). Além disso, uma alta mobilidade vertical, com a distribuição do nível do solo para partes superiores da árvore, tem sido demonstrada (UENO, FORATTINI; KAKITANI, 2007).

Anopheles cruzii, tal como os demais *Kerteszia*, é muito oportunista e eclético. A presença de uma fonte sanguínea torna-o imediatamente excitado, independentemente do horário ou do tipo de hospedeiro. Esse anofelino ataca, indiscriminadamente, o homem, outros mamíferos e aves. É considerado um mosquito exófilo, porém, em muitas localidades do Sul do

Brasil e em épocas do ano de elevada densidade, invade as casas facilmente e com alta incidência, especialmente, aquelas situadas próximo às matas onde ele se cria. Em certas áreas de Santa Catarina, por exemplo, mais de 90% dos anofelinos capturados dentro das casas correspondem ao *A. cruzii*, mantendo uma média de mais de 20 exemplares picando um homem a cada hora (RACHOU, 1958; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

2.7 Métodos de diagnóstico da malária

2.7.1 Diagnóstico morfológico

Métodos mais sensíveis de diagnóstico sempre foram uma das mais importantes preocupações dos pesquisadores e de profissionais que trabalham com malária. Tradicionalmente, o diagnóstico morfológico é considerado padrão-ouro, pelo custo da técnica, que é baixo, e pela localidade das populações em risco, que geralmente não é assistida pelo poder público, como a africana e do Norte do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A visibilização do parasita é feita usando-se microscópio de luz e lâmina corada pelo método de Giemsa ou Walker. No entanto, o diagnóstico requer microscopistas treinados e experientes, os quais vêm se tornando cada vez mais difícil nos dias atuais, uma vez que os profissionais saem experientes em técnicas moleculares, sem conhecer de fato as características do parasito em lâmina. A técnica é realizada de maneira fácil, rápida e o diagnóstico é dado ainda em presença do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O exame objetiva a detecção e diferenciação das espécies de plasmódios. O exame microscópico do sangue pode ser feito em esfregaço delgado (distendido) ou na gota espessa, corados, consistindo na observação direta do parasita em sangue periférico ao microscópio de luz (BRAGA; FONTES, 2005).

Por ser de baixo custo, permitir identificar as espécies de plasmódios e quantificar a parasitemia em amostras de sangue de humanos, a técnica morfológica ainda é o padrão-ouro, segundo a Organização Mundial de Saúde

(OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2005). Em condições de campo, o que ocorre normalmente na maior parte das áreas malarígenas do mundo, a capacidade de detecção é de até 100 parasitas por cada microlitro de sangue (MYJAK et al., 2002).

Quando realizada em condições de laboratório e por microscopista experiente, pode-se detectar de 10 a 40 parasitas por microlitro de sangue. No entanto, a leitura das lâminas é demorada e frequentemente difícil de identificar acuradamente infecções mistas (RUBIO et al., 2002). Lâminas de gota espessa fornecem aumento de sensibilidade à microscopia e são mais sensíveis que o esfregaço sanguíneo para a detecção de baixos níveis de parasitemia (MOODY, 2002), além de serem usadas na quantificação do parasita.

2.7.2 Teste imunocromatográfico de diagnóstico rápido (TDR)

A imunocromatografia ocorre a partir da migração da fase líquida do sangue por uma membrana de nitrocelulose. Testes rápidos de diagnóstico da malária, por vezes chamado de "dipsticks" ou teste de diagnóstico rápido de malária (TDR), baseiam-se na detecção de antígenos específicos (proteínas) produzidas por parasitas da malária. Esses antígenos estão presentes no sangue de pessoas infectadas ou recém-infectados pelo plasmódio. O TDR identifica a presença do parasita (antígeno) ou anticorpos contra o parasita por uma mudança de cor em uma tira de nitrocelulose absorvente. Alguns TDR podem detectar apenas *Plasmodium falciparum*, geralmente através da detecção da proteína rica em histidina-2 (HRP2, sigla em inglês) específico da espécie, ou a proteína lactato desidrogenase (pLDH) específica do gênero *Plasmodium* (WHO, 2004). A enzima pLDH é expressa em altos níveis nos estágios de trofozoítos e esquizontes do ciclo eritrocítico do parasita (CHATTOPADHYAY, 2003).

No diagnóstico inicial, podem-se detectar os níveis de pLDH correspondente à densidade do parasita (MAKLER; HINRICHS, 1993). No entanto, há decréscimo dos níveis dessa enzima no sangue do hospedeiro

com o início do tratamento, consequência de redução da parasitemia. Dessa forma, pode-se também utilizar a pLDH para monitoramento da parasitemia durante o tratamento (CHATOPADHYAY, 2003).

Outros testes podem detectar uma ou mais das outras espécies de malária humana, por meio da detecção de vários outros antígenos. Os TDR geralmente vêm em três formatos diferentes. A forma mais simples é um “dispstick”, onde o sangue e o tampão são colocados em poços e migram pela fita de nitrocelulose. Cassetes e cartões tendem a ser mais caros, mas mais simples de usar. Alguns produtos podem ter sensibilidade semelhante àquela comumente conseguida por microscopia (~100 parasitas/ μ L). A sensibilidade dos testes recomendáveis pela OMS é de 95% ou de 100 parasitas/ μ L para *P. falciparum* (WHO, 2004).

A padronização de um teste imunocromatográfico é importante, porque pode ser utilizado como um dos exames de quarentena de primatas. Para tal, apenas uma gota de sangue do primata será colocada para ser testada, podendo ser realizado por qualquer profissional, não necessitando de laboratorista experiente para avaliação de rotina. O teste também pode ser usado para a diferenciação de *P. falciparum* e outras espécies de plasmódios e para o acompanhamento da terapia contra a malária.

2.7.3 Diagnóstico sorológico

Testes sorológicos são usados desde a década de 60 para diagnóstico de malária. Na época, significaram um grande avanço para a pesquisa diagnóstica (BRUCE-CHWATT, 1985). O teste sorológico usado como padrão para detecção de anticorpos é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Também o ELISA-teste é aplicado em triagem em hemocentros e em estudos epidemiológicos (DODERER et al., 2007). Na prática clínica, a sorologia não se aplica ao diagnóstico da malária aguda (DRAPER; SIRR, 1980). Essa limitação se deve ao tempo de produção de anticorpos, que pode ocorrer em uma ou duas semanas após infecção inicial e persistir somente por três a seis meses (BRUCE-CHWATT, 1985; DODERER et al., 2007).

Para a realização da RIFI não há padronização de reagentes e de produção de antígeno em laboratórios de referência, tornando muito complicada a harmonização de resultados entre laboratórios (DODERER et al., 2007).

O ELISA-teste é baseado na ligação de antígeno-anticorpo. Anticorpos anti-*Plasmodium* spp. presentes em amostra de soro são ligados a antígenos fixados em placas. Os antígenos podem ser preparados a partir da extração total de cultura (das espécies cultiváveis *in vitro*) ou a partir das formas assexuadas das diversas espécies de plasmódio (OH et al., 2008), ou de uma fração do parasita, como proteínas de roptrias. No entanto, a maioria dos kits comerciais são para diagnóstico de *P. falciparum*. Essa limitação é compreensível, visto que essa é a única espécie de plasmódio que infecta humanos que pode ser mantida em cultura. As outras espécies dependem de infecções em primatas de laboratório.

2.7.4 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares vêm se popularizando em diversos ramos de pesquisas, em virtude da sua sensibilidade e especificidade. No diagnóstico para malária, podem ser usadas como métodos auxiliares na microscopia e para avaliar o desempenho de novos testes diagnósticos (CICERON et al., 1999).

A técnica é muito útil quando há necessidade de examinar com precisão um grande número de amostras, por exemplo, em diversos estudos epidemiológicos; em experiências clínicas, terapêuticas e de imunização; na triagem de doadores de sangue e na detecção de vetores em áreas endêmicas para diversos patógenos e da fonte alimentar dos mesmos. É, principalmente, útil no diagnóstico de infecções mistas de plasmódios e no monitoramento da resposta do paciente às drogas antimaláricas (MAKLER et al., 1998).

A maior vantagem das técnicas moleculares é a capacidade de detectar infecção com baixas parasitemias e linhagens associadas com diferentes surtos de malária (MAKLER et al., 1998). Em alguns protocolos da

PCR, a sensibilidade para detectar DNA de *Plasmodium* é menor que dois parasitas por microlitro de sangue (MYJAK et al., 2002). A PCR em tempo real tem demonstrado alta sensibilidade na detecção de plasmódio, identificando de um a cinco parasitas/ μ L, além de trazer a vantagem da quantificação e dos resultados demonstrados em gráficos (HAN et al., 2007).

A PCR em tempo real apresenta como vantagem a não manipulação do seu produto para gerar resultados, visto que esse passo, depois da amplificação, pode gerar contaminações. Porém, o diagnóstico de malária por esse método ainda está centralizado em instituições de pesquisa. Essa técnica é de grande interesse em centros especializados em receber viajantes, que retornam de áreas endêmicas infectados com baixa parasitemia, em doadores de sangue ou em órgãos destinados a transplantes (DE MONBRISON et al., 2003). No entanto, essa técnica ainda apresenta a desvantagem de ser de alto custo e precisar de infraestrutura para manuseio, não devendo substituir as ferramentas diagnósticas de baixo custo utilizadas nas rotinas laboratoriais (DE MONBRISON et al., 2003).

Outra técnica molecular moderna é a reação de amplificação isotérmica do DNA, conhecida pela sigla em inglês LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification of DNA*). Trata-se de uma técnica de biologia molecular de nova geração que identifica seis regiões alvos do gene trabalhado, usando quatro distintos oligonucleotídeos e, para acelerar a reação, pode ser utilizado ainda mais um par de oligonucleotídeos. Utiliza também uma enzima capaz de deslocar a cadeia de DNA, sem a necessidade de mudanças de temperatura (desnaturação, anelamento e extensão). Por isso, o processo é chamado de isotérmico, ou seja, a reação ocorre a uma temperatura constante em todos os ciclos (ZHANG, LOWE; GOODING, 2014). O LAMP foi criado para aperfeiçoar os resultados de diagnósticos clínicos e para ser usado em campo, podendo inclusive descartar a extração inicial de DNA das amostras e o uso de termocicladores. Vem sendo usado na triagem de amostras-teste devido a sua alta sensibilidade e especificidade, maior que a PCR convencional e em tempo real (PARIDA, 2008), podendo detectar um femtograma de DNA na amostra-teste, enquanto a PCR detecta um nanograma (DHARMA et al. 2014).

A técnica foi criada em 2000 por pesquisadores japoneses, e baseia-se no uso de oligonucleotídeos: externos (n=2), chamados de B3 e F3 (do inglês, *backward outer* e *forward outer*, respectivamente); internos (n=2), chamados de BIF e FIP (do inglês, *backward inner primer* e *forward inner primer*, respectivamente); e os aceleradores da reação, chamados de LFP e LBP (do inglês, *loop forward primer* e *loop backward primer*, respectivamente). Utiliza ainda enzimas que têm a capacidade de separar a dupla fita de DNA, podendo ser a *Bst* polimerase (isolada de *Bacillus stearothermophilus*) ou a *Bsm* (*Bacillus smithii*). No entanto, essas enzimas não têm atividade de exonuclease (5' – 3') como a DNA polimerase e tem atividade catalítica. A enzima mais usada é a *Bst* polimerase (DHAMA et al. 2014). Também são necessárias na reação as dNTP's, fosfato de magnésio (que forma pirofosfato de magnésio durante a reação e possibilita a visualização dos resultados pela turbidez dos produtos (DHAMA et al., 2014). A amplificação do DNA ocorre em duas etapas, uma não cíclica e outra cíclica. Inicia-se na fase não cíclica com produção de DNA com alças ("stem-loops") que se torna linear com o anelamento de BIP. Depois ocorre a formação de moldes de DNAs que servem de molde inicial para a fase seguinte (cíclica).

A padronização de um protocolo pela técnica de LAMP, voltada para amostras de primatas não humanos, seria um grande avanço, visto que poderia ser utilizada em pesquisas de campo, uma vez que o uso da técnica não necessariamente precisa de extração de DNA inicial, podendo ser realizada em um único passo (extração e amplificação) e em um único aparelho.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais e em anofelinos nos municípios de São Luís e São José de Ribamar, Ilha de São Luís, Estado do Maranhão.

3.2 Específicos

- Identificar as espécies de *Plasmodium* spp. por meio de técnicas moleculares (LAMP, PCR convencional e PCR em tempo real) e microscópicas (gota espessa e esfregaço sanguíneo) em amostras de sangue de primatas neotropicais;

- Avaliar a frequência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. em primatas neotropicais de vida livre e de cativeiro da Ilha de São Luís;

- Padronizar um ELISA-teste usando antígenos solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei*;

- Identificar as espécies de anofelinos presentes no domicílio, peridomicílio e área de mata dos locais de colheita de sangue de primatas neotropicais;

- Analisar por técnicas moleculares a presença de *Plasmodium* spp. em anofelinos;

- Identificar as fontes alimentares de anofelinos amostrados pela PCR convencional.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Os protocolos de pesquisa usados nesta tese foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob o Protocolo nº011.480/12, e tiveram autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade para a realização das atividades, licença nº 34.282-2.

4.2 Áreas de estudo

O Estado do Maranhão situa-se na porção ocidental da Região Nordeste, tendo como limites: ao Norte, o Oceano Atlântico, ao Sul, o Estado do Tocantins; a Leste, o Estado do Piauí; e a Oeste, os Estados do Pará e Tocantins. É caracterizado fitogeograficamente como uma zona de transição entre a Floresta Amazônica, o Cerrado e a Caatinga. O clima é tropical, com umidade relativa do ar geralmente acima de 80% e temperaturas elevadas, em torno de 26 graus, durante todo o ano. É cortado por 12 bacias hidrográficas e faz parte dos nove Estados que compõem a Amazônia Legal. Possui área de 331.936.948 km², população de 6.574.789 habitantes e densidade demográfica de 19,81 habitantes por km² (IBGE, 2010). É um Estado coberto por uma vegetação composta por Mata de Cocais, campos inundáveis, mangues, Cerrado e Floresta Amazônica (SILVA et al. 2009), características que favorecem a proliferação do mosquito vetor da malária (COX, 2002), perpetuando essa doença como endemia de maior impacto no Estado.

A maioria dos casos de malária ocorre na região chamada de Amazônia Maranhense, composta pela Ilha de São Luís e Baixada Ocidental (OLIVEIRA-PEREIRA; REBÊLO, 2000).

As colheitas das amostras de sangue de primatas neotropicais e as capturas de anofelinos foram realizadas em dois municípios da Ilha de São Luís, São José de Ribamar e São Luís. Em São Luís, as colheitas de sangue de primatas neotropicais ocorreram no Centro de Triagem de Animais

Silvestres do IBAMA (CETAS/São Luís-MA), e as capturas de anofelinos no Sítio Mangalho, localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Maracanã. Em São José de Ribamar, as capturas e colheitas de sangue de primatas neotropicais e capturas de anofelinos ocorreram na reserva Particular Sítio Aguahy.

Todos os pontos foram localizados por um dispositivo com o sistema de posicionamento global (GPS) Garmim eTrex Vista®.

4.2.1 Centro de Triagem de Animais Silvestres de São Luís

O CETAS de São Luís ($2^{\circ}56' S$ e $44^{\circ}21'$, Figura 5) é ligado ao Núcleo de Fauna da Superintendência do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) no Estado do Maranhão. Tem função de receber, identificar, triar, recuperar, reabilitar e destinar animais silvestres apreendidos pela fiscalização, provenientes de resgates e de entrega voluntária.

Durante os anos de 2009 a 2014 realizaram-se colheitas de sangue de primatas neotropicais recebidos pelo CETAS-São Luís.



Figura 5. Vista aérea das instalações do CETAS de São Luís-MA (à esquerda) e imagem da entrada do centro (à direita). Fonte: Digital Globe.

4.2.2 Reserva Particular Sítio Aguahy, São José de Ribamar

Os primatas de vida livre foram capturados na Reserva Particular do Sítio Aguahy ($2^{\circ}38'76''S$, $44^{\circ}08'22''W$), no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, Brasil. A área possui 600 hectares (Figura 6), composta de manguezais (120 ha), restinga (50 ha) e fragmentos de Floresta Amazônica. Apesar de ser uma das áreas mais preservadas da Ilha de São Luís, sofre intensa pressão humana de seis comunidades existentes no entorno da reserva e estas frequentam a área para atividades de lazer e pesca. É usada para estudos entomológicos e etológicos de diversas espécies de animais, especialmente de aves e de primatas. As espécies de primatas que são nativas da área são *Saimiri sciureus* e *Sapajus* spp.

Essa área é utilizada pelo IBAMA-MA desde 2005 para soltura de animais, dentre eles, grupos de *Saimiri sciureus* e *Sapajus* spp.

Nessa reserva, foram realizadas as atividades de capturas de primatas (2011-2014) e de anofelinos (janeiro, junho e julho de 2013).

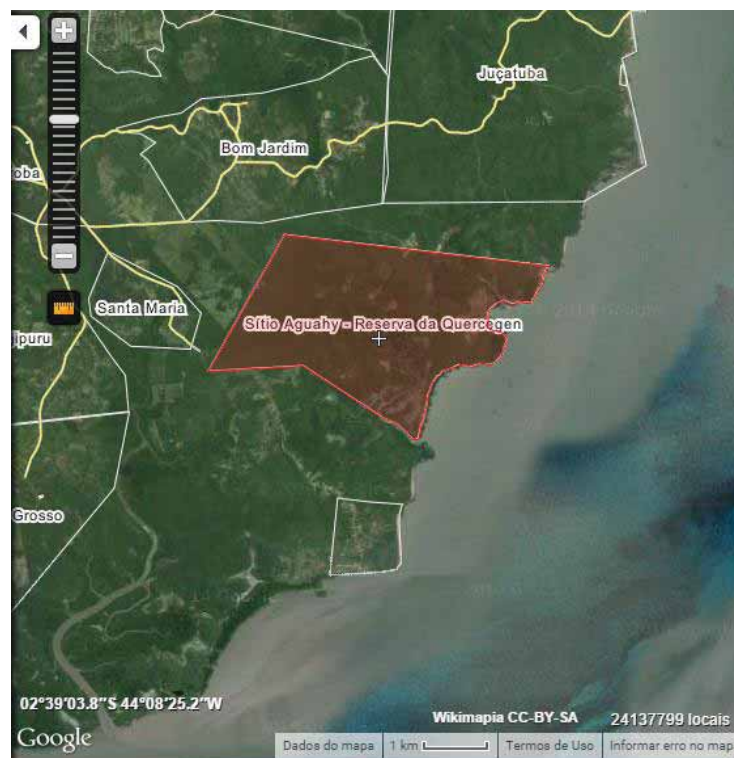


Figura 6. Imagem de satélite da Reserva Particular Sítio Aguahy mostrando a delimitação da reserva. Fonte: Google Maps.

4.2.3 Sítio Mangalho, Área de Proteção Ambiental do Maracanã (APA), São Luís

O Sítio Mangalho fica localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) do Maracanã (Figura 7), zona rural do município de São Luís. É uma propriedade particular ($2^{\circ}36'11.31''\text{S}$ e $44^{\circ}17'50.82''\text{O}$), que possui aproximadamente 11ha (PEREIRA, 2013). Como em toda a Ilha de São Luís, a temperatura média da APA é de 26°C (FARIAS FILHO, 2010).

O Sítio Mangalho faz parte da rota diária de grupos de *Sapajus* sp. e *Saimiri sciureus*, espécies comuns na APA do Maracanã, que estão sempre sendo avistados pelos moradores. Também possui coleção artificial de água, que pode favorecer a proliferação do mosquito vetor da malária.



Figura 7. Imagem de satélite da Ilha de São Luís do Maranhão identificando a localização do Sítio Mangalho na APA do Maracanã, município de São Luís.

4.3 Espécies amostradas

Foram amostrados 161 primatas neotropicais no CETAS de São Luís e no Sítio Aguahy (São José de Ribamar) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de primatas neotropicais amostradas no período de 2009-2014, nome comum, local de captura e sexo.

Espécies	Nome comum	Local de captura*	Sexo	Total
<i>Aotus infulatus</i>	Macaco-da-noite	CETAS	1F	01
<i>Chiropotes satanas</i>	Cuxiú	CETAS	1M	01
<i>Sapajus</i> spp.	Macaco-prego	CETAS (89) e Sítio Aguahy (17)	61 M/45F	106
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagüi	CETAS	12M/7F	19
<i>Saimiri sciureus</i>	Capijuba	CETAS (21) e Sítio Aguahy (3)	17M/7F	24
<i>Saguinus midas niger</i>	Soim	CETAS	5M/5F	10
Total			96M/65F	161

*O número entre parênteses indica a quantidade de primatas neotropicais amostrada em cada local de captura. M-macho, F-fêmea.

4.4 Captura de primatas

A captura dos primatas neotropicais mantidos em cativeiro (*ex situ*) foi realizada de duas formas:

- Para Callithrichinae, a contenção física foi realizada com puçá seguida de contenção química;
- Para Cebinae e Aotinae, a contenção física foi realizada com gaiola de parede móvel e, em seguida procedeu-se a contenção química.

Os animais de vida livre (*in situ*) do Sítio Aguahy foram capturados por armadilhas tipo “Tomahawk”, que possuem sistema de trampa, que fecha a porta da armadilha quando acionada pela peso do animal, em uma pequena plataforma localizada no meio desta. Os animais foram atraídos por iscas como frutas (manga, banana e mamão) e milho verde colocadas no fundo da gaiola.

Antes de montar as armadilhas, informações foram obtidas com funcionários da reserva referentes aos locais de avistamento e uso das trilhas pelos primatas neotropicais.

Os animais eram observados com o uso de binóculos e, assim capturados pela armadilha tipo “Tomahawk”, foram transferidos para gaiola de parede móvel para proceder à anestesia.

4.5 Contenção física e química

Após contenção física, foi aplicada injeção intramuscular da associação de Cloridrato de Zolazepam e Cloridrato de Tiletamina (Zoletil®) na dose de acordo com a espécie, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Dosagens anestésicas da associação de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam (Zoletil®) aplicadas via intramuscular para a imobilização química de diferentes espécies de primatas neotropicais.

Subfamílias*	Espécies	Dose (mg/kg)
Cebinae	<i>Sapajus</i> spp. <i>Saimiri sciureus</i>	4,4
Callithrichinae	<i>Callithrix jacchus</i> <i>Saguinus midas niger</i>	2,2
Aotinae	<i>Aotus infulatus</i>	4,0
Pitheciinae	<i>Chiropotes satanas</i>	4,4

*Classificação taxonômica de primatas de acordo com Perelman et al. (2011).

4.6 Colheita de amostra biológica de sangue

A colheita de sangue de primatas neotropicais foi realizada por meio de venopunção da veia jugular (Figura 8) ou femoral, após a assepsia do local, usando-se agulhas (13 x 4,5 mm a 25 x 7 mm) e seringas de 1mL ou

5mL, sendo respeitado o volume de sangue a ser colhido de acordo com o peso do animal.



Figura 8. Colheita de sangue em primata neotropical sob efeito de contenção química: A – venopunção da veia jugular de *Sapajus* sp.; B – venopunção da veia femoral de *Saimiri sciureus*.

Parte do sangue colhido foi depositada em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para uso na PCR e no LAMP, e outra parte em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro, a ser utilizado na RIFI e no ELISA-teste. As amostras de sangue e soro foram mantidas a -20°C .

Ainda com o animal sedado, foi realizada a assepsia da polpa digital com algodão embebido em álcool iodado e, com uma lanceta, foi feita punção digital (Figura 9), e as gotas de sangue foram depositadas em lâminas de vidro.

Após a colheita de sangue os animais foram microchipados e aplicada tinta vermelha de longa duração (Raidex[®], Alemanha) no dorso dos animais (Figura 10), para identificar à distância aqueles que já haviam sido capturados.



Figura 9. Espécime de *Sapajus* sp., macho, capturado no Sítio Aguahy, município de São José de Ribamar-MA, marcado com tinta vermelha após colheita de sangue.



Figura 10. Punção digital em exemplar de *Saimiri sciureus* para o preparo das lâminas de esfregaço sanguíneo e gota espessa.

A Figura 11 apresenta o fluxograma com o número de amostras processadas pelas técnicas empregadas na pesquisa. O número de amostras de soro foi inferior ao número de amostras de sangue total colhidas, porque, em alguns espécimes de Callithrichinae, não foi possível colher um volume suficiente para separação de soro.

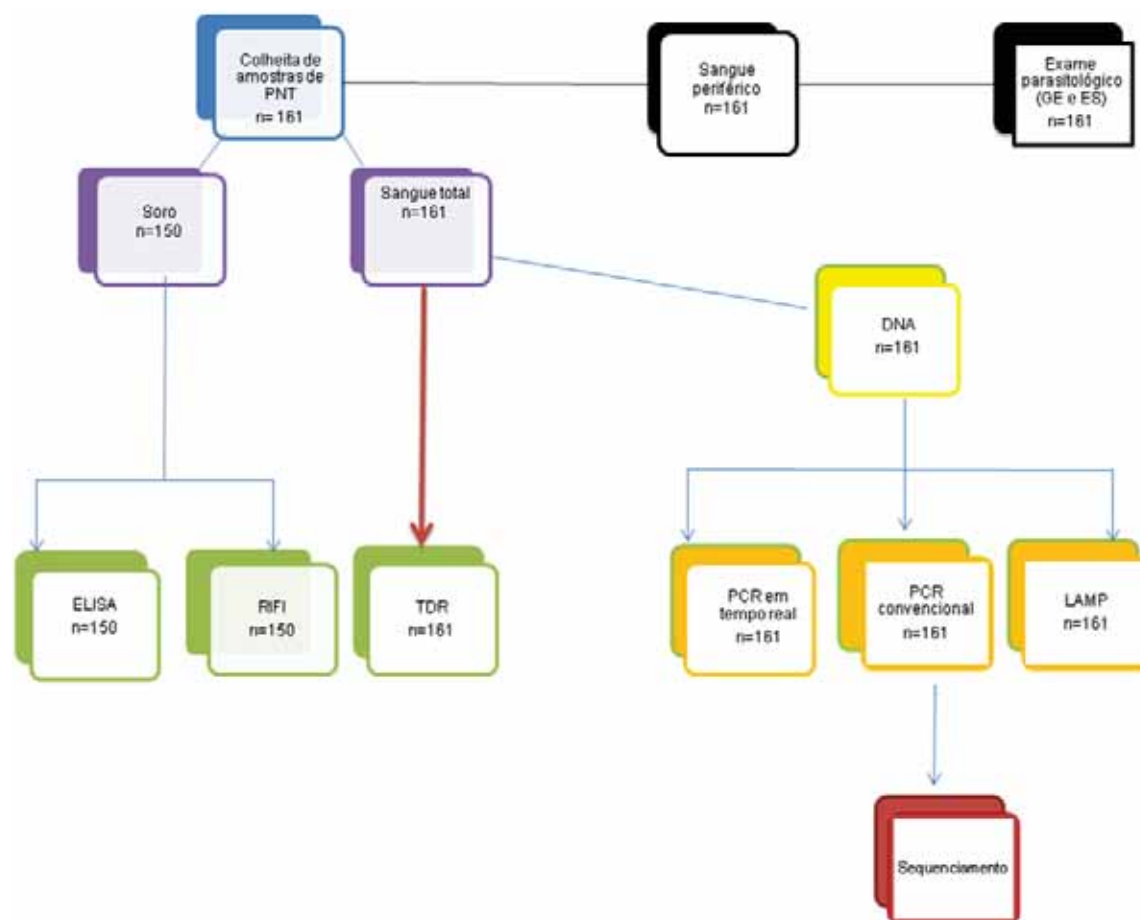


Figura 11. Fluxograma com o número de amostras de sangue colhidas e os respectivos exames realizados no período 2009 a 2015.

4.7 Captura e identificação de anofelinos

Nos meses de janeiro, junho e julho de 2013, realizaram-se as capturas de anofelinos na Reserva Particular Sítio Aguahy (São José de Ribamar), no Sítio Mangalho e no CETAS-São Luís.

Para tanto, contou-se com a colaboração técnica da equipe de campo da Superintendência Estadual da Fundação Nacional de Saúde no Maranhão (FUNASA-MA) que forneceu treinamento de captura de anofelinos, usando atração humana protegida (técnica de rotina em suas atividades).

As capturas de fêmeas adultas de anofelinos ocorreram no período de 17h 30 min às 21 h 30 min, sendo realizadas durante cinco a seis dias consecutivos. Foram usadas armadilhas luminosas tipo “CDC” (Figura 12), atração humana protegida com aspiradores de sucção tipo Castro (Figura 13)

e armadilha Shannon com isca luminosa (Figura 14), na parte externa do domicílio, no peridomicílio e nas áreas de mata das reservas.



Figura 12. Armadilha tipo CDC montada no Sítio Aguahy, São José de Ribamar-MA: A – armadilha sendo colocada na copa das árvores; B- ponto de captura de anofelinos próximo à coleção de água.



Figura 13. Demonstração do uso do capturador de sucção tipo Castro (seta grossa) e transferência do mosquito diretamente para a gaiola telada de armazenamento (seta fina).



Figura 14. Armadilha Shannon montada em trilha do Sítio Aguahy, São José de Ribamar, Estado do Maranhão.

A seleção dos pontos de capturas de anofelinos em área de mata obedeceu aos seguintes critérios: proximidade de coleções de água e passagem de primatas neotropicais.

Para cada local de captura, foi marcado o ponto no GPS e mensuradas a umidade relativa do ar (URA) e a temperatura. Também foi observado se nas coleções de água havia larvas de mosquitos (Figura 15).



Figura 15. Pesquisa de criadouros de anofelinos em área de mangue no Sítio Aguahy, São José de Ribamar, Maranhão: A – área de mangue no período seco (janeiro de 2013); B – mangue bem próximo da área de praia.

No Sítio Aguahy (São José de Ribamar), as capturas foram realizadas em seis pontos de capturas: dois com armadilha tipo CDC; e quatro com atração humana protegida.

Os pontos de captura dos mosquitos no Sítio Aguahy podem ser vistos nos mapas da Figura 16.



Figura 16. Imagem dos pontos de capturas de anofelinos no período de junho a julho de 2013, no Sítio Aguahy, São José de Ribamar-MA: A – imagem de satélite dos pontos de capturas; B - Lagunho artificial (área de mata aberta), primeiro ponto de captura no Sítio Aguahy. Nesse ponto, foi utilizada atração humana protegida; C – armadilha luminosa tipo CDC colocada a dois metros do solo, na parte do córrego que leva água ao lagunho artificial; URA de 86% e temperatura de 26,7°C; Coordenadas 02.644.35'S, 04.413.955'O.

No Sítio Mangalho, Área de Proteção Ambiental (APA) do Maracanã, (São Luís), as capturas foram realizadas em três pontos no período das 16 horas às 22 horas. A distribuição dos pontos de capturas foi: parte externa da residência (varanda), usando-se atração humana protegida; peridomicílio, no qual os primatas não humanos usavam para forragear, utilizando armadilha tipo CDC; e, por fim, no extremo da propriedade, onde havia uma piscina rústica de pedras, que tinha contato com um braço de rio que passa na

propriedade. Nesse último ponto, foi usada a armadilha tipo Shannon com isca luminosa e também cinco pessoas usadas como atração humana protegida (Figura 17).



Figura 17. Captura de anofelino no Sítio Mangalho, localizado na APA do Maracanã, São Luís, Maranhão, no mês de julho de 2013. Armadilha Shanonn com o uso de isca luminosa e iscas humanas protegidas.

No CETAS-São Luís, o ponto de captura de anofelinos foi na margem do Rio Paciência que passa bem próximo ao CETAS (40 metros de distância).

Os anofelinos capturados foram colocados vivos em uma gaiola telada, devidamente identificada por data e local da captura. Foram transportados cuidadosamente em caixas de isopor, evitando que os mesmos se debatessem muito contra as paredes da gaiola e, assim, ocasionassem perdas de escamas, que inviabilizassem a identificação da espécie.

Os trabalhos de identificação dos mosquitos foram realizados pelos técnicos da FUNASA-MA para os mosquitos capturados no Sítio Aguahy e pelo biólogo Agostinho Cardoso Nascimento, para os anofelinos capturados no Sítio Mangalho.

Resumidamente, os mosquitos foram eutanasiados com acetato de etila e, em seguida, a identificação foi realizada conforme chave de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Em seguida, dez espécimes foram armazenados em “pool” em microtubos (livres de DNase e RNase) com álcool isopropílico para realizar testes moleculares. Os “pools” de anofelinos eram formados por mosquitos da mesma espécie, data e local de captura. Quando era identificado apenas um exemplar de uma espécie, este era armazenado sozinho. Cada microtubo foi identificado com o nome da espécie, data e local de captura. O fluxograma abaixo indica a ordem de processamento dos exemplares mosquitos (Figura 18).

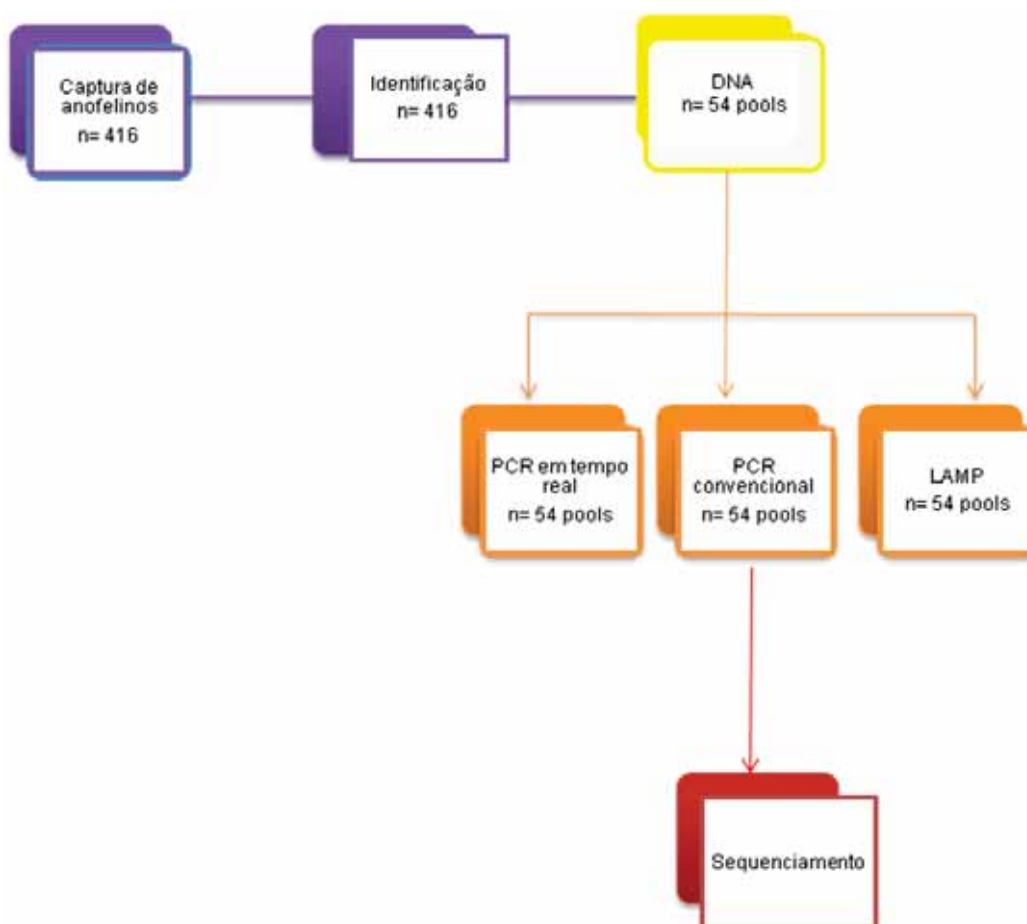


Figura 18. Fluxograma dos trabalhos realizados com os anofelinos, desde a captura até o processamento das amostras de DNA.

4.8 Processamento das amostras

4.8.1 Confeção de lâminas de esfregaço sanguíneo e gota espessa

Para a confecção das lâminas de gota espessa, as amostras de sangue foram espalhadas em forma de quadrado (dois por lâmina) e, para as lâminas de esfregaços sanguíneos, as amostras de sangue foram distendidas.

Depois de secas, as lâminas foram coradas:

- Esfregaço sanguíneo: foram fixadas pelo metanol (Synth®, São Paulo, SP) por dois minutos e coradas, de forma invertida, com Giemsa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluído em água tamponada por 35 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e, após secarem, foram observadas em microscópio de luz com objetiva de imersão (100x) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

- Gota espessa: foram imersas em solução azul de metileno tamponado fosfatado para desesoglobulinização por 5 segundos. Em seguida, foram lavadas delicadamente em água destilada e coradas por sete minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluído em água tamponada (3 gotas/mL). Em seguida, foram lavadas em água corrente e, após estarem secas, foram observadas em microscópio de luz com objetiva de imersão (100x) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As lâminas foram observadas, inicialmente, no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal. As lâminas com formas sugestivas de *Plasmodium* foram novamente analisadas no Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN), pela Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi.

4.8.2 Diagnóstico imunocromatográfico – Teste de Diagnóstico Rápido (TDR)

As amostras de sangue total de primatas não humanos foram testadas para pesquisa de antígeno de *Plasmodium* spp. usando-se o “First

Response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo *P.f.* and PAN Detection Card Test” (Premier Medical Corporation Ltd, Kachigam, Nani Daman, India). O procedimento foi realizado de acordo com o fabricante. As amostras de sangue a serem testadas foram deixadas à temperatura ambiente por cinco minutos. Depois, 5µL de sangue foram adicionados no orifício específico, seguido de duas gotas do tampão (fornecido pelo kit) depositadas no poço específico do teste (Figura 19).

A leitura foi realizada após 20 minutos, observando-se a reatividade da membrana marcada com dois anticorpos monoclonais (contra pLDH e HRP2 de *P. falciparum*) em duas linhas separadas com uma faixa distinta. O teste é formado por zonas: a primeira zona corresponde ao controle positivo da reação; a segunda zona contém anticorpos monoclonais contra a pLDH, pan-específicos, indicando resultado positivo para uma das espécies de *Plasmodium* (*P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* ou *P. ovale*); a terceira zona contém anticorpo monoclonal contra HRP2 de *P. falciparum*.

A interpretação seguiu as instruções do fabricante: resultado negativo – linha somente na zona do controle; positivo para *P. falciparum* – linha na zona do controle e na zona de anticorpo contra *P. falciparum*; positivo para não *P. falciparum* - linha na zona do controle e na zona de anticorpo pan-específico; e teste inválido, ausência de reatividade na altura do controle positivo.

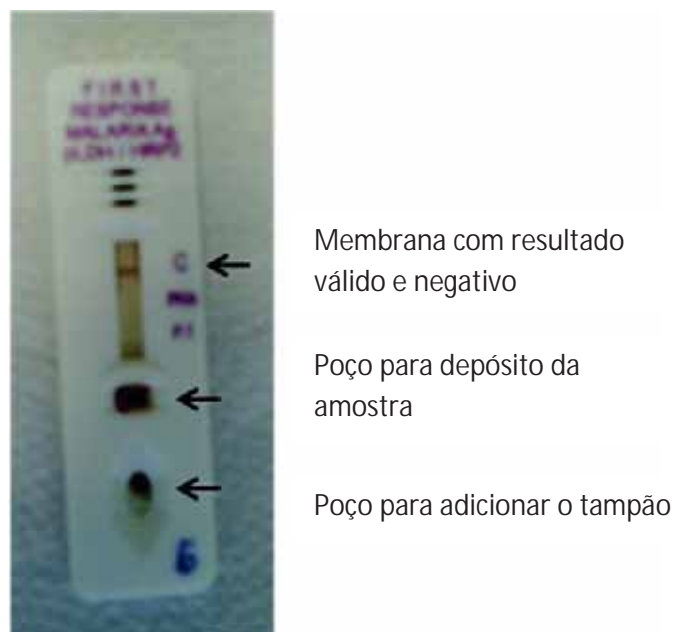


Figura 19. Características do kit imunocromatográfico “First response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo *P.f.* and PAN Detection Card Test”, mostrando teste válido e negativo para as quatro espécies: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*: setas – indicação na membrana onde ocorre a reação antígeno-anticorpo; poço para depósito da amostra; e poço para depósito do tampão.

4.8.3 Diagnóstico molecular

4.8.3.1 Extração de DNA de amostras de sangue de primatas neotropicais

A extração de DNA de amostras de sangue total de primatas foi realizada com o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Valência, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. A eluição final do DNA extraído foi de 50 μ L.

A quantificação da concentração das amostras de DNA foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, Dubuque, Illinois, Estados Unidos), por meio da leitura da absorbância.

As amostras de DNA foram identificadas e armazenadas a -20°C para a realização da PCR.

4.8.3.2 Extração de DNA de “pool” de anofelinos

A extração de DNA de anofelinos foi realizada em “pools” contendo dez espécimes. Cada mosquito inteiro foi cortado com lâmina de bisturi e macerado com pistilo, previamente esterilizado, para em seguida ter o DNA extraído, usando-se o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Valência, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi eluído em volume final de 50 µL, o qual foi identificado e teve sua concentração quantificada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, Dubuque, Illinois, Estados Unidos), por meio da leitura da absorbância. As amostras foram então armazenadas a -20°C para a realização da PCR.

4.8.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR convencional

Foram empregados protocolos da PCR que tem como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (ssuRNA) ou 18S, tanto em amostras de DNA de sangue de primatas quanto para os de “pools” de anofelinos. Em todos os protocolos os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos para a concentração de 10µM e as bases nitrogenadas (deoxinucleotídeos trifosfatados) para a concentração de 10mM.

a) Protocolo de semi-nested PCR (KIMURA et al., 1997) para identificação de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas

No protocolo preconizado por Kimura et al. (1997) com modificações, os fragmentos positivos variaram entre 110 pb e 115 pb. Os oligonucleotídeos iniciadores e as sequências térmicas utilizadas estão apresentados na Tabela 3 (KIMURA et al., 1997).

Na primeira reação, utilizou-se volume final de 25µL contendo: 1x tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,125mM de cada deoxinucleotídeos trifosfatados, 0,4 µM de cada oligonucleotídeos (P1 e P2), 0,75 U de Taq DNA Polimerase (Life

Technologies®) e 5 µL de DNA, completando-se com água ultrapura estéril e autoclavada (Life Technologies®) para o volume final.

A segunda reação foi realizada com modificações. Resumidamente, utilizaram-se 2µL do produto amplificado da primeira reação, 0,9 µM do oligonucleotídeo P1 (iniciador universal) e de cada um dos oligonucleotídeos específicos (F2, M1,V1) em reação simples (“singleplex”), 0,25 mM de cada deoxinucleotídeos trifosfatados e 1,25X de tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl). A Taq DNA polimerase (Life Technologies®) foi previamente diluída em tampão na concentração 0,75U/10 µL de tampão 1X. Dessa mistura, 10µL foram adicionados à reação, completando-se com água ultrapura estéril e autoclavada o suficiente para o volume final de 20µL.

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e das sequências térmicas utilizadas para detecção molecular das espécies de *Plasmodium*, segundo protocolo de Kimura et al. (1997).

Agente	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto
<i>Plasmodium</i> P1* P2	5'ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT 3' 5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT 3'	110-115b
1º Reação	92°C/2 minutos 35 ciclos: 92°C/30 segundos, 60°C/90 segundos e extensão final de 60°C/5 minutos	
Semi-Nested P1	5'ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT 3"	
<i>P. malariae</i> M1	5' GGAAGCTATCTAAAAGAAACACTCATAT 3'	111pb
<i>P. vivax</i> V1	5' CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA 3'	110pb
<i>P. falciparum</i> F2	5' CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG 3'	110pb
2º Reação	92°C/2 minutos 18 ciclos: 92°C/30 segundos, 60°C/1 minuto e 60°C/5 minutos	

*P1- oligonucleotídeo universal.

b) Protocolo de semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al., 1999) para identificação de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas e “pools” de anofelinos

A amplificação de semi-nested-multiplex PCR, baseada no gene alvo 18S, foi realizada em duas etapas (Tabela 4) com modificações. A primeira reação amplifica dois fragmentos: um gerado pelos oligonucleotídeos

iniciadores UNR-HUF, fragmento de 231pb de DNA de mamíferos, usado como controle endógeno da reação; e outro gerado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores UNR-PLF (783 a 821 pb), com tamanho que varia, dependendo da espécie de *Plasmodium*.

A primeira reação foi realizada com volume final de 25 µL, contendo: 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos, 0,5 µM de PLF e de UNR, 0,04µM de HUF, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies®) e 5µL de DNA, completando-se para o volume final com água ultrapura esterilizada e autoclavada (Life Technologies®).

A segunda reação foi realizada com modificações, continha 2µL do produto amplificado da primeira reação para o volume final de 25 µL: 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos, 0,5µM de PLF, 0,064 µM de MAR, 0,3 µM de FAR, 0,05 µM de VIR, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies®), completando-se com água ultrapura esterilizada e autoclavada (Life Technologies®). Os produtos da PCR apresentavam para 269 pb para *P. malariae*, 499 pb para *P. vivax* e 395pb para *P. falciparum*.

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores, sequências térmicas e tamanho de fragmento de DNA gerados pelas reações de PCR descritos por Rubio et al. (1999), utilizados na detecção molecular de *Plasmodium* spp. e do controle endógeno (gene 18S rRNA).

Agente	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto
<i>Plasmodium</i>		
PLF	5' AGTGTGTATCAATCGAGTTT 3'	723-821pb
UNR	5' GACGGTATCTGATCGTCTT 3'	231pb
HUF	5' GAGCCGCCTGGATACCG 3'	
	94°C/5 minutos	
1º Reação	40 ciclos: 94°C/45 segundos, 62°C/45 segundos, 72°C/60 segundos e extensão final de 72°C/10 minutos	
Semi-Nested Multiplex		
PLF	5' AGTGTGTATCAATCGAGTTT 3'	
FAR	5' AGTTCCCCTAGAATAGTTACA 3'	395 pb
VIR	5' AGGACTTCCAAGCCGAAG 3'	499pb
MAR	5' GCCCTCCAATTGCCTTCT 3'	269pb
	94°C/5 minutos	
2º Reação	35 ciclos: 94°C/20 segundos, 62°C/20 segundos, 72°C/30 segundos e extensão final de 72°C/10 minutos	

c) Associação dos protocolos da PCR Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999) para identificação de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas e “pools” de anofelinos

Para a amplificação gênero-específico, baseado no gene alvo 18S para identificação de *Plasmodium*, utilizou-se a associação de dois protocolos (Tabela 5). Na primeira reação, descrita por Santos et al. (2009), o fragmento esperado era 600 pb; já, na segunda reação (SINGH et al., 1999). Na qual se utilizou o produto da reação já citada como molde, apresentava fragmento de 240 pb. As reações foram realizadas conforme descritas pelos autores. A saber, a primeira reação, com volume final de 50 µL, continha: 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 4 mM de MgCl₂, 0,8 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 0,25 µM dos oligonucleotídeos rPLU1 e rPLU6R, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies ®) e 5 µL de DNA, completando-se com água ultrapura esterilizada e autoclavada (Life Technologies ®) suficiente para o volume final. E a segunda reação, com volume final de 20µL: 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 4mM de MgCl₂, 0,4 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 0,25 µM dos oligonucleotídeos rPLU3 e rPLU4, 0,5 U de Taq DNA Polimerase Life Technologies ®) e 2 µL do produto amplificado da primeira reação, completando-se para com água ultrapura esterilizada e autoclavada (Life Technologies®) para o volume final.

Tabela 5. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e das sequências térmicas de dois protocolos, Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999), realizados em associação para detecção molecular do gênero *Plasmodium* (18s rRNA).

Agente	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto	Referência
<i>Plasmodium</i> rPLU6R rPLU1	5' CGTTTTAACTGCAACAATTTTAA 3' 5' TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA 3'	600pb	Santos et al. (2009)
1º Reação	95°C/5 minutos 25 ciclos: 95°C/1 minuto, 58°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e extensão final de 72°C/5 minutos		
<i>Plasmodium</i> rPLU3 rPLU4	5' TTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT 3' 5' TACCCGTCATAGCCATGTTAGCCAATACC 3'	240pb	Singh et al. (1999)
2º Reação	95°C/5 minutos 30 ciclos: 95°C/1 minuto, 64°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e extensão final de 72°C/5 minutos		

d) Protocolo de Nested PCR de Snounou et al. (1993) para identificação de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas

O protocolo padronizado por Snounou et al. (1993) gera um produto de 1.200 pb na primeira reação gênero-específica com volume final de 25 µL, contendo: 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2mM MgCl₂, 125µM dNTPs, 250 nM de cada oligonucleotídeo iniciador (rPLU6 e rPLU5), 0,4U de Taq DNA Polimerase Life Technologies ®) e 5 µL de DNA, complementando-se o volume final com água utrapura esterilizada e autoclavada (Life Technologies®).

A segunda reação, espécie-específica, com um volume final de 25 µL, foi realizada de acordo com a primeira reação, mudando-se apenas o número de ciclos (Tabela 6). A reação foi realizada em “singleplex”, usando-se os pares de oligonucleotídeos como descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Descrição da reação gênero-específica (SNOUNOU et al., 1993) para detecção molecular do gênero *Plasmodium* e sequências térmicas.

Agente	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto
<i>Plasmodium</i> rPLU5 rPLU6	5' CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3' 5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'	1200 pb
1º Reação	95°C/5 minutos 24 ciclos: 94°C/1 minuto, 58°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e extensão final de 72°C/5 minutos	
Nested rFAL1 rFAL	5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3' 5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3'	205 pb
rVIV1 rVIV2	5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3' 5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3'	120 pb
rMAL1 rMAL2	5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC 3' 5' AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3'	144 pb
2º Reação	95°C/5 minutos 29 ciclos: 94°C/1 minuto, 58°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e extensão final de 72°C/5 minutos	

4.8.3.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% ou 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TBE pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base ou 1Kb. Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemidoc™ MP Imaging System®, Bio Rad).

Os produtos amplificados para *Plasmodium* spp. foram purificados com Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific®, São Paulo, São Paulo) de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos purificados tiveram sua concentração quantificada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.8.3.5 Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados e purificados foi realizado no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco do Instituto de Biociências da USP-São Paulo, através do sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Foram usados para o sequenciamento os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR. O sequenciamento foi realizado em termociclador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies®, Applied Biosystems). As reações foram realizadas, utilizando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). As corridas foram realizadas em capilares de 36 cm, utilizando-se o polímero POP7 e as sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1, utilizando-se o Base Caller KB.

4.8.3.6 Análise das sequências

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram submetidas a alinhamento e análise. Os eletroferogramas foram avaliados usando-se o programa Finch TV. Os “contigs” foram montados no programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) para realizar o alinhamento das sequências consensos. O programa BLAST foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTn), objetivando-se procurar e comparar a identidade em banco de dados internacionais (GenBank) (BENSON et al., 2002) com aquelas obtidas.

4.8.3.7 PCR em tempo real para identificação do gênero *Plasmodium*, baseada no gene 18S em amostras de sangue de primatas neotropicais e em “pools” de anofelinos

4.8.3.7.1 Amplificação de fragmento do gene 18S de DNA para construção de plasmídeos

Os controles positivos de DNA de *P. falciparum* e *P. malariae* foram amplificados pela PCR convencional do protocolo de Gama et al. (2007). Foram utilizados os oligonucleotídeos M60 e M61, na concentração de 10 μ M (GAMA et al., 2007). Resumidamente, o volume total da reação foi de 50 μ L, contendo 4 μ L de DNA, 32,75 μ L de água ultrapura esteriliada e autoclavada, 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 0,8 mM da mistura das quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 2mM de MgCl₂, 0,2 μ M dos oligonucleotídeos M60 (5' ACA TGG CTA TGA CGG GTA ACG 3') e M61 (5' TGC CTT CCT ATG TAG TGG TAG CTA 3') e 1,25 U de Taq Platinum (Life Technologies®). Foram obedecidos os ciclos, 95°C/10 minutos, seguidos por 32 ciclos de amplificação (94°C/30 segundos, 60°C/30 segundos e 72°C/30 segundos). Um fragmento de 84 pb foi visibilizado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio através de transiluminação de luz UV. Os produtos foram purificados, usando-se Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific®) e quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, Dubuque, Illinois, Estados Unidos), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.8.4.7.2 Preparo de plasmídeo para uso em PCR em tempo real

A clonagem dos produtos purificados foi realizada em vetor pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), e as reações foram realizadas conforme indicação do fabricante. A reação de ligação com volume final de 10 μ L consistiu em 1 μ L de produto da PCR (150 ng/ μ L), 2 μ L de água, 1 μ L do vetor pGEM-T Easy (Figura 20), 5 μ L de tampão de ligação 2 x concentrado e 1 μ L de T₄ DNA ligase. A reação foi incubada a 4°C por doze horas. As concentrações de DNA e vetor utilizadas na reação de ligação

foram determinadas com o objetivo de se obter, ao final, uma relação inserto: vetor de 3:1 com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Relação Inserto : vetor} = \text{ng do inserto}$$

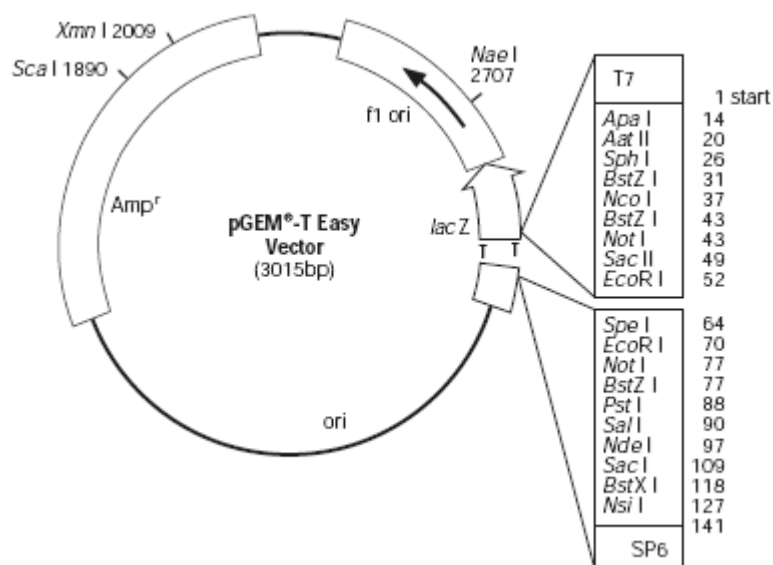


Figura 20. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar células competentes *Escherichia coli* One Shot Match 1™ Chemically Competent Cells (Life Technologies, Cat. C8620-03) (109 – 1010 cfu/ng de DNA). Em gelo, 10 µL da reação de ligação foi adicionada à 50 µL de células competentes One Shot Match 1™ (109 – 1010 cfu/ng de DNA). A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, foi efetuado o choque térmico das células em banho de água, a 42° C, por 2 minutos. Foram adicionados, então, 250 µL de meio Luria Bertani (LB) (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; água destilada q.s.p. 100 mL) às células, as quais foram incubadas por uma hora a 37° C, em agitação de 100

rpm. A solução de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; 1,2 g de Agar; água destilada q.s.p. 100 mL) com 100 µg/mL de ampicilina para o vetor. As placas foram preparadas com 0,026% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) e 0,82 mM IPTG, para a diferenciação dos clones recombinantes, que ficam brancos, diferente dos clones sem inserto, que ficam azuis. Após incubação a 37° C por até 24 horas, foi realizada a análise de clones transformantes.

Após o cultivo dos clones, o precipitado de células (centrifugação a 1000 rpm) foi utilizado para extração de DNA plasmidial com o QIAprep Miniprep Kit (Qiagen®, Valência, Califórnia, Estados Unidos).

A concentração do DNA foi quantificada em Nanodrop® e uma alíquota foi diluída a 100 ng/µL para a reação de PCR, a fim de confirmar a inserção dos fragmentos no vetor. Os fragmentos foram visibilizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo (Figura 21).

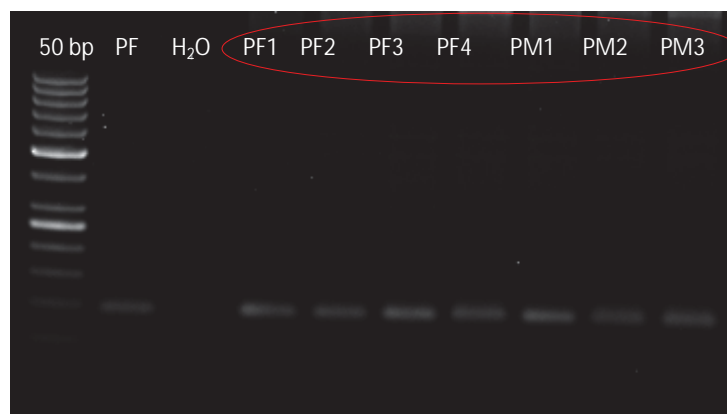


Figura 21. Imagem de gel de agarose 2% do protocolo gênero-específico de Gama et al. (2007) que resulta em um fragmento de 84 pb. Usou-se, na primeira canaleta, o marcador molecular de 50 pb (Life Technologies); canaleta 2 e 3: controles positivos usados como DNA molde de *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente. Canaletas 4 a 10: clones de *P. falciparum* (PF1, PF2, PF3 e PF4) e *P. malariae* (PM1, PM2 e PM3), respectivamente.

4.8.3.7.3 Descrição da reação da PCR em tempo real para *Plasmodium*

Foi realizado protocolo descrito por Gama et al. (2007) com modificações em triplicata para 95 amostras de DNA de sangue de primatas neotropicais, usando-se plataforma Applied Biosystems e, em duplicata, 66 amostras usando plataforma Bio Rad (C1000 Thermal Cycle CFX 96®Real Time Systems Bio Rad). As reações da PCR em tempo real foram realizadas com volume final de 25 µL, utilizando-se: 0,5µM dos oligonucleotídeos M60 e M61, 0,3 µM da sonda de hidrólise M62 (5' FAM™TCA GGC TCC CTC TCC GGA ATC GA-TAMRA™3'), 12,5µL de 1X TaqMan Universal Master Mix® (Life Technologies), 4,25µL de água ultrapura e 5µL de DNA. A seguir a ciclagem de 50°C/2 minutos, 95°C/10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Os oligonucleotídeos e a sonda de hidrólise foram diluídos na concentração de 10µM.

Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo (2,0 x 10⁷ cópias/ µL a 2,0 x 10⁰ cópias/ µL). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula (Xg/ µL DNA/ [tamanho do plasmídeo (pb) x 660]) x 6.022 x10²³ x cópias do plasmídeo/µL.

A eficiência da curva-padrão foi 113%, e o coeficiente de correlação (R²) foi de 0,97. Seguiram-se as recomendações do MIQE Guideline - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (BUSTIN et al., 2009).

4.8.3.8 Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico – Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) para identificação de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas neotropicais e em ‘pollos’ de anofelinos

O ensaio foi realizado usando-se o conjunto de oligonucleotídeos, previamente descrito por Han et al. (2007), com visualiação na Tabela 7. Todos os oligonucleotídeos foram diluídos na concentração de 100µM. A reação foi realizada de duas formas: a) usando-se o kit Loopamp DNA (Eiken Chemical CO. Ltda, Japão) ensaiando 13 amostras de DNA de sangue de

primatas; b) usando-se *Bst* DNA polimerase (BioLabs®). A reação de volume final de 25µL, continha 40 µM de cada primer FIB e BIP, 5 µM dos oligonucleotídeos F3 e B3, 0,8 µM dos oligonucleotídeos LFP e LPB, 1µL do Syto 9 (125µM) (Life Technologies®), 2,5µL de 1X tampão da *Bst* DNA polimerase, 0,2 mM da mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 8 U *Bst* DNA polimerase e 2,5 µL do DNA molde. A reação isotérmica foi de 60° por 100 minutos, e a enzima inativada a 80° por 2 minutos, realizada no termociclador C1000 Thermal Cycle CFX 96® Real Time Systems (Bio Rad). As sequências de oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação do gene 18S rRNA pela reação de LAMP.

Espécies	Oligonucleotídeos	Sequência (5' – 3')
Gênero <i>Plasmodium</i>	F3	GTATCAATCGAGTTTCTGACC
	B3c	CTTGTCACCTCTCTTCT
	FIP (F1c-F2)	TCGAACTCTAATTCCTCCGTTACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGGT
	BIP (B1-B2c)	CGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGAATTGGGTAATTTACGCG
	LFP	CGTCATAGCCATGTTAGGCC
	LPB	AGTACCACATCTAAGGAAGGCAG
<i>P. falciparum</i>	F3	TGTAATTGGAATGATAGGAATTTA
	B3c	GAAAACCTTATTTTGAACAAAGC
	FIP (F1c-F2)	AGCTGGAATTACCGCGGCTG GGTTCCTAGAGAAACAATTGG
	BIP (B1-B2c)	TGTTGCAGTAAAACGTTTCGTAGCCCAAACCAGTTTAAATGAAAC
	LFP	GCACCAGACTTGCCCT
	LPB	TTGAATATTAAGAA
<i>P. vivax</i>	F3	GGAATGATGGGAATTTAAAACCT
	B3c	ACGAAGTATCAGTTATGTGGAT
	FIP (F1c-F2)	CTATTGGAGCTGGAATTACCGCTCCCAAACTCAATTGGAGG
	BIP (B1-B2c)	AATTGTTGCAGTAAAACGCTCGTAAGCTAGAAGCGTTGCT
	LFP	GCTGCTGGCACCAGACTT
	LPB	AGTTGAATTTCAAAGAATCG
<i>P. malariae</i>	F3	CAAGGCCAAATTTTGGTT
	B3c	CGGTTATTCTTAACGTACA
	FIP (F1c-F2)	TATTGGAGCTGGAATTACCGCGATGATGGGAATTTAAAACCT
	BIP (B1-B2c)	AATTGTTGCAGTAAAACGCCTATGTTATAAATATACAAAGCATT
	LFP	GCCCTCCAATTGCCTTCTG
	LPB	TCGTAGTTGAATTTCAAGGAATCA

4.8.4 Testes sorológicos

4.8.4.1 Manutenção de cultura de *Plasmodium falciparum*

Para a confecção das lâminas a serem utilizadas na RIFI e preparo de antígenos para ELISA-teste foi necessária a manutenção de cultura de *P. falciparum*.

Os isolados de *P. falciparum*, K1 (origem Tailândia) e Palo Alto (origem Uganda) utilizados neste trabalho foram doados gentilmente pela Dra. Silvia Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN-SP.

Os isolados de *P. falciparum* foram mantidos *in vitro*, usando-se placas de Petri e cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e suplementados com 10% de plasma humano tipo B+ ou AB+.

Foram adicionadas hemácias O+ na cultura para obtenção de hematócrito 5%. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com trocas diárias do meio, assim como o acompanhamento da parasitemia por esfregaço sanguíneo corado com Giemsa.

As amostras de plasma humano foram obtidas de doações de bolsas de sangue dos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária da FCAV-Unesp. Cada lote de plasma foi previamente inativado à 56°C por uma hora, desfibrinado por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C e filtrado a vácuo em filtro de 0,22µm (TPP®, n. cat. 99505). As alíquotas de plasma foram identificadas e armazenadas a -20°C.

4.8.4.1.1 Obtenção de antígenos de *Plasmodium falciparum* para confecção de lâminas de Imunofluorescência Indireta

O antígeno foi preparado a partir de cultura de *P. falciparum* com parasitemia de 10% e esquizontes como formas predominantes. O conteúdo das placas foi retirado e colocado em tubos tipo Falcon de 15 mL para centrifugação a 1.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado lavado com RPMI incompleto. O processo de lavagem foi repetido por três vezes.

O sedimento foi ressuspenso em solução salina de fosfato tamponada (PBS, pH 7,2) em quantidade necessária para evitar a sobreposição de células e, em cada poço da lâmina de imunofluorescência, foram depositados

10 μ L dessa suspensão. As lâminas foram secas por doze horas em temperatura ambiente, embrulhadas individualmente em papel higiênico e papel alumínio, identificadas e armazenadas a -20°C, até o momento de uso.

4.8.4.1.2 Preparação do antígeno solúvel de proteínas de roptrias de *P. falciparum* para ELISA-teste

O antígeno foi preparado de acordo com Machado et al. (1993) com modificações.

As hemácias parasitadas em meio de cultura de *P. falciparum* foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante, descartado.

As hemácias infectadas foram lavadas por duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuspenso com 10x o volume de Tris-Cloreto de Amônio 83% (5 mL de Tris com 45 mL de Cloreto de Amônio a 0,83%), aquecido a 37°C. O tubo contendo a solução foi invertido 10 vezes e deixado em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000g, por 20 minutos, a 4°C, e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de meio de homogeneização pH 7,5 (0,25M de Sacarose, 1mM de EDTA, 5mM de triethanolamina-HCL). Foi então submetido a sete ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. A suspensão foi centrifugada a 500g por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante reservado e descartado o precipitado. O sobrenadante foi centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C, e reservado o precipitado.

Em tubos específicos para ultracentrífuga Beckman®, foi preparado o “colchão” com 0,5 mL de sacarose 1,8M. Em outro tubo, usando-se o aparelho Econo Pump® (Bio Rad) na velocidade de 15 mL/minuto, foi depositado uma mistura das soluções de sacarose 1M e 1,6M, em volumes equivalentes. Depois, acrescentou-se o precipitado (fração organelar), delicadamente, pela parede do tubo, para evitar a mistura com os meios de sacarose. Centrifugou-se em ultracentrífuga Beckman Optima™ LE-80K (Beckman®, Illinois, EUA) a 27.000 rpm por 15 horas a 4°C. Ao final, observou-se a fração contendo as proteínas de roptrias. Esta foi retirada e a ela foi acrescida 4 mL de meio de homogeneização. Centrifugou-se em

ultracentrífuga Beckman a 28.000 rpm por uma hora a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em um mililitro de meio de homogeneização e congelado a -20°C até a quantificação.

O conteúdo proteico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicinônico, utilizando-se o “kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit-Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8.4.2 Infecção de camundongos BALB/c com cepa de *Plasmodium berghei*

A cepa de *Plasmodium berghei* ANKA foi gentilmente cedida pela Dra. Sílvia Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN-SP.

Realizaram-se duas passagens em camundongos BALB/c, “SPF” (Specific Pathogen Free), fêmeas, com aproximadamente seis semanas de idade. A cepa de *P. berghei* mantida em nitrogênio líquido foi descongelada em banho-maria a 37°C. A primeira passagem foi realizada com 0,25 mL de hemácias parasitadas, com esquizontes como formas predominantes e com parasitemia de quatro cruzes, por via intraperitoneal. A segunda passagem foi realizada quatro dias depois da primeira infecção, usando-se 0,1 mL de sangue parasitado.

A colheita foi realizada oito dias pós-infecção, por punção intracardíaca.

4.8.4.2.1 Obtenção de antígenos de *Plasmodium berghei* para confecção de lâminas de imunofluorescência indireta

O sangue foi puncionado por via intracardíaca em camundongos BALB/c e depois foi depositado em microtubos contendo duas gotas de anticoagulante EDTA.

A lavagem das hemácias infectadas e preparo das lâminas de imunofluorescência foi realizada de acordo com o subitem 4.8.3.1.1.

4.8.4.2.2 Preparação do antígeno solúvel de proteínas de rotrias de *Plasmodium berghei* para ELISA-teste

O preparo do antígeno solúvel de proteínas de rotrias de *P. berghei* foi semelhante ao descrito no subitem 4.8.3.1.2 para *P. falciparum* (MACHADO et al., 1993).

O sangue foi puncionado por via intracardíaca em camundongos BALB/c e depois foi depositado em microtubos contendo duas gotas de anticoagulante EDTA.

4.8.4.3 Visibilização das proteínas solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O antígeno solúvel de proteínas de rotrias depois de quantificado pelo kit BCA (BCA Reagents Kit – Pierce Chemical Company) foi visibilizado em eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada por Laemmli (1970).

Baseado no volume das amostras, foi adicionado tampão da amostra 5x concentrado (250mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20% β -mercaptoetanol e 0,008% de azul de bromofenol). As amostras foram homogeneizadas, incubadas por 5 minutos a 100°C e aplicadas no gel. O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão (1,875 M Tris, pH 8,8 e 1% SDS) e de 5% de poliacrilamida para o gel de empacotamento em tampão (1,875 M Tris, pH 6,8 e 0,5% SDS). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina (50 mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 100V por até 3 horas e 30 minutos, à 0°C, no sistema Mini-Protean II (Bio-Rad). Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% de metanol e 10% de ácido acético) e deixados sob baixa agitação por até 16 horas. A descoloração dos géis foi realizada com solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético) sob baixa agitação por aproximadamente 5 minutos.

Os géis foram conservados em água destilada. O peso molecular das proteínas de roptrias variam de 40kDa a 240 kDa (SAM-YELLOWE, 1996).

4.8.4.4 Reatividade das proteínas solúveis de roptrias de *P. falciparum* e *P. berghei* pelo Western blotting

As proteínas solúveis de roptrias foram visibilizadas pelo Western-blotting (TOWBIN et al., 1979). As incubações foram realizadas, utilizando-se soro humano controle positivo para *P. falciparum*, tanto para proteínas solúveis de roptrias de *P. falciparum* quanto para *P. berghei*.

As proteínas separadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrito no item anterior, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Sigma-Aldrich), previamente incubada em tampão de transferência gelado (0,58% Tris Base pH 8,3, 20% metanol e 0,29% glicina). Para tanto, a membrana foi colocada no sistema de eletrotransferência “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad), contendo o mesmo tampão, e a transferência foi realizada a 100V durante 60 minutos. A transferência foi visibilizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de “Ponceau-S” (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) por 3 minutos e descorada em água destilada. A membrana de nitrocelulose foi incubada em TBS-Tween 20 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas, à 4°C, sob baixa agitação, para saturação de sítios de ligação inespecíficos. A membrana foi então incubada com soro humano controle positivo para *P. falciparum* em TBS-Tween 20 e 5% leite em pó diluído 1:20, 1:50 e 1:100, durante 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, foi submetida a três lavagens consecutivas de 10 minutos com a mesma solução, sob agitação lenta.

Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, a membrana foi incubada em conjugado anti-humano acoplado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unido), diluído 1:30.000 em TBS-Tween 20. A membrana foi submetida a três lavagens, conforme descrito anteriormente, e a revelação se deu pela adição do substrato da enzima BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium),

utilizando-se o kit “Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate” (Bio-Rad, Cat. 170-6432), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8.4.5 Análise da reação das proteínas solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* pelo Dot-ELISA

As proteínas solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* foram utilizadas como antígenos na técnica de Dot-ELISA, a fim de verificar a sua capacidade de reagir com anticorpos específicos presentes nas amostras de soro humano controles positivos para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e soro de camundongo BALB/c infectado com cepa de *P. berghei*. A técnica foi realizada conforme descrito por Machado et al. (1993), com modificações. Resumidamente, pequenos discos de nitrocelulose foram cortados (0,45 µm), e cada disco disposto em uma cavidade de uma placa de cultura, de fundo chato. Foram depositados sobre cada disco, 2 µg dos antígenos (proteínas solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P.berghei*).

Os discos foram secos à temperatura ambiente e, em seguida, bloqueados por 12 horas a 4°C com 300 µL de tampão TBS (Tris 0,1M, NaCl 0,1M e 0,5% de Tween 20; TBS-Tween 20), acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Os soros controles foram diluídos 1:50 e 1:100 em TBS-Tween 20, contendo 5% de leite em pó desnatado e incubados durante 120 minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, os discos foram submetidos a duas lavagens com TBS-Tween 20, acrescidos de 5% de leite em pó desnatado e uma lavagem com TBS-Tween 20 (intervalo de 5 minutos entre cada lavagem).

Em cada disco com soro de camundongo, foi adicionado o conjugado anti-camundongo acoplado à fosfatase alcalina (Sigma A-3562), diluído 1:30.000 em TBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Quanto aos discos com soros humanos, o conjugado utilizado foi o anti-humano acoplado à fosfatase alcalina (Sigma A-1543), diluído 1:4.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Após uma hora de incubação com os devidos conjugados, seguiram-se as lavagens, tal como na etapa anterior. A reação foi revelada pela adição do substrato da enzima 5-

bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e cloreto azul nitroetanólico, utilizando-se o kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante.

4.8.4.6 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

4.8.4.6.1 Descrição da RIFI para *Plasmodium falciparum* e *P. berghei*

As amostras de soros foram diluídas a 1:20 em solução salina de fosfatada tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na₂HPO₄; 1mM KH₂PO₄; 0,8 mM NaH₂PO₄). Nas lâminas, já à temperatura ambiente, foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço contendo o antígeno (*P. falciparum* ou *P. berghei*).

Em cada lâmina, foram usadas amostras de soros humanos controles, negativo e positivo, gentilmente doados pela Dra. Silvia Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN-SP.

As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas por três vezes em PBS pH 7,2, de cinco minutos cada, secas, e a cada poço foram adicionados 10 µL de conjugado, anti-IgG de macaco (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) nos soros-teste e anti-IgG de humano (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), para os controles, marcados pelo isotiocianato de fluoresceína, diluído conforme orientação do fabricante.

As lâminas foram então incubadas por mais 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem (três vezes de cinco minutos cada) e secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (9 mL de glicerina para 1mL de solução carbonato-bicarbonato, pH 9,6) e avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo.

4.8.4.6.2 Descrição da RIFI para *Plasmodium malariae*

As lâminas de RIFI foram preparadas com hemácias humanas infectadas de paciente com *Plasmodium malariae*, doados gentilmente pela Dra. Silvia Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN-SP.

O procedimento foi semelhante ao realizado para o antígeno de *P. falciparum*. Foram utilizadas amostras de soros humanos como controles, negativo e positivo para *P. malariae*, doados gentilmente pela Dra. Silvia Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN-SP.

A diluição inicial dos soros foi de 1:20, e as amostras selecionadas para serem testadas foram positivas para *P. malariae* na semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al., 1999).

4.8.4.7 Descrição da reação do ELISA-teste, usando-se antígeno solúvel de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e de *P. berghei*

Inicialmente, foi realizada titulação em bloco com quatro soros humanos positivos e quatro soros negativos para *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* (dois soros) – frente ao antígeno de roptrias de *P. falciparum*; e três soros humanos controles positivos e três soros negativos para *falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e um soro de camundongo controle positivo e um soro negativo para *P. berghei* – frente ao antígeno de *P. berghei*. Os soros foram ensaiados em duplicatas nas diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 em microplacas de fundo plano Maxisorp (Nunclon® Surface, Nunc. Denmark) sensibilizadas com antígeno solúvel de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e de *P. berghei*, nas concentrações de 1,5µg/mL, 2,5µg/mL, 5,0µg/mL e 10,0µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M, pH 9,6. Após a definição das concentrações ótimas de ensaio, as amostras de soro de primatas neotropicais foram testadas.

Foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de proteínas de roptrias, diluído na concentração de 2,5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas de fundo plano Maxisorp (Nunclon™ Surface, Nunc. Denmark, e incubada a 4°C

por 12 horas, em câmara úmida. Após a incubação, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). Depois de secas, as placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100 µL dos soros-teste e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1: 100 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas a 37°C por uma hora e meia e lavadas, como descrito anteriormente.

Foram depositados em cada poço da microplaca 100 µL do conjugado anti-IgG de macaco, acoplado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e, para os controles com soros humanos, foi usado conjugado anti-IgG humano, acoplado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), ambos diluídos 1:20.000 e, para soros de camundongos, usou-se conjugado anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluído 1:30.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma N-9389) foi adicionado (100µL), incubando-se a reação por 45 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

4.8.5 Identificação molecular da fonte alimentar de anofelinos

Para identificação molecular das fontes alimentares dos anofelinos capturados, utilizou-se o DNA genômico dos mosquitos previamente extraído para diagnóstico de *Plasmodium*.

Para tal, foi extraído o DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Valência, EUA) das amostras de sangue de ave, cão, gato, primata neotropical e

humano usados como controles positivos no diagnóstico de repasto sanguíneo e água ultrapura como controle negativo.

As amplificações de PCR foram realizadas como descrito por Chang et al. (2008) baseadas no gene citocromo B para humano, aves, gato e cão doméstico, usando-se oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos por esses autores. Para identificação de DNA de primatas neotropicais, foram usados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Canavez et al. (1999), baseados na região intron 2 do gene β_2 -microglobulina.

Para as reações de acordo com Chang et al. (2008), utilizaram-se: volume total de 25 μ L, sendo 5 μ L de DNA, 1X tampão da Taq (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 3mM $MgCl_2$, 0,2mM da mistura das quatro deoxinucleotídeos trifosfatos, 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo (Tabela 8) e 1 U de Taq Platinum (Life Technologies®). Os parâmetros das reações no termociclador para todos os hospedeiros testados foram de: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54–70°C/30 segundos, dependendo da temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeos (Tabela 8), e 72°C/30 segundos, seguidos de extensão final de 72°C por 20 minutos. Em seguida, 10 μ L dos produtos foram analisados usando-se 1,5% de gel de agarose em TBE (4,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA), corados com brometo de etídio e visibilizados em transiluminador de luz ultravioleta, acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemidoc™ MP Imaging System®, Bio Rad).

Controles negativo e positivo foram incluídos em cada reação.

Tabela 8. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores, baseados no gene citocromo B (Cit B) usados na identificação da fonte alimentar de mosquitos anofelinos (CHANG et al. 2008).

Fonte alimentar testada/Cit B	Oligonucleotídeos (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Gato doméstico	TTCTCAGGATATACCCTTGACA	60	180
	GAAAGAGCCCATTGAGGAAATC		
Humano	TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC	70	228
	GTRTARTAGGGRTGRAATC		
Cão doméstico	GAACTAGGTCAGCCCGGTACTT	67	153
	CGGAGCACCAATTATTAACGGC		
Aves	GACTGTGACAAAATCCCNTTCCA	64	508
	GTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC		

A reação para identificação de DNA de primatas neotropicais foi realizada conforme descrito por Canavez et al. (1999). Os oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na Tabela 9. Resumidamente, a reação continha volume final de 25µL: 5 µL de DNA, 25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 9), 2,5 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, e 0,7U de Taq DNA polimerase. As condições térmicas de amplificação foram: 95°C/30s, seguidas de 30 ciclos de 95°C/20 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/30 segundos e extensão final de 72°C durante 5 minutos.

Tabela 9. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores baseada na região intron 2 do gene β₂-microglobulina de primatas neotropicais (CANAVEZ et al., 1999), usados na identificação da fonte alimentar de mosquitos anofelinos.

Fonte alimentar testada	Oligonucleotídeos (5'-3')	Combinação de oligonucleotídeo	Tamanho do fragmento (pb)
Primatas neotropicais Gene β ₂ -microglobulina		F7/R12	805
	F7: CTC ACC ACC CAA GAC AGT AAA GT	F7/R6	812
	R6: TGA AAA AGA CGA TGG AGA AAG AAA A	F6/R12	840
	F6: GAG TAT GCC TGC CGT GTG AG A		
	R12: AGT GGA GAA AGA AAA AGG AAG		

5. RESULTADOS

5.1 Espécies de primatas não humanos amostradas

Foram realizados 120 dias de buscas nos meses de janeiro, junho e julho de 2013 e janeiro de 2014, usando-se quatro armadilhas tipo “Tomahawk”, armadas com frutas por 12 horas (6-18 horas), perfazendo um esforço amostral total de 1.440 horas/armadilha (12 horas por dia) por pessoa.

Dos animais capturados no Sítio Aguahy todos eram machos, exceto uma fêmea do gênero *Sapajus* e, junto a ela, foi capturado o filhote que estava nas suas costas. O filhote (macho) já estava na fase de sair das costas da mãe (± 10 meses) e dele também foi colhida amostra de sangue.

5.2 Diagnóstico morfológico: gota espessa e esfregaço sanguíneo

Foram confeccionadas 322 lâminas: 161 de esfregaço sanguíneo e 161 de gota espessa para leitura em microscópio de luz. Foram observadas formas sugestivas de *Plasmodium* em cinco (3,10%) lâminas de animais (5/161) do CETAS-São Luís: três de esfregaço sanguíneo (Figura 22) de *Sapajus* (n=2) e *Callithrix jacchus* (n=1) e duas de gota espessa de *Sapajus*, confirmadas pela Dra. Silvia Di Santi, SUCEN-SP.

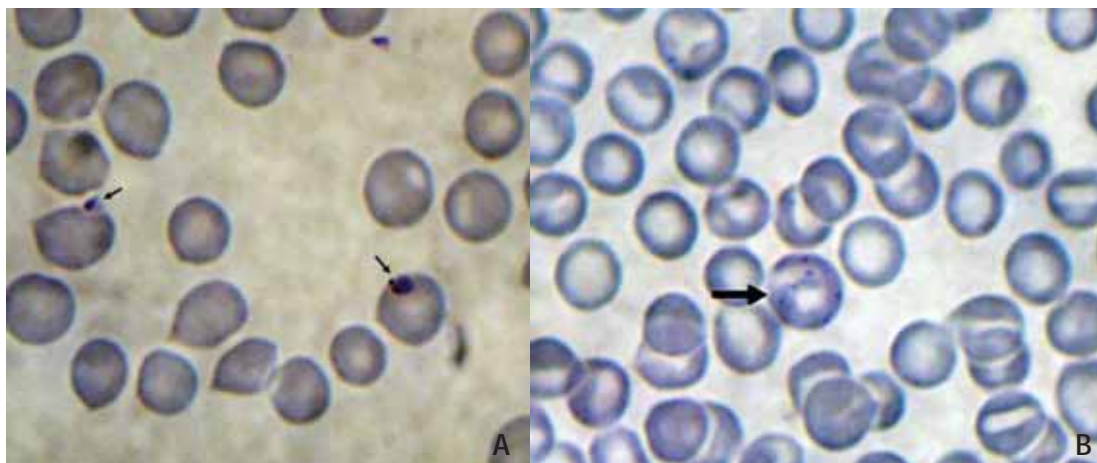


Figura 22. Fotomicrografia dos parasitas visualizados por microscopia de luz em lâminas de esfregaço sanguíneo de primatas neotropicais amostrados no CETAS-São Luís: A – trofozoítas em forma de anel de amostra de *Sapajus* sp. (macho); B – trofozoíta de amostra de *Callithrix jacchus* (macho). Coloração de Giemsa, objetiva 100x.

5.3 Diagnóstico imunocromatográfico – Teste de Diagnóstico Rápido (TDR)

As 161 amostras de sangue total foram testadas para pesquisa de antígeno de *Plasmodium* spp. Nenhum teste foi inválido, pois em todos os testes a zona de controle positivo apareceu. No entanto, nenhuma amostra mostrou-se positiva para as espécies testadas (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*).

5.4 Diagnóstico molecular

5.4.1 PCR convencional para pesquisa de *Plasmodium* spp. em amostras de sangue de primatas neotropicais

Os resultados obtidos pelos protocolos da PCR utilizados não foram coincidentes em algumas amostras, sendo, neste trabalho, considerado como decisivo ou padrão-ouro o protocolo de Rubio et al. (1999), pois se mostrou mais sensível para amostras de primatas neotropicais e por apresentar um fragmento de controle endógeno da reação (Figura 23).



Figura 23. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados são relativos à primeira reação da PCR descrita por Rubio et al. (1999) para identificação de *Plasmodium*, na qual podem ser visualizados um fragmento de 231pb referente ao gene endógeno (fragmento 18S de DNA conservado entre as espécies de mamíferos); e outro fragmento maior, gênero-específico de 783 a 821 pb, que identifica positividade para *Plasmodium* (o tamanho varia de acordo com a espécie). Foi usado marcador de peso molecular de 100 pb (primeira canaleta), seguido do controle negativo (água ultrapura), dos controles positivos para *P. vivax* (PV), para *P. malariae* (PM) e para *P. falciparum* (PF), respectivamente, e amostras-teste.

Obtiveram-se 30,43% (49/161) de amostras amplificadas pelo protocolo de Rubio et al. (1999), sendo 10 (20,4%) de primatas de vida livre capturado no Sítio Aguahy (São José de Ribamar) e 39 (79,59%) de CETAS-São Luís. Pelo protocolo de Kimura et al. (1997), a positividade foi de 18,01% (29/161); 6,21% (10/161) pelo protocolo de Snounou et al. (1993); e 3,10% (5/161) pela associação dos protocolos de Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999). Os resultados positivos podem ser visualizados no Apêndice A.

No diagnóstico espécie-específico utilizando-se a semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al., 1999), foram obtidos resultados para *P. brasilianum*/*P. malariae* (47/49) e para *P. simium*/*P. vivax* (2/49). Das 20 amostras de primatas neotropicais de vida livre, 40% (8/20) mostraram-se positivas para *P. malariae* (RUBIO et al., 1999). Essas amostras também amplificaram no protocolo de Kimura et al. (1997).

Na Figura 24, podem ser observadas amostras de sangue de exemplares de *Callithrix jacchus* e de *Saimiri sciureus*, do CETAS-São Luís, amplificadas pelo protocolo de Kimura et al. (1997).



Figura 24. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os produtos mostrados são relativos à primeira reação da PCR padronizada por Kimura et al. (1997) para o gênero *Plasmodium*. Foi usado marcador de peso molecular de 50 pb (primeira canaleta), seguido do controle positivo de *P. falciparum* (PF), controle negativo (água ultrapura) e as amostras-teste de *Callithrix jacchus* (107 a 109) e de *Saimiri sciureus* (110 a 113). As amostras positivas amplificaram na altura de 110pb (106 a 113).

Na Figura 25, podem ser observados os resultados da reação gênero-específica (primeira reação) do protocolo de Snounou et al. (1993). Todos os produtos amplificados na primeira reação foram utilizados para realizar a *nested* PCR para identificação espécie-específica para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Excetuando-se a amostra 155, que foi positiva para *P. falciparum*, no protocolo de Snounou et al. (1993), todas as outras amostras positivas foram identificadas como *P. malariae* (Figura 36), com amplificação de um fragmento de 144pb.

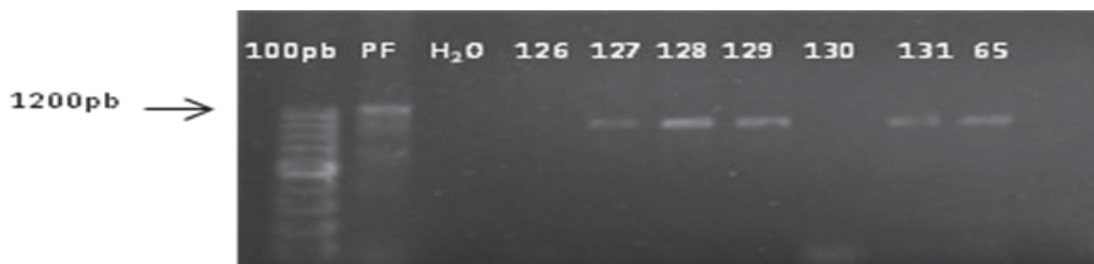


Figura 25. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos mostrados são relativos à primeira reação da PCR padronizada por Snounou et al. (1993) para identificação do gênero *Plasmodium*. Foi usado marcador molecular de 100 pb (primeira canaleta), seguido do controle positivo de *P. falciparum* (PF), controle negativo (água ultrapura) e as amostras-teste de *Sapajus* sp. do CETAS-São Luís. As amostras positivas amplificaram na altura de 1200pb (127, 128, 129, 131 e 65).



Figura 26. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. O produto amplificado é da reação espécie-específica para *P. malariae*, que gera fragmento de 144pb (SNOUNOU et al. 1993). Primeira canaleta: marcador molecular de 100pb, seguido de controles positivos para *P. malariae*, da água ultrapura (controle negativo) e das amostras-teste (120 a 130). A amostra 123 é de exemplar de *Sapajus* sp. do CETAS-São Luís.

5.4.1.1 Análise das seqüências de *Plasmodium* de amostras de primatas neotropicais

Foram sequenciadas quatro amostras de DNA de sangue de primatas neotropicais. A identidade dos produtos (240pb) obtidos na PCR para *Plasmodium* (utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores rPLU3/rPLU4) baseadas no gene 18S, revelou 100% de identidade da amostra 136 (*Sapajus* sp. do CETAS) com *Plasmodium malariae* clone PW1532 18S (GU950655).

A amostra 137 (*Sapajus* sp. do CETAS) apresentou 97% de identidade com *Plasmodium* sp. ZOOBH (EF090276). A amostra 145 (*Sapajus* sp. do CETAS) apresentou 99% de identidade com *Plasmodium falciparum* 18S ribossomal RNA parasita assexual (M19173.1) (Apêndice B).

A amostra 156 (*Sapajus* sp. do CETAS) apresentou 100% de identidade com as sequências de *Plasmodium malariae*, previamente publicadas no GenBank, encontradas em chimpanzés selvagens (Apêndice B).

5.4.1.2 Pesquisa de DNA de *Plasmodium* pela PCR em tempo real (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real foi realizada em 95 amostras no Laboratório de Malária da SUCEN, sob supervisão da Dra. Silvia Di Santi, usando-se o protocolo de Gama et al. (2007). As reações foram realizadas em triplicata, usando-se sonda de hidrólise Taqman. Das 95 amostras, obtiveram-se 28,42% (27/95) de amostras positivas, sendo que cinco amostras amplificaram somente nessa técnica.

As outras 66 amostras foram ensaiadas em duplicatas em plataforma Bio Rad (CFX Manager, Bio Rad). Dessas 66 amostras, 28 amostras (42,42%) amplificaram, totalizando em 34,16% (55/161) de amostras positivas. Do total de positivos, sete (12,72%) eram animais de vida livre (7/55).

Das 20 amostras de primatas de vida livre, 35% (7/20) foram positivas pela PCR em tempo real.

5.4.1.3 Pesquisa de DNA de *Plasmodium* pela técnica de LAMP

Para a realização dos ensaios de 13 amostras de DNA extraídas de sangue de primatas seguindo o protocolo gênero-específico descrito por Han et al. (2007), utilizou-se o kit específico chamado de Loopamp® (Eiken Chemical Co. Ltda, Tochigi, Japão). Nenhuma amostra amplificou quando se

usou o kit comercial, assim como nenhuma amostra ensaiada com a *Bst* DNA polimerase (Biolabs) foi positiva.

A Figura 27 mostra a curva de amplificação dos controles positivos para *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* e de diluições na base 10 do plasmídeo de *P. falciparum*. A Figura 28 mostra a curva de amplificação dos contoles supracitados.

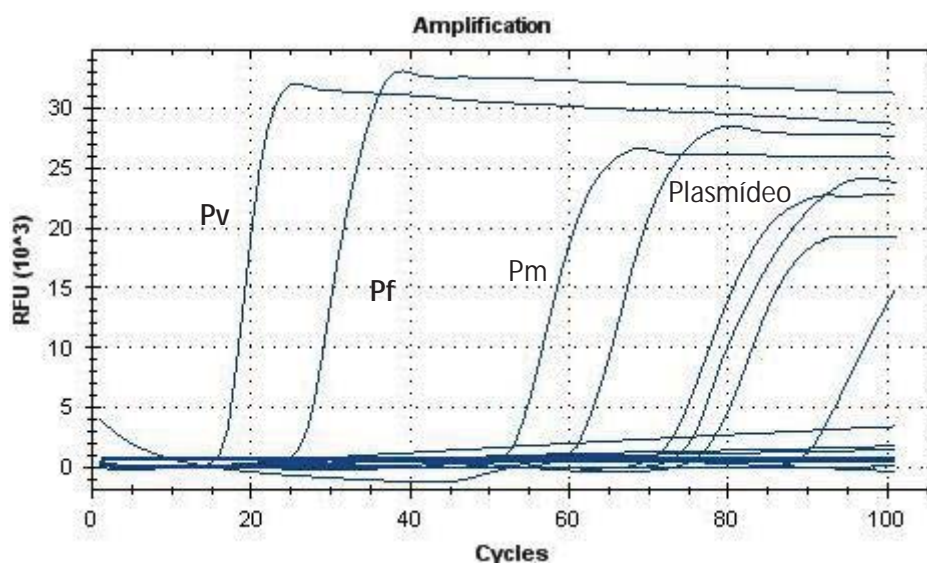


Figura 27. Curva de amplificação do DNA de *Plasmodium* spp. pela técnica de LAMP, usando-se controles positivos para *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) e *P. falciparum* (Pf) e plasmídeo construído a partir de fragmento de DNA de *P. falciparum*, diluídos na base 10.

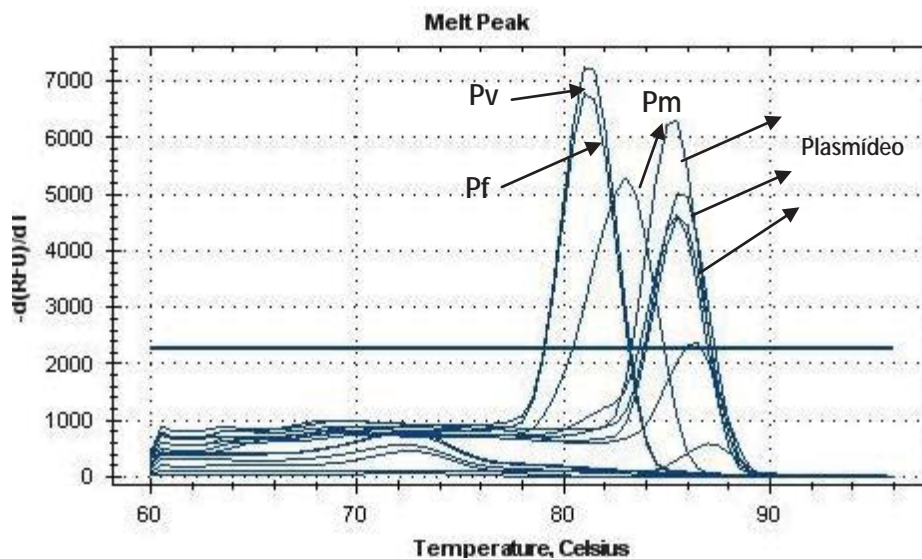


Figura 28. Curvas de dissociação de produtos amplificados pelo LAMP de *Plasmodium* spp. Controles positivos para *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) e *P. falciparum* (Pf) e plasmídeo construído a partir de fragmento 18S de DNA de *P. falciparum*, diluídos na base 10.

5.5 Diagnóstico sorológico

5.5.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. em amostras de soro de primatas neotropicais pela RIFI, utilizando-se antígenos de *P. falciparum* e *P. malariae*

As 151 amostras de soros de primatas neotropicais avaliadas mostraram-se não reagentes frente ao antígeno de *P. falciparum*, mesmo em diluições 1/20.

Devido à pouca disponibilidade de antígeno de *P. malariae*, foram selecionadas apenas dez amostras de soro de primatas neotropicais que tiveram amostras de DNA de sangue total positivas na semi-nested PCR para *P. malariae* (RUBIO et al., 1999). Das dez (10/151) amostras de soro de primatas neotropicais do gênero *Sapajus*, do CETAS de São Luís, testadas para a pesquisa de anticorpos contra as formas eritrocitárias de *P. malariae*, quatro mostraram-se sororreagentes em diluições 1:20 (Figura 29).

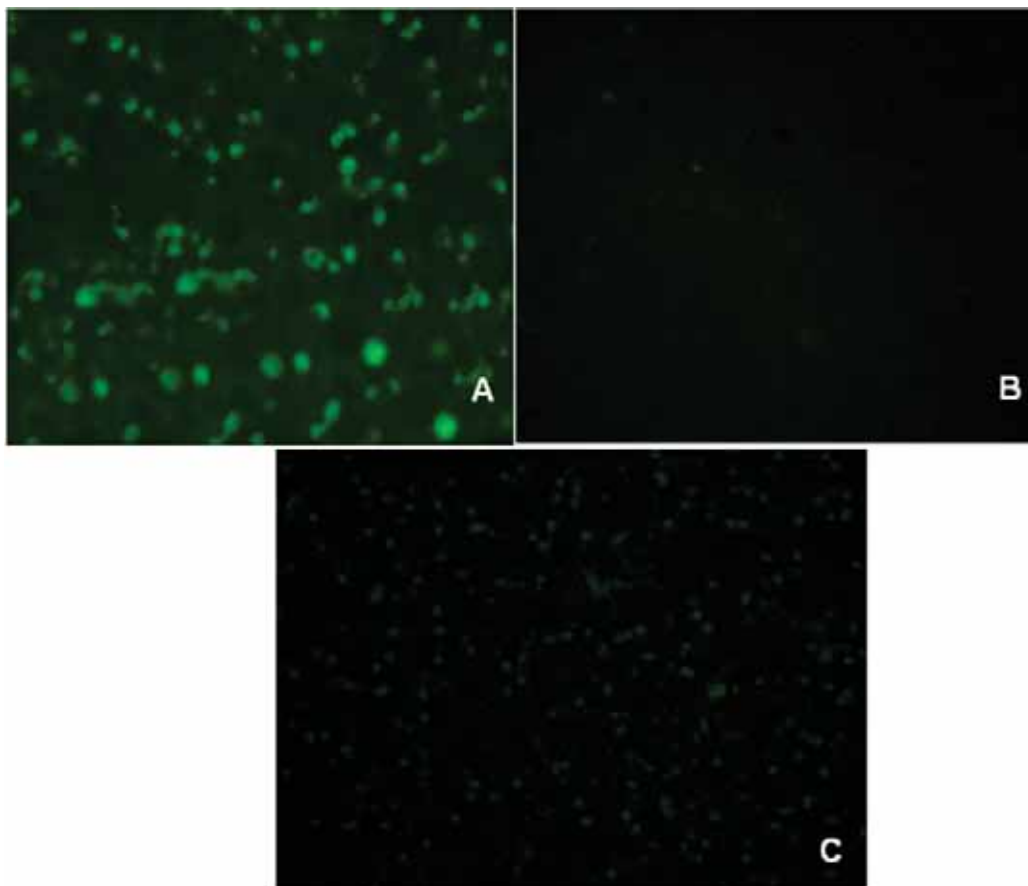


Figura 29. Fotomicrografia da reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos contra *P. malariae*: A – soro humano controle positivo, objetiva de 100x; B – soro controle humano negativo, objetiva de 40x; C – amostra sororreagente na diluição 1:20 de exemplar de *Sapajus* (macho) do CETAS-São Luís, objetiva de 40x.

5.5.2 Confirmação da separação das proteínas solúveis de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* pelo SDS-PAGE e Western blotting

Por um teste em pequena escala foi possível verificar a separação das grandes proteínas de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* de maior peso molecular. A confirmação da separação dessas proteínas pôde ser vista em gel SDS-PAGE e Western-blotting, usando-se soros controles positivos (humanos e de camundongo) (Figuras 30 e 31).

Os resultados da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstraram a presença de bandas polipeptídicas de peso molecular acima de 75kDa.

O procedimento utilizado foi suficiente para a separação das proteínas de rotrias de *P. falciparum* e *P. berghei* e permitiu a obtenção de quantidades de proteínas de 402 μ g/mL e 442,6 μ g/mL, respectivamente.

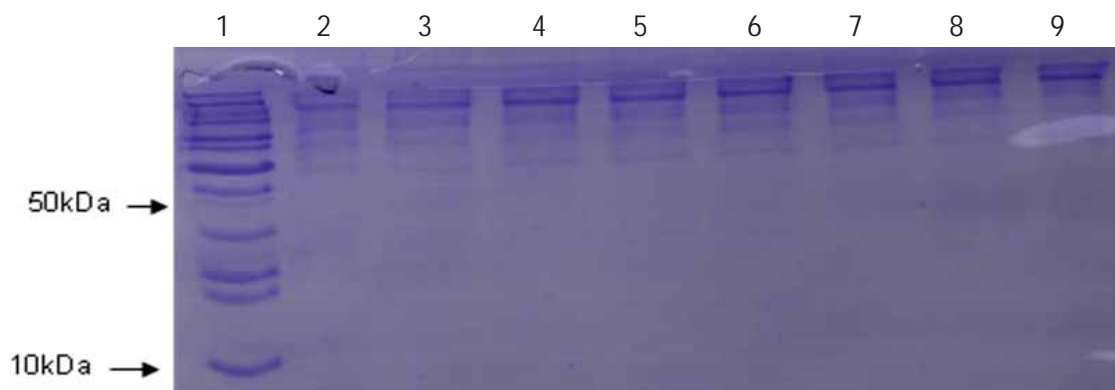


Figura 30. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corado com Comassie Brilliant Blue R-250, de amostras proteicas de rotrias de cultura de *P. falciparum* e de inoculação em camundongos BALB/c com cepa de *P. berghei*. Foi usado na linha 1 marcador de peso molecular Unstained Protein (Thermo Scientific), seguido (2 a 5) de fração de proteínas de rotrias de *P.falciparum* e *P. berghei* (6 a 9).

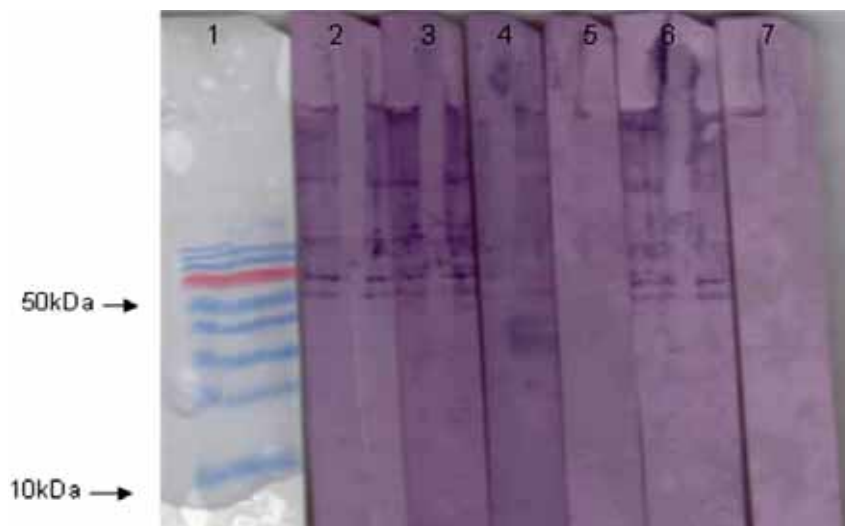


Figura 31. Visibilização da fração de proteínas de roptrias de *P. berghei* em membrana de nitrocelulose pelo Western blotting após incubação da membrana com amostras de soros humanos, controles positivo e negativo para *P. falciparum*. Foi usado marcador de peso molecular (linha 1) Prestained Protein (Thermo Scientific), seguido de soro humano positivo para *P. falciparum* nas diluições de 1:20 (linha 2), 1:50 (linha 4) e 1:100 (linha 6); soro humano negativo para *Plasmodium* spp. nas diluições de 1:20 (linha 3); 1:50 (linha 5) e 1:100 (linha 7).

5.5.3 Pesquisa de reatividade anti-*Plasmodium* spp. pelo ELISA-teste indireto em soro de humanos (controles positivos e negativos), usando-se antígenos de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e de *P. berghei*

As amostras de soros humanos controle positivo para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, assim como o soro de camundongo positivo para *P. berghei*, apresentaram baixa reatividade pela técnica de Dot-ELISA frente aos antígenos de roptrias de *P. falciparum* e *P. berghei* (Figura 32).

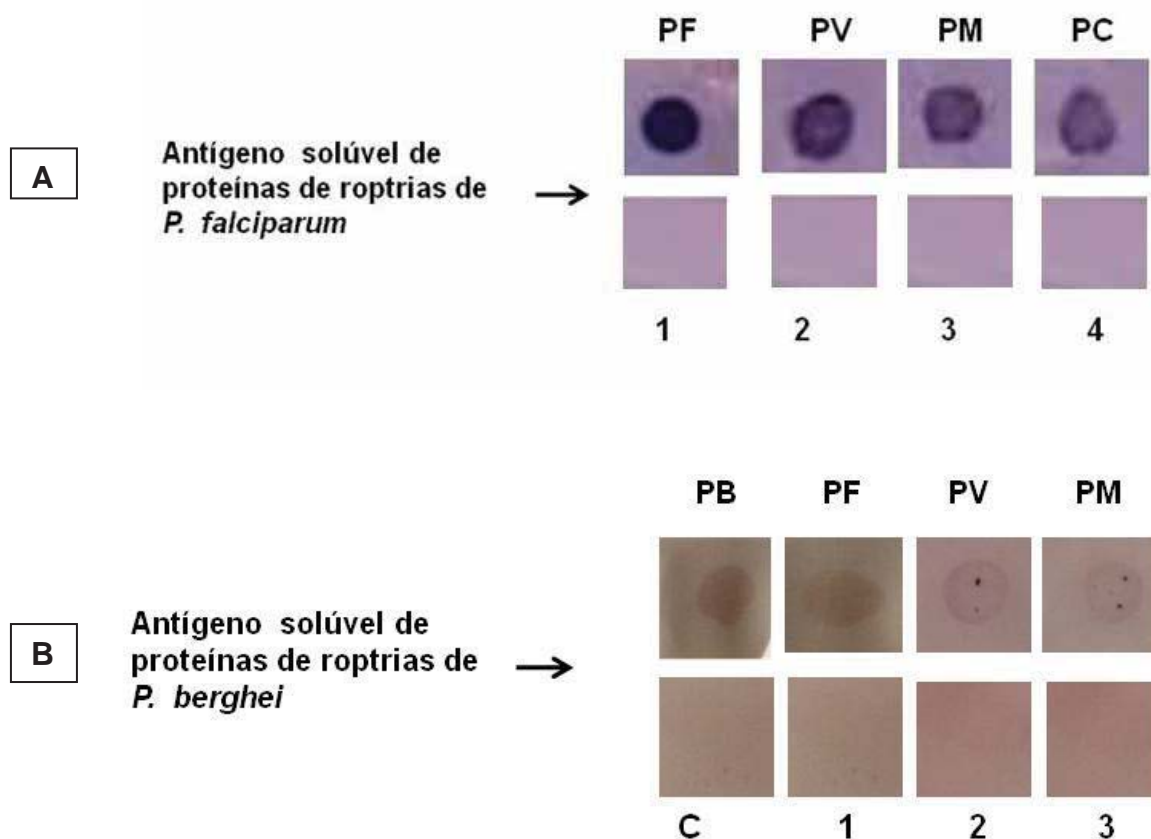


Figura 32. Fotografia da reatividade dos antígenos solúveis de proteínas de roptrias com amostras de soros humanos e de camundongos em membranas de nitrocelulose pela técnica de Dot-ELISA na diluição 1:100: **A** – reatividade entre o antígeno de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e as amostras de soros humanos positivos para *P. falciparum* (**PF**), *P. vivax* (**PV**), *P. malariae* (**PM**) e soro de paciente curado de *P. vivax* há um ano (**PC**), **1**, **2**, **3** e **4** são soros humanos negativos para *Plasmodium* spp.; **B** – reatividade entre o antígeno de roptrias de *P. berghei* e o soro de camundongo infectado com *P. berghei* (**PB**) e soros humanos positivos para **PF**, **PV** e **PM**, respectivamente, e soro de camundongo negativo (**C**), seguido de soros humanos negativos (**1**, **2** e **3**).

As amostras de soros humanos controle positivo para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, assim como o soro de camundongo positivo para *P. berghei*, apresentaram baixa reatividade pela técnica de ELISA-teste indireto. A concentração ótima do antígeno solúvel de proteínas de roptrias de *P. falciparum* e *P. berghei* foi a concentração de 2,5µg/mL e a diluição do soro 1:100.

5.5.1.4 Correlação dos resultados de pesquisa de *Plasmodium spp.* entre as técnicas morfológica, sorológica e molecular

As amostras de sangue de primatas neotropicais (1, 5, 17, 18 e 19), usadas para confeccionar as cinco lâminas que foram identificadas com *Plasmodium sp.*, só foram concordantes na PCR em tempo real. Nessas amostras não foram detectadas anticorpos anti-*Plasmodium spp.*

As amostras 141, 144, 150 e 156 sororreagiram frente ao antígeno de *P. malariae* e foram positivas na PCR convencional e em tempo real. A amostra 156 na análise de sequenciamento apresentou identidade de 100% com sequências de *P. malariae* depositadas no GenBank.

Para a PCR convencional, 15 amostras foram positivas em mais de uma técnica, sendo que dessas, sete eram de animais de vida livre capturados no Sítio Aguahy, São José de Ribamar.

Os protocolos da PCR convencional com maior número de amostras concordantes foram de Rubio et al. (1999) e Kimura et al. (1997), concordantes em 11 amostras, sendo sete de animais de vida livre.

5.6 Pesquisa de *Plasmodium spp.* em “pools” de anofelinos

5.6.1 Espécies de anofelinos e pontos de captura

Em janeiro de 2013 perdurou a estiagem que vinha desde dezembro do ano anterior. Como havia poucas coleções de água e o mangue estava seco não houve a proliferação do mosquito vetor e, dessa forma, não se capturou nenhum espécime.

No período de junho a julho de 2013, as chuvas iniciaram, e foi possível capturar 416 mosquitos de seis espécies diferentes. Alguns espécimes não puderam ser identificados até o táxon de espécie, devido a perdas de escamas, sendo classificados como *Anopheles (Nyssorhynchus)* sp. Todos os exemplares capturados foram identificados como pertencentes aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Anopheles*.

No Sítio Aguahy (São José de Ribamar), foram capturadas 379 fêmeas de anofelinos em seis pontos de captura: um mosquito foi capturado

sobre o funcionário do sítio e os outros 378 foram capturados nos outros cinco pontos. Nessa reserva, foram identificadas seis espécies de anofelinos: *Anopheles aquasalis* (368/379), *A. mediopunctatus* (2/379), *A. shannoni* (1/379), *A. nuneztovari* (1/379) e *A. (Nyssorhynchus) sp.* (7/379) (Tabela 14).

No Sítio Mangalho, Área de Proteção Ambiental (APA) do Maracanã, (São Luís) foram capturados 37 anofelinos. Nessa propriedade as capturas foram realizadas em três pontos das 16 horas às 22 horas. Um ponto foi localizado em uma das residências (varanda), usando-se atração humana protegida. Outro ponto de captura foi localizado na parte mais afastada da residência e mais arborizada, onde os primatas não humanos usam para forragear, e no qual foi utilizada armadilha tipo CDC. O último ponto de captura foi no extremo da propriedade, onde existe uma piscina rústica de pedras que tem contato com um braço de rio que passa na propriedade. Nesse local foi utilizada a armadilha tipo Shannon com isca luminosa e também cinco iscas humanas protegidas.

Um número expressivo de mosquitos foi capturado na varanda (área externa) da residência em apenas meia hora (21h 30 min às 22 horas) sobre os moradores (16/37), usando-se capturadores tipo Castro. Todos foram identificados como *A. aquasalis*. Os outros mosquitos foram capturados em armadilha Shannon (área de mata, com isca luminosa) (20/37) e um espécime foi capturado sobre atração humana protegida (1/37), às 16 h 30 min horas no primeiro dia de captura, quando a área para instalar a armadilha Shannon estava sendo limpa.

Tabela 10. Número de exemplares de *Anopheles* sp. por subgênero, espécie de anofelino e o local de captura na Ilha de São Luís, Maranhão, no ano de 2013.

Subgênero	Espécie	Nº de espécimes	Local de captura
	<i>A. aquasalis</i>	401	Sítio Aguahy (n=368) e Sítio Mangalho (n=33)
Nyssorhynchus	<i>A. goeldii</i>	01	Sítio Mangalho
	<i>A. evansae</i>	02	Sítio Mangalho
	<i>A. nuneztovari sensu lato</i>	01	Sítio Aguahy
	<i>Anopheles</i> sp.	08	Sítio Aguahy (n=7) e Sítio Mangalho (n=1)
Anopheles	<i>A. shannoni</i>	01	Sítio Aguahy
	<i>A. mediopunctatus</i>	02	Sítio Aguahy

No CETAS-São Luís não foi capturado nenhum anofelino. Tal fato se justifica porque essa parte do rio encontra-se em péssimas condições, poluída e fétida, e nenhuma forma larvária de *Anopheles* foi visualizada no mesmo.

5.6.2 Diagnóstico molecular em amostras de DNA de “pool” de anofelinos

5.6.2.1 PCR convencional e sequenciamento

Foram processados 54 “pools” de anofelinos, usando-se os protocolos de Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999) combinados e a *semi-nested* PCR *multiplex* o de Rubio et al. (1999).

Dos 54 “pools” de anofelinos ensaiados, três mostraram-se positivos para *Plasmodium* spp.: o “pool” 2 com 10 espécimes de *A. aquasalis* (Sítio Mangalho, São Luís); um “pool” com 10 espécimes de *A. aquasalis* (“pool” 12, Sítio Aguahy, São José de Ribamar); e o “pool” 10 com um espécime de *A. nuneztovari sensu lato* (Sítio Aguahy, São José de Ribamar). Os fragmentos

amplificados ficaram mais evidentes no protocolo de Santos et al. (2009) e Singh et al. (1999) combinados, e esses produtos de 240pb foram purificados e enviados para sequenciamento.

Na análise de identidade com sequências obtidas no BLAST do GenBank, o “pool” 2 apresentou 93% de identidade com *P. falciparum* isolado SF3, gene 18S rRNA (JQ627151.1). O “pool” 10 apresentou 99% de identidade com uma sequência de *Plasmodium* ZOOBH (EF090276), de Minas Gerais, identificada em ave silvestre de cativo. Já o “pool” 12 apresentou 97% de identidade com uma sequência de *P. vivax* El Salvador de esporozoíto (U07368.1).

5.7 Identificação molecular de fonte alimentar de anofelino

Uma vez que para a captura foi usada atração humana protegida, ou seja, oferta de hospedeiro no ambiente de captura, esse resultado foi considerado um viés. Dos 54 “pools”, em 44 (81,48%) foi identificado fragmento do gene citocromo B de DNA humano.

No “pool” 4 de *A. aquasalis*, foram identificadas duas fontes alimentares (cão e humano), ambas baseadas no gene citocromo B. No “pool” 44 dessa mesma espécie, identificou-se somente fragmento de DNA de gato (gene citocromo B).

Em 10 “pools” não foi amplificado nenhum fragmento de DNA dos hospedeiros testados, ou por terem se alimentado de outro hospedeiro que não foi pesquisado ou por não terem realizado nenhum repasto sanguíneo.

Nenhuma amostra amplificou fragmento citocromo B de DNA de ave. Assim como também não foi amplificado nenhum fragmento β_2 -microglobulina de DNA de primatas neotropicais.

6. DISCUSSÃO

A tríade epidemiológica da malária envolvendo mosquitos vetores, protozoários do gênero *Plasmodium* e primatas não humanos, ainda não é bem compreendida. Embora a descrição da circulação de plasmódios entre os primatas neotropicais nos diversos biomas brasileiros vem sendo relatada (DEANE, 1992; DUARTE et al., 2006), os vetores responsáveis pela manutenção da malária no ciclo silvestre ainda são especulados (FERREIRA NETO, DEANE; CARNEIRO, 1970; DUARTE et al., 2006).

No presente estudo, foram observados anéis (trofozoítos jovens) de *Plasmodium* sp. em cinco (5/322) lâminas de sangue de primatas neotropicais (três de esfregaço sanguíneo e duas de gota espessa) sob microscopia de luz. No entanto, não puderam ser identificados até o táxon de espécie devido às formas trofozoíticas jovens serem muitos semelhantes dentre as espécies de plasmódio (FIGUEIREDO et al., 2015). O diagnóstico baseado em morfologia de espécies de plasmódio que infectam primatas não humanos é desafiador e pode levar a um resultado ambíguo, mesmo quando realizado por microscopistas experientes, como ocorreu na Malásia, nos anos de 1999 e 2000, quando amostras de sangue de humanos infectados com *P. knowlesi* (espécie de plasmódio natural de macacos do gênero *Macaca*) estavam sendo erroneamente diagnosticadas como *P. malariae* (SINGH et al., 2004).

Plasmodium malariae também pode ser confundido com *P. vivax* em exame microscópico de gota espessa, uma vez que a forma do anel das duas espécies é bastante semelhante (SCOPEL et al., 2004). A dificuldade em diferenciar as formas jovens de plasmódio se acentua ainda mais em baixas parasitemias, caso deste estudo, visto que um ou dois trofozoítas foram identificados em cada lâmina, em todos os campos observados. Dessa forma, como ocorreu na Índia e na Malásia, muitos casos do *P. malariae* podem estar sendo erroneamente diagnosticados, na rotina microscópica de gota espessa, como *P. vivax* em diversos países (SINGH et al., 2004).

Nas Américas Central e Sul, são conhecidas duas espécies de plasmódios que infectam primatas neotropicais, *P. brasilianum* e *P. simium*, com semelhanças morfológicas e genéticas a *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente, espécies de *Plasmodium* do Velho Mundo que infectam

humanos (ESCALANTE et al., 1995, 1998; QARI et al., 1996; FANDEUR et al., 2000; TAZI e AYALA, 2011). Nas áreas da América do Sul, nas quais seres humanos e primatas neotropicais coexistem, é impossível diferenciar infecções de *P. malariae* de *P. brasilianum* e de *P. vivax* de *P. simium* por microscopia de luz (COLLINS; JEFFERY, 2007). Devido à semelhança entre as espécies do Novo e Velho Mundo, alguns autores sugerem o uso da designação *P. brasilianum/P. malariae*, quando o parasita for identificado em amostras de primatas: e *P. malariae/P. brasilianum*, quando for identificado em amostras de humanos (ESCALANTE; BARRIO; AYALA, 1995; FANDEUR et al., 2000; BUENO et al., 2013).

A microscopia de luz, apesar de ser o padrão-ouro para diagnóstico de espécies de malária humana, apresenta sensibilidade relativamente baixa em infecções mistas e, especialmente, em casos com baixa parasitemia (TANGPUKDEE et al., 2009). Este último é relevante quando se trata de amostras de sangue de primatas neotropicais que, normalmente, têm infecções crônicas com baixa parasitemia (AMERI, 2010), independentemente da espécie do animal ou do bioma por ele habitado (CHINCHILLA et al., 2006; YAMASAKI et al., 2011). Apesar da espécie de plasmódio, *P. brasilianum/P. malariae* é a mais comumente diagnosticada em primatas neotropicais nas Américas (DEANE, 1992; FAUNDEUR et al., 2000; DUARTE et al., 2008). Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil com amostras de primatas neotropicais, a microscopia de luz não demonstra ser uma técnica com sensibilidade para padrão-ouro, sendo os testes moleculares mais sensíveis (DUARTE et al., 2008; YAMASAKI et al., 2011; BUENO et al., 2013). Atualmente, com microscopistas não muito experientes e na ausência de suspeita de uma zoonose, provavelmente o diagnóstico da espécie de plasmódio humano, induzido por esses fatores, será a espécie mais comum na área de infecção (BAIRD, 2009). Esse equívoco foi responsável por mortes causadas por malária grave na Ásia, visto que o agente causador dos surtos era *P. knowlesi* tratando-se de uma zoonose (SINGH et al., 2004).

Neste trabalho, foi utilizado um kit de Teste de Diagnóstico Rápido (TDR) aprovado pela OMS, padronizado para identificar uma ou mais das quatro espécies de plasmódio que infectam humanos. Foram ensaiadas 161 amostras de sangue de primatas neotropicais. Não foram obtidos resultados

positivos neste trabalho, usando-se o First Response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo *P.f.* and PAN Detection Card Test para detecção de antígeno de *Plasmodium*. Mesmo existindo muitos testes de diagnóstico rápido disponíveis comercialmente para detectar malária humana, atualmente não existem testes disponíveis para detectar espécies de plasmódio de primatas não humanos. Ensaio têm demonstrado que os anticorpos contra pLDH, que detectam parasitas da malária humana, tais como *P. falciparum* e *P. vivax*, podem também serem usados para detectar *P. knowlesi*. No entanto, tem sido recomendado que, em amostras de sangue de primatas, TDRs projetados para detectar malária humana devem ser usados com grande cautela e não devem substituir a microscopia de luz, sendo recomendados como teste secundário (AMERI, 2010). Estes são os primeiros resultados do uso de TDR na pesquisa de *Plasmodium* em amostras de sangue total de primatas neotropicais. No entanto, a baixa parasitemia, característica dessas amostras, estão baixo do limiar de detecção do kit, que é de 100 parasitas/ μ L.

Neste estudo, em relação à detecção de anticorpos anti-*Plasmodium* spp., 150 amostras de soros de primatas neotropicais ensaiadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foram não reagentes frente ao antígeno de *P. falciparum* (formas assexuadas/cultura) e de *P. berghei* (formas assexuadas/produzidas em camundongos). No entanto, quatro amostras de soro de *Sapajus* sp. (CETAS-São Luís) foram sororreagentes contra antígenos de *P. malariae*. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Duarte et al. (2006) que usou a mesma técnica, mas nenhuma amostra de soro de *Callithrix* (n=44) e de *Cebus apella* (n=56) foi reagente para os três antígenos usados (*P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*). Segundo os autores, esses animais não desempenham um papel epidemiológico importante na cadeia da malária nas áreas estudadas (Cerrado e Mata Atlântica). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo discordam dos obtidos por outros autores que identificaram títulos altos de anticorpos pela RIFI contra antígenos de *P. brasilianum*/*P. malariae* e de *P. vivax* em amostras de sangue de primatas neotropicais de cativeiro no Estado de São Paulo (YAMASAKI et al., 2011) e de vida livre na Guiana Francesa (VOLNEY et al., 2002).

Entretanto a literatura relata maior sensibilidade na detecção de anticorpos pelo ELISA-teste, tanto para soros humanos quanto para de

primatas neotropicais (VOLNEY et al., 2002; YAMASAKI et al., 2011). Devido a esse fato, neste estudo, tentou-se a padronização de ensaio, utilizando-se antígeno solúvel de proteínas de rotrias de *P. falciparum* (cultura) e de *P. berghei* oriundos de hemácias parasitadas de camundongos infectados. Sabe-se que o ELISA-teste tem maior sensibilidade que a RIFI e sua utilização é mais satisfatória (DUARTE et al., 2006; YAMASAKI et al., 2011), devido à dificuldade em conseguir hemácias infectadas com *P. vivax* e com *P. malariae*, visto que essas duas espécies não se mantêm em cultura “*in vitro*”, e a parasitemia em pacientes humanos infectados é baixa. Seria necessário trabalhar com infecção de primatas não humanos esplenectomizados para produção de hemácias infectadas (COLLINS; JEFFERY, 2007).

Devido à complexa resposta imune frente aos antígenos de *Plasmodium*, na rotina clínica a sorologia não se aplica ao diagnóstico da malária humana (TANGPUKDEE et al., 2009) e nem de primatas não humanos. Além disso, esses ensaios podem não ser úteis para o diagnóstico de infecção de malária grave, devido à produção de anticorpos ser demorada e, para uma razoável produção de anticorpos, o hospedeiro precisa de desafios constantes com picadas de mosquitos infectados para minimizar a sintomatologia em infecções graves. Em infecções recentes, a titulação é maior que 200 (diluição 1:200) e, nas antigas, maiores que 20 (1:20) (TANGPUKDEE et al., 2009). Em primatas, a produção é ainda menor, e a detecção por métodos sorológicos não é eficiente (DUARTE et al., 2006; YAMASAKI et al., 2011). Portanto fica muito evidente a dificuldade em detectar anticorpos em primatas neotropicais, visto que a reatividade na RIFI só foi observada neste trabalho em diluições 1:20 e usando antígeno de *P. malariae*, que é a espécie normalmente diagnosticada em primatas amazônicos.

Sabe-se que a utilização de antígenos de plasmódio produzidos em laboratório (em especial os de animais) normalmente é empregada no sorodiagnóstico da malária humana, devido à reação cruzada entre as espécies (BOULOS et al., 1984). Mesmo alguns autores afirmando que o sero-diagnóstico pode ser utilizado como teste de triagem para confirmação de exposição à infecção atual ou antiga de malária (ARRUDA et al., 1989; VOLNEY et al., 2002), as respostas muitas vezes não são tão expressivas,

mesmo em áreas endêmicas e, dessa forma, a reação cruzada também é baixa. Nos testes imunocromatográficos (testes de diagnóstico rápido) para a pesquisa de anticorpos contra *Plasmodium* spp., a sensibilidade também é baixa (MURRAY et al., 2003; AMERI, 2010). A detecção de anticorpos anti-*Plasmodium* em amostras de soro de primatas neotropicais de vários biomas do Brasil mostrou índices de reatividade baixa tanto na RIFI quanto no ELISA (DUARTE et al., 2006). Estes autores pesquisaram também anticorpos em amostras de soro de espécies de *Callithrix* e *Sapajus* (espécies sororreagentes neste estudo) de dois biomas diferentes (Cerrado e Mata Atlântica), os quais foram soronegativos nos dois testes sorológicos (RIFI e ELISA).

No presente estudo, o número de positivos pelo diagnóstico molecular foi significativamente maior que aqueles obtidos pela detecção direta (morfológico) e de anticorpos anti-*Plasmodium*. A ideia inicial era conseguir um consenso entre três técnicas da PCR convencional, utilizando-se como gene alvo 18S. No entanto, os resultados mostraram-se discordantes. Dessa forma, foram incluídas mais duas técnicas gênero-específicas, sendo: uma associação entre os protocolos de Santos et al. (2009) + Singh et al. (1999), tendo como gene alvo 18S. Contudo, foi escolhida como padrão-ouro para este estudo a semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al., 1999), considerada mais sensível, com maior reprodutibilidade e a mais rápida dentre as técnicas testadas.

Neste trabalho, 49 amostras de DNA extraídas de sangue de primatas neotropicais mostraram-se positivas, quando foi utilizado a semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al., 1999) como diagnóstico espécie-específico para *P. malariae* (47/49) e *P. vivax* (2/49). A amplificação gênero-específica foi observada em 29 amostras pela semi-nested PCR (KIMURA et al., 1997), 10 amostras pela nested PCR (SNOUNOU et al., 1993) e em cinco pela associação de dois protocolos (SANTOS et al., 2009 + SINGH et al., 1999). Resultados falsos negativos são relatados por vários autores em amostras com baixa parasitemia, chamando de “fenômeno do tudo ou nada”, quando são realizadas diversas amplificações de uma mesma amostra e, em algumas dessas reações, podem apresentar resultados divergentes, devido à parasitemia ser próxima ao limiar de detecção (BOONMAN et al., 2007;

YAMASAKI et al., 2011). Portanto, para amostras com baixas parasitemias recomendam-se mais de um ensaio pela PCR (BOONMAN et al., 2007).

Em relação à PCR, a técnica vem sendo utilizada desde a década de 90 para a detecção precoce de *Plasmodium* em pacientes humanos. Vários ensaios experimentais que utilizaram vários iniciadores e diversas formas de extração têm sido relatados (BARKER et al., 1992; KAIN et al., 1993; SNOUNOU et al., 1993). Em geral, a PCR é mais sensível e específica do que o exame de gota espessa ou esfregaços de sangue, particularmente em casos de baixas parasitemias ou infecções mistas (BROWN et al., 1992; MOODY, 2002; RUBIO et al., 1999). A técnica da PCR também foi mais sensível do que vários ensaios de testes rápidos imunocromatográficos (HUMAR et al., 1997). Embora a maior parte dos estudos tenha mostrado que a PCR é mais sensível e específica para o diagnóstico da malária, existem limitações que podem afetar a precisão do método. Seleção de iniciadores adequados, métodos utilizados para a coleta e armazenamento de amostras de sangue, e métodos de extração podem afetar o desempenho da técnica (COLEMAN et al., 2006).

Discordância de resultados entre técnicas moleculares e microscopia também foram relatadas por outros autores em amostras de sangue de primatas neotropicais (DUARTE et al., 2008; YAMASAKI et al., 2013) e de humanos (COLEMAN et al. 2006; BOONMA et al., 2007). Neste estudo, as amostras positivas na microscopia não foram positivas na PCR convencional. A microscopia apresentou 3,10% (5/161) de positividade e a PCR convencional 30,43% (49/161) na PCR, usando-se somente os resultados da semi-nested multiplex PCR, utilizada como padrão-ouro. Dessa forma, o resultado deste estudo corrobora os descritos por diversos autores pelos quais baixas parasitemias podem causar discordância entre técnicas de diagnósticos, independentemente do tipo de amostras de humanos ou de primatas neotropicais (COLEMAN et al. 2006; BOONMA et al., 2007; DUARTE et al., 2008; YAMASAKI et al., 2011).

No entanto, as cinco amostras com lâminas positivas na microscopia somente amplificaram na PCR em tempo real. Fato compreensível, visto que essa técnica é mais sensível que a PCR convencional. Inclusive, tal técnica vem sendo usada no diagnóstico precoce de malária em humanos e indicada

para casos de baixa parasitemia (BOURGEOIS et al., 2010). Neste trabalho, foram obtidas 61 (37,88%) amostras positivas pela PCR em tempo real, 7,45% a mais que a PCR convencional. Em estudos anteriores, os resultados da PCR em tempo real sempre são mais sensíveis em comparação com a PCR convencional e com a microscopia, por isso o número de amostras positivas nessa técnica também é superior (BOONMA et al., 2007). Os resultados da maioria das amostras foram com Cqs acima de 35, corroborando os dados de baixa parasitemia dessas amostras.

Contraditoriamente, nenhuma amostra de DNA extraída de sangue de primatas neotropicais mostrou-se positiva neste estudo, usando-se a técnica de LAMP, uma técnica desenvolvida para ser mais sensível que a PCR em tempo real, pois se utiliza de seis sítios-alvo dentro do DNA molde. Embora estudos anteriores afirmem que o LAMP seja bastante sensível, com limiar de detecção de 5 parasitos/ μ L, a técnica da PCR em tempo real usada neste trabalho mostrou-se mais sensível, com detecção de 0,5 parasito/ μ L (GAMA et al., 2007), assim como as técnicas da PCR convencional com detecção de 1 parasito/ μ L (SNOUNOU et al., 1993; SINGH et al., 1999). Inicialmente, selecionaram-se 13 amostras, sabidamente positivas na PCR em tempo real, para serem ensaiadas pela técnica de LAMP, usando-se o kit Loopamp DNA (Eiken Chemical CO. Ltda, Japão). Nenhuma amostra foi amplificada. Tal fato se repetiu com todas as outras amostras testadas pela técnica e a amplitude da curva de amplificação dos controles positivos foi baixa. A maioria dos protocolos para LAMP foram padronizados, usando-se amostras clínicas de pacientes humanos com sintomatologia clínica de malária (PATEL et al., 2013). Segundo os autores da técnica de LAMP usada neste trabalho (HAN et al., 2007), o protocolo padronizado tem sensibilidade semelhante à da microscopia e uma especificidade maior que esta, porém os resultados são semelhantes aos de *nested* PCR para a detecção das quatro espécies de malária humana (HAN et al., 2007). O resultado apresentado leva a inferir que pelo menos para *Plasmodium*, em amostras de primatas neotropicais, a técnica também não é tão sensível.

Diante da complexidade da malária simiana e da necessidade de entender a cadeia epidemiológica, no presente trabalho foi realizado, de forma incipiente, capturas de mosquitos anofelinos em áreas com presença

de primatas neotropicais em dois municípios da Ilha de São Luís. Deve ser considerado que somente duas espécies de primatas ocorrem naturalmente nessa região, *Sapajus* sp. e *Saimiri sciureus*. As capturas foram realizadas de acordo com o comportamento desses animais. *Sapajus* tem comportamento de descer ao nível do solo, enquanto *Saimiri sciureus* explora somente a copa das árvores. Dessa forma, as capturas foram realizadas a nível próximo do solo, a dois metros do solo e na copa das árvores. Capturaram-se, neste estudo, seis diferentes espécies de anofelinos próximo do solo, *A. shannoni*, *A. mediopunctatus*, *A. goeldii*, *A. aquasalis*, *A. evansae* e *A. nuneztovari sensu lato*, o que corrobora parcialmente o estudo de Xavier e Rebêlo (1999), realizado no município de Raposa (Ilha de São Luís), no qual os autores também encontraram seis espécies de anofelinos. No entanto, somente as três últimas espécies supracitadas foram relatadas por eles, e outras três espécies foram diferentes das identificadas neste estudo. Por outro lado, Rebêlo et al. (2007) identificaram nove espécies de anofelinos no município de São Luís. Isso se justifica tanto pelo maior número de meses de captura quanto pelo superior tamanho amostral ($n=2.132$) em relação ao do presente estudo ($n=416$). Outras pesquisas da fauna anofélica no interior do Estado do Maranhão também mostraram uma grande variedade de espécies distribuídas ao longo do ano (OLIVEIRA-PEREIRA; REBÊLO, 2000; REBÊLO et al., 2007).

As espécies de anofelinos também possuem diferentes padrões de ocorrência de acordo com os horários e preferência alimentar. *A. aquasalis* foi a espécie mais frequente nas áreas de estudo, representando 96,4% da amostra total e foi capturada nas duas áreas de pesquisa, São Luís e São José de Ribamar. Também Rebêlo et al. (2007) relataram um número muito superior dessa espécie, nos dois municípios citados, em relação às outras espécies de anofelinos. Essa espécie é incriminada como vetora principal da malária na Ilha de São Luís (RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2006). *A. aquasalis* é vetor importante também em outras regiões do Norte e Nordeste do Brasil e sua capacidade vetorial só é potencializada quando em elevada densidade (DEANE, CAUSEY; DEANE, 1946), passando a invadir as residências humanas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em outros países, como a Colômbia (HERRERA-VARELA et al., 2014), a

Venezuela (RUBIO-PALIS, WIRTZ; CURTIS, 1992) e a Guiana Francesa, (PIMENTA et al., 2015) *A. aquasalis* tem sido capturado em grande número e em diversos horários, até durante o dia (SINKA et al., 2010) e sempre é considerado como vetor primário em áreas litorâneas. Essa espécie de anofelino tem comportamento natural de exofilia e zoofilia, especialmente de sangue de animais domésticos, sua fonte de alimento habitual, mas em casos de alta densidade e ausência de animais, apresenta comportamento alimentar bastante variado, e se alimenta de sangue de humanos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em Belém, o mosquito é primariamente zoofílico (GALVÃO et al., 1942), ao passo que no Nordeste, é mais antropofílico. Esse fato é creditado ao clima semiárido que torna o ambiente menos favorável à abundância de animais (DEANE; CAUSEY; DEANE, 1948; FLORES-MENDONZA et al., 1996). Já, no Sudeste Brasileiro, *A. aquasalis* tem sido observado com comportamento alimentar em humanos e em animais domésticos ao ar livre (FLORES-MENDONZA et al., 1996). Na Guiana e no Oeste do Panamá, verificou-se que é um mosquito muito zoófilo, não sendo encarado como de importância epidemiológica (GIGLIOLI, 1940; ROZEBOOM, 1942).

Alterações no ambiente podem alterar o comportamento de vetores. Na Guiana, em 1963, Giglioli já relatava o efeito da mecanização em uma fazenda de arroz, que levou ao desaparecimento de búfalo na região, resultando numa mudança de comportamento de *A. aquasalis*, o qual passou a ter o homem como sua principal fonte de alimento. Neste trabalho, *A. aquasalis* apresentou maior diversidade de fontes alimentares. Em dois “pools” de *A. aquasalis* foram identificadas duas fontes alimentares (cão e humano) e, em um “pool” (44) dessa mesma espécie, identificou-se fragmento de DNA de gato doméstico, corroborando os resultados de Flores-Mendonza et al. (1996) que identificaram uma diversidade de fontes alimentares em *A. aquasalis* usando o teste da precipitina.

No presente trabalho, foi amplificado DNA de *Plasmodium* em dois “pools” de *A. aquasalis*, tanto pela PCR em tempo real quanto pela PCR convencional gênero-específica. Os produtos foram sequenciados e a identidade das sequências foi com *P. falciparum* (93%) e *P. vivax* (97%), corroborando os resultados de trabalhos que relatam a dificuldade de

diagnosticar *P. malariae* em anofelinos mesmo em áreas endêmicas para esse protozoário (OLANGA et al., 2015).

Outro anofelino capturado neste estudo foi *A. nuneztovari sensu lato*, o qual apresenta comportamento acrodendrófilo e geralmente é capturado em maior número no interior do Maranhão (REBÊLO et al., 2007). Normalmente é mais encontrado em áreas de florestas do que em ambiente antrópico (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em Buriticupu (Estado do Maranhão) é encontrado em baixa densidade e geralmente fora dos domicílios, por isso é considerado vetor secundário de malária (REBÊLO et al., 1997). No município de Raposa, Ilha de São Luís, em pesquisa de fauna anofélica, o número de exemplares capturados não foi superior a dois, tanto no intra como no peridomicílio (XAVIER; REBÊLO, 1999). O fato de poucos exemplares de *A. nuneztovari* serem frequentemente capturados na Ilha de São Luís corrobora os resultados deste estudo. Na Amazônia Brasileira, esse anofelino já foi identificado naturalmente infectado com *P. vivax* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) e na Guiana Francesa com *P. falciparum* (DUSFOUR et al., 2012). Na Venezuela e na Colômbia, é considerado vetor primário da malária. No Brasil, no Estado do Pará, há relato de exemplares infectados naturalmente com *Plasmodium* (CALADO et al., 2008). Neste trabalho, essa espécie apresentou-se positiva para *Plasmodium* sp. e, na análise de sequenciamento, mostrou 99% de identidade com *Plasmodium* isolado de ave silvestre do Zoológico de Minas Gerais.

Em se tratando de *A. evansae*, em capturas de doze horas consecutivas, aparecem quase que durante toda a noite (OLIVEIRA-PEREIRA; REBÊLO, 2000). Neste estudo, foram capturados dois exemplares entre 18 h 30 min e 21 h 30 min, em armadilha Shannon com isca luminosa, no município de São Luís (Sítio Mangalho). Este anofelino tem sido capturado em maior número na Amazônia Maranhense (REBÊLO et al., 1997; REBÊLO et al., 2007). Em outros Estados já foi diagnosticado com plasmódio, principalmente oocisto, mas, devido ao seu comportamento exofílico e zoofílico, os especialistas em malária dão pouca importância a esse vetor, pois não tem importância como vetor da malária humana (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Segundo Rebêlo et al. (2007), *A. evansae* não é muito encontrado dentro das residências, sendo capturado mais

frequentemente no peridomicílio. No Estado de São Paulo (Divinolândia), em área de *Plasmodium tropiduri* (parasita de lagarto *Tropidurus torquatus*), foi capturado um exemplar de *A. evansae* com formas sugestivas de oocisto de plasmódio (ROCHA E SILVA; RODRIGUES, 1974). No espécime capturado neste trabalho, não foi diagnosticada a presença de *Plasmodium*, e somente DNA de humano foi amplificado.

Os outros exemplares de anofelinos, *A. goeldii* (n=1), *A. mediopuctatus sensu lato* (n=2) e *A. shannoni* (n=1) foram capturados, neste trabalho, em número muito inferior ao *A. aquasalis*. E, nesses exemplares, somente foi identificado fragmento de DNA humano, com exceção de *A. shannoni*, em que nenhum fragmento de DNA foi identificado.

Com exceção de *P. brasilianum*, nenhum outro parasita da malária simiana é conhecido por pertencer à clade de *P. malariae*. Dessa forma, não só em regiões amazônicas, mas também em áreas de Mata Atlântica, pessoas podem estar sendo infectadas por *P. brasilianum/P. malariae*, acarretando em aumento da morbidade e no risco de transfusão de sangue por essa espécie ser subdiagnosticada (DI SANTI et al., 2005; PINA-COSTA et al., 2014). Apesar da baixa morbidade em humanos, este parasita apresenta influências deletérias no hospedeiro, como redução da resistência a outros patógenos, síndrome nefrótica em crianças (ABDURRAHMAN et al., 1990) e alterações nas características da infecção de outros plasmódios. Frequentemente, *P. malariae* é encontrado em infecções mistas com *P. falciparum* ou *P. vivax*. Estudos têm demonstrado que humanos com co-infecção de *P. falciparum* com *P. malariae* têm redução de acessos febris e aumento da produção de gametócitos de *P. falciparum* (MCKENZIE; BOSSERT, 1997; MCKENZIE, JEFFERY; COLLINS, 2002), podendo alterar os índices de transmissão.

Plasmodium brasilianum e *P. simium* podem infectar seres humanos. Devido à contínua e crescente invasão do ambiente silvestre pelas populações humanas, o potencial zoonótico sempre deve ser considerado, assim como o comportamento e a capacidade de adaptação de parasitas e vetores. Estratégias com base em mais pesquisas precisam ser desenvolvidas para a prevenção e o diagnóstico da malária zoonótica.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir:

1. *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum* circulam entre os primatas neotropicais na Ilha São Luís, Estado do Maranhão.
2. Os primatas neotropicais em infecções naturais com *Plasmodium* apresentam baixas parasitemias, dificultando o diagnóstico.
3. Os protocolos de PCR empregados apresentaram maior sensibilidade para diagnóstico de *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas neotropicais que as técnicas de microscopia e sorologia.
4. O protocolo de PCR em tempo real empregado apresenta maior sensibilidade para detectar *Plasmodium* em amostras de sangue de primatas neotropicais com baixas parasitemias.
5. A espécie *A. aquasalis* é a mais abundante na Ilha de São Luís e foi encontrada infectada com plasmódio, confirmando sua importância como espécie vetora principal na Ilha de São Luís.

8. REFERÊNCIAS

ABDURRAHMAN, M.B.; AIKHIONBARE, H.A.; BABAOYE, F.A.; SATHIAKUMAR, N.; NARAYANA, P.T. Clinicopathological features of childhood nephrotic syndrome in northern Nigeria. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 75, p. 563–576, 1990

ALVARENGA, D.A.M.; PINA-COSTA, A.; SOUSA, T.N.; PISSINATTI, A.; ZALIS, M.G.; SUÁRES-MÚTIS, M.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; BRITO, C.F.A. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal**, v.14, n. 81 p. 2-9, 2015.

AMERI, M. Laboratory diagnosis of malaria in nonhuman primates. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39,n. 1, p.5–19, 2010.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.4, n. 1, 2012.

ARRUDA, M.; NARDIN, E.H.; NUSSENZWEIG, R. S.; COCHRANE, A. H. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, n. 4, p. 379-385, 1989.

BAIRD, J.K. Malaria zoonoses. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 7, p.269-277, 2009.

BARBOSA, L.M.C.; SOUTO, R.N.P.; FERREIRA, R.M.A.; SCARPASSA, V.M. Composition, abundance and aspects of temporal variation in the distribution of *Anopheles* species in an area of Eastern Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n. 3, p. 313-320, 2014.

BARCELAR, R. C. Brazil's contribution to tropical medicine and malaria. **Proceedings of the Seventh International Congresses on Tropical Medicine and Malaria**, Rio de Janeiro, ed. Gráfica Olimpica, 1963.

BARKER, R.H.JR.; BANCHONGAKSORN, T.; COURVAL, J.M.; SUWONKERD, W.; RIMWUNGTRAGOON, K.; WIRTH, D.F. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 46:416-426, 1992.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BEESON, P.B.; McDERMOTT, W.; WYNNGARDEN, J.B. **Tratado de Medicina Interna**. Editora Pueblo y Educación. Habana, Cuba. v. 1, p. 681-690. 1984.

BERNIER, U.R.; BOOTH, M.M.; YOST, R.A. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 1. Thermal desorption of attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*) from handled glass beads. **Analytical Chemistry**. V. 71, p. 1–7, 1999.

BERNIER, U. R.; KLINE, D. L.; BARNARD, D. R.; SCHRECK, C. E.; YOST, R. A. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Analytical Chemistry**, v.72, p. 747–756, 2000.

BLACKLOCK, B.; ADLER, S. A parasite resembling *Plasmodium falciparum* in a chimpanzee. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**. 16, p. 99–106, 1922.

BOONMA, P.; CHRISTENSEN, P.R.; SUWANARUSK, R.; PRICE, R.N.; RUSSELL, B.; LEK-UTHAI, U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v.6, p. 124, 2007.

BOULOS, M.; CENEVIVA, A.C.; SHIROMA, M.; CAMARGO, M.E.; CSTILHO, E.A. Inquérito soropidemiológico sobre malária em escolares de marabá, Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 60-65, 1984.

BOURGEOIS, N.; BOUTET, A.; BOUSQUET, P.-J.; BASSET, D.; DOUARD-ENAUULT, C.; CHARACHON, S.; LACHAUD, S. Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. Infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 8, p. 1305–1311, 2010.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 143-161, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação da Malária em 2007**. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 20 dezembro 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico da malária nº 01/2003**. Informe. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2005

BRASIL. **Secretaria de Estado da Saúde**. 2009. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br>>. Acesso em: 26 novembro 2009.

BROWN, A.E.; KAIN, K.C.; PIPITHKUL, J.; WEBSTER, H.K. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p.609-612, 1992

BRUCE-CHWATT, L.J. Paleogenesis and paleo-epidemiology of primate malaria. **WHO**. V. 32, p. 363-387, 1965.

BRUCE-CHWATT, I.J. Essencial Malariology. **Heinemann Medical Books**, London, 2 ed, 1985.

BUENO, M.G.; ROHE, F.; KIRCHGATTER, K.; DI SANTI, S.M.F.; GUIMARÃES, L.O.; WITTE, C.L.; COSTA-NASCIMENTO, M.J.; TONIOLO, C.R.C.; CATÃO-DIAS, J.L. Survey of *Plasmodium* spp. in Free-Ranging Neotropical Primates from the Brazilian Amazon Region impacted by Anthropogenic Actions. **EcoHealth**, v. 10p. 48–53, 2013.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.T. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CALADO, D.C.; FOSTER, P.G.; BERGO, E.S.; DOS SANTOS, C.L.; GALARDO, A.K.; SALLUM, M.A. Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 791-799, 2008.

CANAVEZ, F.C.; MOREIRA, M.A.M.; LADOSKI, J.L.; PISSINATI, A.; PARHAN, P.; SEUANEZ, H.N. Molecular Phylogenetics of New World primates (Platyrrhine) based on β 2-Microglobulin DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolutions**, v.12, n.1, p. 74-82, 1999.

CARMO, A.R. **Identificação das fontes alimentares de mosquitos transmissores da malária na Amazônia Brasileira pela técnica de bloodmeal ELISA**. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos Parasitários) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

CARTER, R.; MENDIS, K.N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15n. 4, p. 564–594, 2002.

CARVALHO, G. C.; MALAFRONTA, R.S.; MITI IZUMISAWA, C.; SOUZA TEIXEIRA, R.; NATAL, L.; MARRELLI, M.T. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, p. 146–152, 2014.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention
<http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. acesso: 12 de fevereiro de 2015.

CHATTOPADHYAY, R. Malaria Research. **Malaria Research Program**. 2003. Disponível em: <http://info.dom.uad.edu/geomed/debasish/malaria.html>. Acesso: 8 de janeiro de 2015.

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O.M.; GUTIÉRREZ, G.; SÁNCHEZ, R. Presencia de *Plasmodium brasilianum* (Apicomplexa, Plasmodidae) en el mono congo (*Alouatta palliata*, Primates: Cebidae) de Costa Rica. Importancia epidemiológica en relación con el ser humano. **Parasitología Latinoamericana**, v.61 n.3-4, p. 192-196, 2006.

CHANG, MEI-CHUN.; TENG, HWA-JEN.; CHEN, CHEN-FU.; CHEN, YUNG-CHEN.; JENG, CHIAN-REN. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. **Malaria Journal**, v. 7, p.105, 2008.

CHIN, W.; CONTACOS, P.G.; COATNEY, G.R.; KIMBALL, H.R. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. **Science**, v. 149, p. 865, 1965.

CICERON, L.; JAUREGUIBERRY, G.; GAY, F.; DANIS, M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 35–38, 1999.

COATNEY, G.R. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses or both? **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, p. 795-803, 1971.

COATNEY, G.R.; ELDER, H.A.; CONTACO S.P.G.; GETZ, M.E.; GREENLAND, R.; ROSSAN, R.N; et al. Transmission of the M strain of *Plasmodium cynomolgi* to man. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 673–678. 1961.

COATNEY, G.R.; COLLINS, W.E.; CONTACOS, P.G. **The primates malarias**. Mariland. 1971.

COLEMAN, R.E.; SATTABONGKOT, J.; PROMSTAPORM, S.; MANEECHAI, N.; TIPPAYACHAI, B.; KENGLUECHA, A; RACHAPAEW, N; ZOLLNER, G.; MILLER, R.S.; VAUGHAN, J.A.; THIMASARN, K.; KHUNTIRAT, B. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. **Malaria Journal**, v. 5, n. 121, p. 2006.

COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n. 4 p. 579-592, 2007.

COLLINS, W. E.; SKINNER, J. C.; PAPPAIOANOU, M.; BRODERSON, J. R.; MEHAFFEY, P. The sporogonic cycle of *Plasmodium reichenowi*. **Journal of Parasitology**, v. 72, p.292–298, 1986.

CONSOLI, R.A.G.B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro. 225pp. 1994.

COX, F.E.G. History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 15, n. 4, p. 595–612, 2002.

COX, F.E.G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, n. 3, v. 5, p. 1-9, 2010.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T.M.E.; LEE, K.; SHAMSUL, S.S.G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.165–171, 2008.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

CURADO, I.; DUARTE, A.M.R.C.; LAL, A.A.; OLIVEIRA, S.G.; KLOETZEL, J.K. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoites antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.92, p. 235-243, 1997.

CURRAN, A. M.; RABIN, S. I.; PRADA, P. A.; FURTON, K. G.. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. **Journal Chemical Ecology**. 31:1613–1625, 2005.

DEANE, L.M. Studies on simian malaria in Brazil. **Bulletin World Health Organization**, v. 31, p. 752-753, 1964.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P.; FERREIRA NETO, J.A. Studies transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization (WHO)**. v. 35, n. 5, p. 805-808, 1966.

DEANE, L.M.; FERREIRA NETO, J.A.; SITÔNIO, J.G. Novo hospedeiro natural de *Plasmodium simium* e do *Plasmodium brasilianum*: o mono *Brachytheles arachnoides*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 10, n. 5, p. 287-288. 1968.

DEANE, L.M.; CAUSEY, O.R.; DEANE, M.P. Chave ilustrada para a identificação de 35 espécies de anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil pelos caracteres da fêmea, com notas sobre os transmissores de Malária (Diptera, Culicidae). **The American Journal of Hygiene**, Monographic Series, nº 18, p. 71-102, 1946.

DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. **Revista Serviço Especial de Saúde Pública**, 1: 827-963, 1948.

DEANE, L.M. Plasmodia of monkey and malaria eradication in Brazil. **Latin American Microbiological Parasitology**, v. 11, p. 69-73. 1969.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P.; FERREIRA-NETO, J.A; ALMEIDA F.B. On the transmission of simian malaria in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13: p.311-319, 1971.

DEANE, L.M. Epidemiology of simian malaria in the American Continent. **PAHO Scientific Publications**, v. 317: p.144-163, 1976.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, suplemento II, p. 5-14, International Symposium on Malaria. 1986.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl 3, p. 1-20, 1992.

DEANE, L.M.; FERREIRA-NETO, J.; LIMA MM 1984. Vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of simian origin be expected. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p. 461-463,1984.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A. Malária de macacos no Estado de Goiás, Brasil: Encontro de guaribas *Alouatta caraya*, infetados com *Plasmodium brasilianum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.15, p. 107-111,1 1973.

DEANE, L.M. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.149-156, 1989.

DE MONBRISON, F.; RAYNAUDA, D.; LATOUR-FONDANAICHEA, C.S; TAALB, A.; FAVREB, S.; KAISERA, K.; et al. **Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for *pfmdr1*–*pfprt* single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum***. **Journal Microbiology Methods**. v.54, p. 391–401, 2003.

DI SANTI, S.M.; CARVALHO, M.E.; COSTA, M.J.; KIRCHGATTER, K.; PEREIRA, B.F.; TONIOLO, C.R.C.; LANGHI, J.R.D.; MARRET, A.C. Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 38, (Suppl. 1), 2005. In: XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005; Florianópolis; Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Abstract PR75. 2005.

DHAMA, K.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTHY, S.; TIWARI, R.; KAPOOR, S.; KUMAR, A.; THOMAS, P. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. **Pakistan Journal Biological Science**, v. 17 p.151 – 166, 2014

DHIMAN, S.; RABHA, B.; YADAV, K.; BARUAH, I.; VEE, V. Insecticide susceptibility and dengue vector status of wild *Stegomyia albopicta* in a strategically important area of Assam, India. **Parasites & Vectors**, v.7, p.295-299, 2014.

DODERER, C.; HESCHUNG, A.; GUNTZ, F.; CAZENAVE, J.P.; HANSMANN, Y.; SENEGAS, A.; PFAFF, A.W.; ABDELRAHMAN, T.; CANDOLFI, E. A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. **Malaria Journal**, v. 6, p. 19, 2007.

DRAPER, C.C.; SIRR, S.S. Serological investigations in retrospective diagnosis of malaria. **British Medical Journal**, v. 280, n. 6231, p. 1575-1576, 1980.

DUARTE, A. M. R. C. et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, p. 87-96, 2006.

DUARTE, A. M.; MALAFRONTA, R. DOS S.; CERUTTI, C. JR.; CURADO, I.; DE PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI, T.; SUMMA, M. E.; NEVES, D. DO V.; DE OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. DE C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179-185, 2008.

DUSFOUR, I.; ISSALY, J.; CARINCI, R.; GABORIT, P.; GIROD, R. Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius* Peryassú, *An. (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, *An. (Nys.) oswaldoi* Peryassú as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p. 429-432, 2012.

ESCALANTE, A.; BARRIO, E.; AYALA, F. Evolutionary origin of human and primate malarias: Evidence from the circumsporozoite protein gene. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p. 616–626, 1995.

ESCALANTE, A.A.; FREELAND, D.E.; COLLINS, W.E.; LAL, A.A. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. Proceedings of the National Academy of **Sciences**, v.95, p. 8124–8129, 1998.

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n.1, p. 11-21, 2000.

FARIAS FILHO, M.S. Caracterização geoambiental da Área de Proteção Ambiental da Região do Maracanã, São Luís, MA. In: Carvalho-Neta, R.N.F. (org.) **Área de Proteção Ambiental do Maracanã: subsídios ao manejo e à educação ambiental**. FAPEMA/Café & Lápis, São Luís, 15-39, 2010.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica** - Identificação, biologia e epidemiologia, Vol. 2, EDUSP, São Paulo, p.864 , 2002.

FERREIRA NETO, J.A.; DEANE, L.M.; CARNEIRO, E.W.B. Infecção natural de guaribas, *Alouatta belzebul belzebul* (L.,1766), pelo *Plasmodium brasilianum* GONDER e BERENGER-GOSSLER, 1908, no estado do Maranhão, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 169-174. 1970.

FIGUEIREDO, M.A.P.; DI SANTI, S.M.F; FIGUEIREDO, T.A.P; MACHADO, R.Z. Natural *Plasmodium* infection in neotropical primates in the island of São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.24, n. 2, p. 122-128, 2015.

FIGUEIREDO, M.A.P. **Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais na Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Brasil**. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

FLORES-MENDOZA, C.; CUNHA, R.A.; ROCHA, D.S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Identification of food sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) by precipitin test in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v,30, p. 129-134, 1996.

GALLAGHER, M.; WYSOCKI, C. J.; LEYDEN, J. J.; SPIELMAN, A. I. ;SUN, X.; PRETI, G. Analyses of volatile organic compounds from human skin. **British Journal of Dermatology**, v.159, p.780–791, 2008.

GALVÃO, A.L.; DAMASCENO, R.G.; MARQUES, A.P. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará. **Arquives of Hygiene**, v.12, p. 51-111, 1942.

GAMA, B.E.; SILVA-PIRES, F.E.S.; LOPES, M. N.K.R.; CARDOSO, M.A.B.; BRITTO, C.; TORRES, K.L.; LIMA, L.M.; SOUZA, J.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. **Experimental Parasitology**, v. 116, p.427-432, 2007.

GIGLIOLI, G. Malaria in British Guiana. Report Direct Medical Services (1938). Appendix II, p.118-39, 1940.

GIGLIOLI, G. Ecological change as a factor in renewed malaria transmission in a eradicated area. **Bulletin of World Health Organization**, v. 29, p. 131-145, 1963.

GUERRA, C.A; SNOW, R.W.; HAY, S.I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends in Parasitology**, v.22, p. 353-258, 2006.

GUIMARÃES, A.E.; GENTILE, C.; LOPES, C.M.; MELLO, R.P. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II. Habitat distribution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.17-28. 2000

GYSIN, J. Animal models: primates. In: SHERMAN, I. W (ed.). **Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington, DC: ASM Prss, p. 419–441. 1998.

HAN, E.T.; WATANABE, R.; SATTABONGKOT, J.; KHUNTIRAT, B.; SIRICHAISINTHOP, J.; IRIKO, H. ; JIN, L.; TAKEO, S. ; TSUBOI, T. Detection of Four Plasmodium Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.8, p. 2521–2528, 2007.

HANSEN, M.C.; POTAPOV, P. V.; MOORE, R.; HANCHER, M.; TURUBANOVA S. A.; TYUKAVINA, A.; THAU, D.; STEHMAN, S. V.; GOETZ, S.J.; LOVELAND, T.R.; KOMMAREDDY, A.; EGOROV, A.; CHINI, L.; JUSTICE, C.O.; TOWNSHEND, J. R. G. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. **Science** v. 342, p. 850-853, 2013.

HARBACH, R.E. (2004) The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, v.95, p.537–553. 2004.

HELLEMOND, J.J.; RUTTEN, M.; KOELEWIJN, R.; ZEEMAN, A.M.; VERWEIJ, J.J.; WISMANS, P.J.; et al. Human *Plasmodium knowlesi* infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.9, p.1478–1480, 2009.

HERRERA-VARELA, M.; ORJUELA, L.I.; PEÑALVER, C.; CONN, J.E.; QUIÑONES, ML. *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 955-959, 2014.

HUMAR, A.; OHRT, C.; HARRINGTON, M.A.; PILLAI, D.; KAIN, K.C. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, p.44-48, 1997.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ma>. Acesso : 20 de janeiro de 2012.

JELINEK, T.; SCHULTE, C.; BEHRENS, R.; GRBUSCH, M.P.; COULAUD, J.P.; BISOFFI, Z.; MATTEELLI, A.; CLERINX, J.; CORACHÁN, M.; PUENTE, S.; GJØRUP, I.; HARMS, G.; KOLLARITSCH, H.; KOTLOWSKI, A.; BJOÖRKMAN, A.; DELMONT, J.P.; KNOBLOCH, J.; NIELSEN, L.N; CUADROS, J.; HATZ, C.; BERAN, J.; SCHMID, M.L ; SCHULZE, M.;

LOPEZ-VELEZ, R.; FLEISCHER, K.; KAPAUN, A.; MCWHINNEY, P.; KERN, P.; ATOUGIA, J.; FRY, G.; DA CUNHA, S.; BOECKEN, G. Imported *Falciparum* Malaria in Europe: Sentinel Surveillance Data from the European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**.v.34, 2002.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP,C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2211-2213, 2004.

KAIN, K.C.; BROWN, A.E.; MIRABELLI, L.; WEBSTER, H.K. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. **Journal Infection Disease**, v.168, p.1323-1326, 1993.

KIMURA, M.; KANEKO, O.; LIU,Q.; ZHOU,M.; KAWAMOTO, F.; WATAYA, O.; OTANI,S.; YAMAGUCHI, Y.; TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, p. 91-95, 1997.

KISZEWSKI, A.; MELLINGER, A.; SPIELMAN, A.; MALANEY, P.; SACHS, S.E.;, SACHS, J. "A Global Index Representing the Stability of Malaria Transmission." **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n.5, p 486—498, 2004.

KIRCHGATTER, K.; TUBAK, R.M.;MALAFRONTA, R.S.; ALVES, I.C.; G.F. FERNANDES. *Anopheles (Kerteszia) Cruzii* (Diptera: Culicidae) In Peridomiciliary Area During Asymptomatic Malaria Transmission In The Atlantic Forest: Molecular Identification Of Blood-Meal Sources Indicates Humans As Primary Intermediate Hosts. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**,v. 56,n. 5, p.403-409, 2014.

KLEIN, T.A.; LIMA, J.B.; TADA, M.S.; MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondônia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.45: 463-470, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins using assembly of head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LECLERC, M. C.; HUGOT, J. P.; DURAND, P.; RENAUD, F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from New and Old World primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. **Parasitology**, v. 129, n. 6, p. 677–684, 2004.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH AR 3RD, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG. A newly revised classification of Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LOIOLA, C. C. P.; da SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 235- 244, 2002.

LOPES, J.; ARIAS, J. R., YOOD, D. C. Evidências preliminares de estratificação vertical de postura de ovos por alguns Culicidae (Diptera) em floresta no município de Manaus – Amazonas. **Acta Amazônica**, v.13, p. 431-439, 1983.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LUZ, S.L.B. Simian Malaria at Two Sites in the Brazilian Amazon - II. Vertical Distribution and Frequency of Anopheline Species Inside and Outside the Forest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n.6, p.687-694, 1996.

LUCHAVEZ, J.; ESPINO, F.; CURAMENG, P.; ESPINA, R.; BELL, D.; CHIODINI, P.; SINGH, B. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14,n. 5, p.811-813, 2008.

MACHADO, R. Z; McELWAIN, T.F.; SUAREZ, C.E.; HINES, S.A; PALMER, G.H. *Babesia bigemina*: isolation and characterization of merozoite rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 77, p. 315-325, 1993.

MAKLER, M.T.; HINRICHS, A.D. Measurement of the Lactate Dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.48, n. 2, p.205-210, 1993.

MCKENZIE FE, BOSSERT WH. Mixed-species *Plasmodium* infections of humans. **The Journal of parasitology**, v. 83, n.4, p. 593-600, 1997.

MCKENZIE, F.E.; JEFFERY, G.M.; COLLINS, W.E.; *Plasmodium malariae* infection boosts *Plasmodium falciparum* gametocyte production. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n.4, p. 411-441, 2002.

MAKLER, M. T.; PALMER, C. J.; AGER, A. L.. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 419-433, 1998.

MARQUES, A. C.; GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 91-108, 1994.

MARQUES, A. C.; PINHEIRO, E. A. Fluxos de casos de malária no Brasil em 1980. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.34, p. 01-31. 1982.

MCGREEVY, P.B.; DIETZE, R.; PRATA, A.; HEMBREE, S.C. Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon Basin of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 84, n. 4, p. 485-491, 1989.

MESQUITA, E.M.; MUNIZ, T.F.; SOUSA, A.L.S.; BRITO, C.X.L.; NUNES, S.C.M.; GRISOTTO, M.A.G. Levantamento epidemiológico da malária no estado do Maranhão, Brasil nos anos de 2007 a 2012. **Revista Ciência em Saúde**, v.15, n. 1, p. 11-18, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Relatório Anual do Serviço de Epidemiologia**. São Luís; 1997.

MINISTÉRIO SAUDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. 1º ed. 2005. Disponível: <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 12 de dezembro de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação – Maranhão**. Brasília, DF. p. 64, 2009. Disponível: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/002_ma_reatorio_de_situacao.pdf Acesso: 15 de julho de 2010.

MIYAGI, I. Studies on malaria vectors in Philippines especially on *Anopheles balabacensis* and monkey malaria in Palawan. **The Journal of Tropical Medicine**, v.2, p.163, 1973.

MOODY, A. Rapid Diagnostic Tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 2002

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P.A.; REEDAR, J.C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the 'basful' malaria parasites. **Trends Parasitology**. v. 23, p. 278-283, 2007.

MUNGAI, M.; TEGTMEIER, G.; CHAMBERLAND, M.; PARISE, M. Transfusion-Transmitted Malaria in the United States from 1963 through 1999. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p.1973-1978, 2001.

MURRAY, C.K.; BELL, D.; GASSER, R.A.; WONGSRICHANALAI, C. Rapid diagnostic testing for malaria. **Tropical Medicine and International Health**, v.8, p.876–883, 2003.

MYJAK, P.; NAHORSKI, W.; PIENIAZEK, N. J.; PIETKIEWICZ, H. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 215-218, 2002.

NG, O.T.; OOI, E.E.; LEE, C.C.; LEE, P.J.; NG, L.C.; PEI, S.W.; et al., Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 814–816, 2008.

OH, J.S.; KIM, J.S.; LEE, C.H. et al. Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 75–78, 2008.

OLANGA, E.A.; OKOMBO, L.; IRUNGU, L.W.; RMUKABANA, W. Parasites and vectors of malaria on Rusinga Island, Western Kenya. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 250, 2015.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v.9, p.115, 2010.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N.; REBÊLO, J.M.M. Espécies de *Anopheles* no município de Pinheiro (Maranhão), área endêmica de malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n.5, p. 443-450, 2000.

PARIDA, M.,; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P.K.; RAO, P.V.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, v.18, n.6, p. 407-21, 2008.

PATEL, J.C.; OBERSTALLER, J.; XAYAVONG, M.; NARAYANAN, J.; DEBARRY, J.D SRINIVASAMOORTHY, G.; VILLEGAS, L.; ESCALANTE, A.A.; SILVA, A.; PETERSON, D.S.; BARNWELL, J. W.; KISSINGER, J. C.; UDHAYAKUMAR, V.; LUCCHI, N.W. Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of *Plasmodium vivax*. **PLoS ONE**, v. 8, n.1, 2013.

PENN, D. J.; OBERZAUCHER, E.; GRAMMER, K.; FISCHER, G.; SOINI, H. A.; WIESLER, D.; NOVOTNY, M.V.; DIXON, S.J.; XU, Y.; BRERETON, R. G. Individual and gender fingerprints in human body odour. **Journal Royal Societ Interface**, v.4, p. 331–340, 2007.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Regional Office of the WHO, Brazil**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/>. Acesso: 5 de outubro de 2011.

PEREIRA, A.C.N. **Fauna de Mosquitos (Diptera: Culicidae) da Área de Proteção Ambiental do Maracanã, São Luís, Maranhão, Brasil; com notas sobre a ocorrência e distribuição das espécies encontradas no Estado**. 220f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, 2013.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W.E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H.N.; HORVATH, J.E.; MOREIRA, M.A.M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER, Y.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S.J.; PECON-SLATTERY, J. A Molecular phylogeny of living primates. **PLoS Genetics**, v.7, n.3, p.1-17, 2011.

PORTAL SAÚDE. **Exames positivos de malária, segundo UF Brasil, 1990 a 2008.** Disponível: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/exames_positivos_malaria.pdf
Acesso: 13 de julho de 2009.

PIMENTA, P.F.; ORFANO, A.S.; BAHIA, A.C.; DUARTE, A.P.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M.; MELO, F.F.; PESSOA, F.A.C.; OLIVEIRA, G.A.; CAMPOS, K.M.M.; VILLEGAS, L.M.; RODRIGUES, N.B.; NACIF-PIMENTA, R.; SIMÕES, R.C.; MONTEIRO, W.M.; AMINO, R.; TRAUB-CSEKO, Y.M.; LIMA, J.B.P.; BARBOSA, M.G.V.; LACERDA, M.V.G.; TADEI, W.P.; SECUNDINO, N. F. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.1, p.23-47, 2015.

PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; SANTI, S.M.D.; DE ARAUJO, M.P.; SUÁREZ-MUTIS, M.C.; SANTELLI, A.C.F.E.S.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n.5, p.618–633, 2014.

PREISER, P.R.; KHAN, S.; COSTA, F.T.; JARRA, W.; BELNOUE, E.; OGUN, S.; HOLDER, A.A.; VOZA, T.; LANDAU, I.; SNOUNOU, G.; RENIA, L. Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during *Plasmodium* life cycle. **Science** v. 295, p. 342–345, 2002.

QARI, S.H.; SHI, Y.A.; PIENIAZEK, N.J.; COLLINS, W.E.; LAL, A.A. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.6, p.157–165, 1996.

RACHOU, G.R. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia, Doenças Tropicais**, v. 10, p.145-81, 1958.

REBÊLO, J. M.; MORAES, J. L.; ALVES, G. A.; LEONARDO, F. S.; ROCHA, R. V.; MENDES, W. A.; COSTA, E.; CÂMARA, L. E.; SILVA, M. J.; PEREIRA, Y. N.; MENDONÇA, J. A. Distribution of species from genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in the State of Maranhão, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 12, p. 2959-2971, 2007.

ROCHA E SILVA, E.O.; RODRIGUES, D.C. Encontro do *Plasmodium* (*S*) *tropiduri* no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 163-170, 1974.

ROZEBOOM, E. L. Subspecific variations among neotropical anopheles mosquitoes, and their importance in the transmission of malaria. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 22, p. 235-55, 1942.

RUBIO, J.M.; BENITO, A.; BERZOSA, P.J.; ROCHE, J.; PUENTE, S.; SUBIRATS, M.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCIA, L.; ALVAR, J. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3260-3264, 1999.

RUBIO, J.M.; POST, R.J.; VAN LEEUWEN, W.M.; HENRY, M.C.; LINDERGARD, G.; HOMMEL, M. Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the seminested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 (Suppl 1), p.199-204, 2002.

RUBIO-PALIS, Y.; WIRTZ, R.A.; CURTIS, C.F. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. **Acta Tropica**, v.52, p.167-174, 1992.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; RAMOS, A.M.S.V.; DI SANTI, S.M.; BRANQUINHO, M.S.; KIRCHGATTER, K.; CORDEIRO, I.A.C.; MURTA, M.; SARAIVA, J.C.P.; OLIVEIRA, S.G.; BOCHETTI, M.G.G.; PIROLLA, J.A.; GUERZONI, D.; CHAMONE, D.A.F. Controle da malária transfusional em região endêmica e não-endêmica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 27-34. 1998.

SAM-YELLOWE, T. Rhoptry Organelles of the Apicomplexa: Their Role in Host Cell Invasion and Intracellular Survival. **Parasitology Today**, v. 12, n. 8, 1996.

SANTOS, L.C.; CUROTTO, S.M.R.; MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; COSTA-NASCIMENTO, M.J.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; KIRCHGATTER, K. Detection of *Plasmodium* sp. in capybara. **Veterinary Parasitology** v. 163, p. 148–15, 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v.44, n.1, 2013.

SEGURA, M.N.O.; CASTRO, F.C.. Atlas de Culicídeos na Amazônia Brasileira. **Instituto Evandro Chagas**, Belém. 2007.

SHORT, H.E.; GARNHAM, P.C.C. Pré-erythrocytic stage in mammalian malaria parasite. **Nature**. v. 161, n. 126. 1948.

SILVA, A.R.; FERNANDES, J.M.C.; RODRIGUES, T.A.; SANTOS, H.J.; CAVALHEIRO, N.N.M.; GUIMARÃES, M.C.; GONÇALVES, E.G.R. Controle da malária no Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p. 318-324, 2009.

SILVA, A.R.; TAUIL, P.L.; BASTOS JÚNIOR, J.L.; MATOS, W.B.; COSTA, E.A.P.; GONÇALVES, E.G.R. Aspectos da transmissão focal de malária na Ilha de São Luís, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39,n.3, p.250-254, 2006.

SINGH, B.; BOBOGARE, A.; COX-SINGH, J.; SNOUNOU, G, et al. A genus and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, p. 687–692, 1999.

SINGH, B.; KIM, S.L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S.S.; COX-SINGH, J.; et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v.363, p.1017–1024, 2004.

SINKA, M.E.; RUBIO-PALIS, Y.; MANGUIN, S.; PATIL, A.P.; TEMPERLEY, W.H.; GETHING, P.W.; VAN BOECKEL, T.; KABARIA, C.W.; HARBACH, R.E.; HAY, S.I. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasite & Vectors**, v.3, p.72, 2010.

SISTEMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA. SIVEP. **Ministério da Saúde**, 2005.

SIVEP-MALÁRIA. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica-Notificação de casos. Disponível: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datasus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>. Acesso: 15 de janeiro de 2015.

SIVEP-MALÁRIA. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica-Notificação de casos. Disponível: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datasus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>. Acesso: 2 de junho de 2015.

SMALLEGANGE, R.C.; VERHULST, N.O.; TAKKEN, W. Sweaty skin: an invitation to bite? **Trends in Parasitology**, v.27, p.143–148, 2011.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X.P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; ROSARIO, V.E.; THAITHONG, S.; BROWN, N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.61, p.315-320, 1993.

SOUTO, R.N.P. **Sazonalidade de Culicídeos (Diptera- Culicidae) e Tentativas de Isolamento de Arbovírus em Floresta e Savana do Estado do Amapá**. Dissertação de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará/ Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, 1994.

SOREN, D.; SOREN, N. A roman villa and a late roman infant cemetery: excavation at Poggio Gramignano Lugnano in Teverina. **L'erma Bretschneider**, Roma. 1999.

SUH, K.N.; KAIN, K.C.; KEYSTONE, J.S. Malaria. **Canadian Medical Association Journal**. v. 170, n. 11, p. 1693-1701, 2004.

TAKKEN, W.; KNOLS, B.G.J. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. **Annuals Reviews Entomology**, v. 44, p. 131–157, 1999.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93-102, 2009.

TAUIL, P.L. Perspectives of vector borne disease control in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.3. p. 275-277, 2006.

TAZI, L.; AYALA, F.J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 209–221, 2011.

TSUKAMOTO M, MIYATA A, MIYAGI I. Surveys on simian malaria parasites and their vector in Palawan Island, the Philippines. **Tropical Medicine**, v. 20, p.39-50, 1978.

TOWBIN, H.; STAEHLIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science USA Washington**, v.76, p.4350- 4354, 1979.

UENO HM, FORATTINI OP, KAKITANI I. Distribuição vertical e sazonal de *Anopheles (Kerteszia)* em Ilha Comprida, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.4, p.269-75, 2007

VARGA, I.D. Fronteiras da Urbanidade Sanitária: sobre o controle da malária. **Revista Saúde e Sociedade** v.16, n.1, p.28-44, 2007.

VERHULST, N.O.; SMALLEGANGE, R.C.; TAKKEN, W. Mosquitoes as potential bridge vectors of malaria parasites from non-human primates to humans. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n.197, p. 1-7, 2012.

VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 82, n. 1, p. 11-23, 2002.

VYTHILINGAM, I.; HII, J. Simian Malaria Parasites: special emphasis on *Plasmodium knowlesi* and their *Anopheles* vectors in Southeast Asia. In: **Sylvie Manguin, Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors**. Ed. INTECH, cap 15, p. 487-510, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Malaria. **WHO Fact Sheet**. n.94, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Situation in 2005**. 2005.

WHO. **Zoonoses: Veterinary public health (VPH) 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/vph/en/>. Acesso em 5 de jan. 2015a.

WHO. The use of malaria rapid diagnostic tests. **World Health Organization**. 2004.

WHO. Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing malaria RDTs: round 2. **WHO Library** , 2009.

WHO. **World Malaria Report 2014**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. xiii, 2014b.

XAVIER, M.M.P.; REBÊLO, J.M.M. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária, Maranhão, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33 p. 535-341. 1999.

YAMASAKI, T.; DUARTE, A.M.R.C.; CURADO, I.; SUMMA, M.E.L.; NEVES, D.V.D.A.; WUNDERLICH, G.; MALAFRONTTE, R.S. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from atlantic forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n. 6, p. 392-400, 2011.

ZHANG, X.; LOWE, S.B.; GOODING, J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Biosensor Bioelectronics**, v.15, n. 61, p. 491-499, 2014.

APÊNDICE A

Apêndice A. Resultados positivos obtidos nos diversos protocolos da PCR convencional para identificação de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* em amostras de sangue de primatas neotropicais. Foram utilizados quatro protocolos baseados no gene 18S. A tabela também apresenta origem das amostras, espécie de primatas neotropicais e as referências utilizadas.

Amostra	Espécie	Origem	18 S			
			Rubio et al. (1999)	Snounou et al. (1993)	Kimura et al. (1997)	Santos et al. (2009)+Singh et al. (1999)
65	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg*	Pos**	Neg	Neg
66	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
79	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Neg	Neg
80	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Neg	Neg
82	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Neg	Neg
83	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
84	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
85	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
86	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
87	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
88	<i>Sapajus apella</i>	VL	Pos	Neg	Pos	Neg
89	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Pos	Neg
90	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Pos	Neg
91	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
92	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Pos	Neg
94	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Pos	Neg
107	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
108	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
109	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
110	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg

Continua...

Continuação			18 S			
Amostra	Espécie	Origem	Rubio et al. (1999)	Snounou et al. (1993)	Kimura et al. (1997)	Santos et al. (2009)+Singh et al. (1999)
112	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Neg	Pos	Pos	Neg
113	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
115	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
116	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
120	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Neg	Pos
122	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Neg	Pos
123	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
124	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
127	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Neg	Pos
128	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
129	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
130	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Pos	Neg	Neg
131	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
135	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
136	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
137	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
138	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
139	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
140	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
141	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
142	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Pos
143	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
144	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
145	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
146	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Pos
147	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
148	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg

Continua...

Continuação			18 S			
Amostra	Espécie	Origem	Rubio et al. (1999)	Snounou et al. (1993)	Kimura et al. (1997)	Santos et al. (2009)+Singh et al. (1999)
149	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
150	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
151	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
152	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
153	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
154	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
155	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Pos	Neg	Neg
156	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
157	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Neg	Neg
158	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
159	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
160	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
161	<i>Saguinus midas niger</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
162	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
163	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
164	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
165	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
166	<i>Saimiri sciureus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
167	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
168	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
169	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Pos	Neg	Neg	Neg
177	<i>Chiropotes satanas</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
178	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Neg	Neg
179	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
180	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
193	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
194	<i>Sapajus apella</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg

Continua...

Continuação			18 S			
Amostra	Espécie	Origem	Rubio et al. (1999)	Snounou et al. (1993)	Kimura et al. (1997)	Santos et al. (2009)+Singh et al. (1999)
200	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
201	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
202	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
204	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg
205	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS	Neg	Neg	Pos	Neg

* Neg – amostra negativa

** Pos – amostra positiva

APÊNDICE B

Apêndice B. Identidade verificada pelo programa BLAST em amostras de DNA de primatas neotropicais do CETAS-São Luís.

Amostra	Espécie de primata neotropical	Localização	% de identidade pelo BLAST (gene 18S)
136	<i>Sapajus</i> sp.		<i>Plasmodium malariae</i> clone PW1532 (GU950655.1) – 100% <i>Plasmodium malariae</i> isolado Pm18 (KF906517.1)- 100% <i>Plasmodium malariae</i> isolado Pm17 (KF906516.1) -100%
137		CETAS-São Luís	<i>Plasmodium</i> sp. ZOOBH1 (EF090276.2) – 97%
145			<i>Plasmodium falciparum</i> 18S rRNA parasita assexua (M19173.1) – 99%
156	<i>Sapajus</i> sp.		<i>Plasmodium malariae</i> isolate: Oumu (AB489196.1) -100% <i>Plasmodium malariae</i> isolado: Takaboh (AB489195.1) – 100%