

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

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO, SOROLÓGICO E  
MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS  
NEOTROPICAIS NA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO  
MARANHÃO, BRASIL**

**Mayra Araguaia Pereira Figueiredo**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO, SOROLÓGICO E  
MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS  
NEOTROPICAIS NA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO  
MARANHÃO, BRASIL**

Mayra Araguaia Pereira Figueiredo

**Orientadora:** Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

Jaboticabal – São Paulo

Fevereiro de 2012

Figueiredo, Mayra Araguaia Pereira  
F475d Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de *Plasmodium* spp.  
em primatas neotropicais na Ilha de São Luís, estado do Maranhão,  
Brasil / Mayra Araguaia Pereira Figueiredo. – Jaboticabal, 2012  
xiii, 63 f. : Il, ; 28cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientadora: : Rosangela Zacarias Machado  
Banca examinadora Solange Maria Gennari; Karin Werther  
Bibliografia

1. Malária. 2. *Plasmodium* spp. 3. Primatas. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.936:636.97

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço  
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: mayraaraguaia@hotmail.com



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

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO, SOROLÓGICO E MOLECULAR DE  
*Plasmodium* spp EM PRIMATAS NEOTROPICAIS NA ILHA DE  
SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

**AUTORA:** MAYRA ARAGUAIA PEREIRA FIGUEIREDO

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. SILVIA MARIA FÁTIMA DI SANTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE 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

  
Profa. Dra. SOLANGE MARIA GENNARI  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal / Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia - USP / São Paulo/SP

  
Profa. Dra. KARIN WERTHER  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de  
Jaboticabal

Data da realização: 09 de fevereiro de 2012.

## **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 em Patologia Animal, na FCAV-Unesp, Jaboticabal- SP, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, sendo bolsista de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP, Processo 10/01598-9).

“Perder tempo em aprender coisas que não interessam, priva-nos  
de descobrir coisas interessantes.”

Carlos Drummond de Andrade

**Aos meus pais, Valter Cezar e  
Tereza, pelo amor e confiança  
que sempre depositam em mim.**

**À minha irmã, pelo carinho e pela  
ajuda no desenvolvimento desse trabalho,  
que foi fundamental para que eu pudesse cumprir  
mais uma etapa da minha vida.**

**Ao meu marido, Wilson, pelos  
incentivos, pela compreensão,  
respeito, e por todo o amor  
que tem me dedicado.**

**Ao meu filho, Olivier Nolan, em especial, o  
qual eu dedico meu imenso amor e  
dedicação.**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo amor, carinho e pela ajuda nos momentos de necessidade.

Ao meu marido, Wilson pela amizade, amor e por ser sempre um porto seguro onde posso me abrigar.

Ao meu filho preciso, Olivier Nolan, que com muitas felicidades contribuiu para que o final dessa jornada fosse iluminado e cheio de alegrias.

À minha irmã, Thaysa, profissional dedicada e eficiente que contribuiu para a realização dos trabalhos de campo.

À minha mãe, por ter se disposto a largar seus compromissos e vir para Jaboticabal cuidar do meu bem mais precioso, meu filho, para que eu pudesse ficar tranquila para escrever a dissertação.

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

À profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi pelos ensinamentos, co-orientação, dedicação e respeito. E por ter sido fundamental para o progresso dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado e pelo auxílio à pesquisa, viabilizando a realização desse trabalho.

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

Ao amigo Roberto Veloso, que sempre contribui como pode para que eu consiga realizar meus trabalhos.

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

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

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Márcia, Carla, Vivan e Marquinhos, por compartilhar seus conhecimentos, pela colaboração e claro, pelas boas risadas.

À Rafa pelas boas conversas, colaboração e amizade.

Às amigas do Laboratório de Malária da SUCEN, Gisele, Juliana, Angélica, Lia e a Morgana.

A todos,  
MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Malária .....	4
2.2 Malária no estado do Maranhão .....	5
2.3 Transmissão e ciclo do <i>Plasmodium</i> .....	7
2.4 Malária em primatas não humanos.....	10
2.5 Detecção direta por meio de gota espessa e esfregaço sanguíneo .....	14
2.6 Detecção sorológica .....	14
2.7 Detecção molecular.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral .....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 Espécies amostradas e áreas de estudo .....	18
4.1.1 Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) .....	18
4.1.2 Reserva Particular Sitio Aguahy .....	19
4.2 Colheita das amostras.....	23
4.2.1 Imobilização física e química .....	23
4.2.2 Obtenção das amostras de sangue e soro .....	24
4.2.3 Confecção de lâminas de esfregaços sanguíneos e de gota espessa ...	25
4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	26
4.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> .....	26
4.3.2 Obtenção de antígeno de <i>P. falciparum</i> para confecção de lâminas para imunofluorescência .....	27

4.3.3 Reação de Imunofluorescência indireta para <i>Plasmodium</i> .....	27
4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	28
4.4.1 Extração de DNA de sangue total .....	28
4.4.2 Reação de amplificação .....	28
4.4.2.1 Semi-nested multiplex PCR (Rubio et al. 1999) .....	29
4.4.2.2 Nested PCR (KIMURA et al. 1997) .....	30
4.4.2.3 Nested PCR (SNOUNOU et al. 1993) .....	31
4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	32
4.6. Sequenciamento.....	33
4.6.1. Extração dos amplicómeros do gel de agarose .....	33
4.6.2 Clonagem de fragmentos de DNA positivos na PCR em pGEM-T Easy® para sequenciamento .....	33
4.6.3. Reação de Sequenciamento .....	34
4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	36
4.7.1. Análise dos produtos sequenciados .....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Identificação morfológica de plasmódios (gota espessa/esfregaço sanguíneo .....	37
5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	38
5.3 Identificação molecular de <i>Plasmodium</i> spp.....	38
5.4 Correlação dos resultados morfológicos (esfregaço sanguíneo/gota espessa), da sorologia e da PCR .....	41
5.5 Resultado do sequenciamento.....	43
6. DISCUSSÃO .....	44
7. CONCLUSÃO .....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.	Área de transmissão da malária no Estado do Maranhão, usando a categorização de risco de transmissão, no ano de 1999. Fonte: MS/FUNASA/COORMA.....	6
Figura 2.	Ciclo de vida sintetizado das espécies de plasmódios no homem e no mosquito vetor. Fonte: MUTIS et al. ( 2005).....	9
Figura 3.	Vista aérea das instalações do CETAS de São Luis-MA. Fonte: Digital Globe.....	19
Figura 4.	Mapa da Ilha de São Luís, evidenciando a Reserva Particular Sitio Aguahy (linha vermelha) e o local de soltura dos animais (seta). Fonte Digital Globe.....	21
Figura 5.	Gaiola Tomahawk sendo removida após captura de <i>Cebus</i> sp. na Reserva Particular Sitio Aguahy, São José de Ribamar, Maranhão, no mês de março de 2011.....	22
Figura 6.	Gaiola de prensa usada para contenção física dos primatas antes de serem submetidos à anestesia.....	23
Figura 7.	Colheita de sangue digital de <i>Cebus</i> sp. e confecção de lâmina: A – colheita de sangue digital; B – preparo de lâmina de gota espessa.....	25
Figura 8.	Identificação de formas sugestivas de <i>Plasmodium</i> spp. em lâminas de esfregaço sanguíneo: A – trofozoítas em forma de anel, de amostra de <i>Cebus</i> sp. (número 01); B – forma imatura de trofozoíta de amostra de <i>Cebus</i> sp. (número 18). Corado pelo corante Giemsa, objetiva 100x.....	37

- Figura 9. Controles da reação de imunofluorescência indireta com soros humanos: A – controle negativo; B – controle positivo..... 38
- Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gênero *Plasmodium*, protocolo padronizado por Rubio et al. (1999), onde 231 bp é o controle endógeno da reação e 783-821 bp é um fragmento que indica positividade para plasmódio, o tamanho varia dependendo da espécie de *Plasmodium* spp.. Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Coluna 1: controle positivo de cultura de *P. falciparum*; Coluna 2: controle negativo; Colunas 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14 e 15: amostras positivas de *Cebus* sp.; Colunas 3, 5, 8, 12: amostras de *Cebus* sp. que não amplificaram..... 39
- Figura 11. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al. 1999) para as espécies *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum* do Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Coluna 1: controle positivo de *P. malariae* (269 pb); Coluna 2: controle negativo; Colunas 3 até 10: amostras positivas de *Cebus* sp. (Reserva Particular Sítio Aguahy); Colunas 11 até 15: amostras positivas de *Cebus* sp. (CETAS-São Luís)..... 40
- Figura 12. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR dos clones (KIMURA et al. 1997) para o gênero *Plasmodium*. As colunas 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14 15 e 16 mostram a amplificação dos clones 33.3; 34.3; 35.2; 36.2; 37.3; 38.3; 39.3; 40.1; 40.2; 40.3, respectivamente. Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Colunas 1, 2, 5, 6, 11 e 13: clones que não amplificaram..... 41

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Dosagens anestésicas da associação de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam aplicadas via intramuscular para a imobilização química de diferentes espécies de primatas neotropicais.....	24
Tabela 2.	Resultados dos diagnósticos morfológicos (gota espessa/esfregaço sanguíneo), da sorologia e da PCR das 18 amostras positivas, com origem e sexo.....	42

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO, SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EM PRIMATAS NEOTROPICAIS NA ILHA DE SÃO LUÍS, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

**RESUMO** – Os Estados que compõem a Amazônia Legal respondem por 99% dos casos de malária humana registrados no Brasil. O Estado do Maranhão, atualmente, é responsável por 1% dos casos dessa região. Acredita-se que, na Região Amazônica ocorra a transmissão de malária de primatas para humanos, devido a relatos atuais de resultados soroepidemiológicos de humanos e primatas. O presente estudo objetivou realizar o diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. Para tal, foram utilizadas como técnicas de diagnóstico: a microscopia de luz, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a imunofluorescência indireta (RIFI). No período de junho de 2009 a abril de 2010, foram amostrados 70 primatas, sendo 50 provenientes do Centro de Triagem Animais Silvestres (CETAS), localizado no município de São Luís, e 20 de vida livre, capturados em reserva particular localizada no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão. Foram avaliadas pela microscopia de luz 140 lâminas (duas de cada animal), das quais cinco (7,1%) foram positivas. Pela RIFI não se detectou anticorpos anti-*Plasmodium* spp. Pela PCR, dos 70 animais amostrados, foi possível observar produtos amplificados para *Plasmodium* spp. em 13 amostras, das quais oito (61,54%) eram de animais de vida livre e cinco (38,46%) de CETAS. Pelo pequeno tamanho dos fragmentos dos produtos amplificados, foi necessário cloná-los em vetor pGEM-T Easy para sequenciamento, no entanto, não foram obtidos resultados confirmatórios.

**Palavras-chave:** Ciclo silvestre, malária, primatas, *Plasmodium* spp.

**MORPHOLOGICAL DIAGNOSIS, SEROLOGICAL AND MOLECULAR OF  
*Plasmodium* spp. IN NEOTROPICAL PRIMATES IN THE ISLAND OF SÃO LUIS,  
STATE OF MARANHÃO, BRAZIL**

**SUMMARY** – The states that comprise the Amazon region are incriminated for 99% of registered cases of human malaria in Brazil. Currently, the state of Maranhão is responsible for 1% of cases in Amazonic region. According to recent seroepidemiological studies, the transmission of malaria from primates to humans occurs in Amazon region. Our study aimed to detect *Plasmodium* spp. in neotropical primate from island of São Luis, Maranhão State, Brazil, using morphological (light microscopy), molecular (Polymerase Chain Reaction [PCR]) and serological (Indirect immunofluorescence Assay [IFA]) techniques. Between June/2009 and April/2010, we sampled 70 primates, 50 from the Wildlife Screening Center (CETA), located in the city of São Luís, and 20 captured in a private reserve located in São José de Ribamar, state of Maranhão. Based on blood smear examinations, five (7.1%) monkeys were positive to *Plasmodium* spp. All animals showed seronegative to *Plasmodium* spp. by IFA. *Plasmodium* spp.-amplicons were detected in 13 animals; eight out of positive monkeys (61.54%) were free-ranging animals and five (38.46%) maintained in captivity in CETAS. Regarding the small size of amplified fragments, we cloned the amplicons into pGEM-T Easy vector aiming at obtaining a higher sequencing quality; however, we did not reached satisfactory results.

**Keywords:** sylvatic cycle, primates, malaria, *Plasmodium* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A malária, também conhecida como paludismo, é uma doença que acomete o ser humano, com alto índice de mortalidade, cerca de 1,5 a 3 milhões de mortes por ano. Ocorre em países tropicais e subtropicais, principalmente do Continente Africano (GUERRANT & BLACKWOOD, 1999). A malária é uma doença causada por protozoários do Filo Apicomplexa, pertencentes ao gênero *Plasmodium*. São conhecidas mais de 100 espécies de plasmódios que podem ter como hospedeiros, répteis, aves e mamíferos, entre eles humanos e primatas não humanos. Classicamente, quatro espécies são infectantes para o ser humano, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. malariae*. Uma quinta espécie, *P. knowlesi*, que originalmente infecta chimpanzés, está sendo descrita infectando humanos (JONGWUTWES et al. 2004; ONG et al. 2009).

O Brasil registra cerca de 40% dos casos de malária das Américas, os Estados que compõem a Amazônia Legal: Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins, respondem por 99% dos casos (WHO, 2005). No Maranhão, a malária ainda é a endemia de maior impacto, devido aos aspectos fitogeográficos de Pré-Amazônia e sua grande proporção de população rural sobre a urbana. Atualmente, o Estado é responsável por aproximadamente 1% dos casos da doença na Amazônia Legal.

A transmissão do plasmódio é realizada pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, infectado com o hemoparasita. A doença é caracterizada por febre alta acompanhada de suores, calafrios e cefaleia, que aparecem ciclicamente, dependendo da espécie de plasmódio. De forma semelhante ocorre nos primatas, no entanto, apesar de serem utilizados como modelos para estudo da malária humana, há poucos trabalhos que relatam a dinâmica da doença, sintomatologia, patologia e tratamento em primatas. Sabe-se que, em infecção experimental, a doença é aguda e, na infecção natural, é crônica (OZWARA et al. 2003; CERUTTI JUNIOR, 2007).

No Maranhão, as pesquisas de malária em primatas são da década de 70, realizadas por Ferreira Neto et al. (1970), que examinaram 24 primatas, sendo: 19

*Alouatta belzebul belzebul*, 01 *Cebus apella libidinosus*, 01 *Chiropotes satanas satanas*, 01 *Saimiri sciureus* e 02 *Saguinus tamarin*, observando no sangue de sete *A. belzebul belzebul* a presença de plasmódios, os quais foram identificados como sendo *P. brasilianum* e, em quatro deles, observaram impregnação de hemozoína no baço. A espécie de anofelino, em maior número, nas áreas de maior prevalência de primatas parasitados foi *Chagasia bonnae* (Subfamília Anophelinae, Tribo Anophelini).

Estudos mais recentes sobre a fauna anofelina no Maranhão, usando-se iscas humanas, descrevem a diversidade de espécies em todo o Estado, com destaque para o *A. darlingi*, no interior, e para o *A. aquasalis*, no litoral (REBÊLO et al. 1997; OLIVEIRA-PEREIRA & REBÊLO, 2000; RIBEIRO et al. 2005). No entanto, no Estado, não há descrição de capturas em ambiente silvestre e nem a identificação da relação dos vetores com outros hospedeiros, como os primatas.

A viabilidade da ocorrência de transmissão entre hospedeiros símios e humanos e competência e capacidade vetorial vem sendo discutida, devido aos relatos de infecção natural de humanos com plasmódio de primatas ou com a presença de anticorpos contra esses hemoparasitas (ARRUDA et al. 1989). Para levantar mais dúvidas, as pesquisas filogenéticas vêm demonstrando, devido às analogias morfológicas e moleculares entre o *P. malariae* e o *P. brasilianum*, que este último possa ser uma cepa de *P. malariae* adaptada aos primatas neotropicais (ARRUDA et al. 1989). Dessa forma, é cada vez maior a importância dos primatas na cadeia epidemiológica da malária humana.

Pergunta-se, então, será que, na região Amazônica, humanos diagnosticados com *P. malariae*, na verdade, podem estar parasitados por *P. brasilianum*/*P. malariae*? Ou ainda, que as características de baixa parasitemia dos plasmódios em primatas neotropicais podem estar mascarando os resultados das pesquisas nesses hospedeiros? São dúvidas que contribuem para instigar as investigações sobre a cadeia epidemiológica da malária símia-humana.

Dessa forma, com o intuito de contribuir com informações sobre a malária em primatas, este trabalho objetivou realizar o diagnóstico morfológico, sorológico e

molecular de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Malária

A malária ainda é considerada uma das principais doenças infecciosas que aflige a humanidade, mantendo-se presente nos países tropicais. As espécies de plasmódios mais prevalentes que infectam o homem são *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo *P. falciparum* responsável pelo maior número de casos no Continente Africano e *P. vivax* no Oriente Médio, Ásia Central e Américas Central e Sul (MUELLER et al. 2007).

No Continente Americano, o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária, aproximadamente 40%, além de uma situação epidemiológica complexa, em que coexistem regiões sem transmissão, de baixa transmissão e de alta transmissão de malária (SAÉZ-ALQUÉZAR et al. 1998).

Até o final do século XIX, a malária esteve presente em todo o território nacional, com exceção de algumas áreas da Região Sul (BARCELAR, 1963). Após, o país adotou estratégias estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde para a erradicação da malária. Essa doença foi eliminada em diversos Estados e passou a ter seus menores índices no início da década de 1970, (LOIOLA et al. 2002). Hoje a concentração dos casos está na Região Norte, nos Estados que compõem a Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins), respondendo por 99% dos casos (WHO, 2005).

Na região Amazônica, ocorreu ascensão da incidência da malária na década de 70, em virtude do aumento populacional repentino, por causa dos incentivos governamentais para a colonização e a conseqüente mudança na fitogeografia da região. Criou-se então, uma nova conjuntura epidemiológica, proporcionada pela construção de rodovias, usinas hidrelétricas, pela pecuária e pelo garimpo (MCGREEVY et al. 1989; MARQUES & GUTIERREZ, 1994). Essas mudanças na geografia modificaram o comportamento dos vetores da malária e suas fontes de alimentação natural, fazendo com que se deslocassem para regiões peridomiciliares e urbanas (DEANE, 1986).

Na região Extra-Amazônica, o maior número de casos registrados de malária são decorrentes da 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. Esses Estados receberam maior proporção de casos “exportados” da Região Norte do país (MARQUES & PINHEIRO, 1982; SINAN NET, 2009).

## **2.2 Malária no estado do Maranhão**

O estado do Maranhão, segundo classificação do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) pertence à Região Nordeste e faz parte da Amazônia Legal, sendo uma área de transição do cerrado para a Floresta Amazônica.

A malária no Maranhão ainda é a endemia de maior impacto, em virtude dos aspectos fitogeográficos de Pré-Amazônia, da sua grande proporção de população rural sobre a urbana e ao legado histórico de ter fornecido maior número de mão-de-obra para o garimpo na década de 70. Foram observados em 1987, um elevado número de casos, ocasionados pelo retorno dos maranhenses aos seus municípios de origem, em consequência da queda internacional no preço do ouro (VARGA, 2007).

Em 1999, o Ministério da Saúde, preocupado com o aumento da casuística de malária na Região Amazônica, iniciou as articulações para a elaboração de um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM). Em 2000, o Maranhão discutiu a sua entrada no PIACM, ano que teve o maior número de registro de casos na história da endemia, no Estado, com 78.818 casos (VARGA, 2007). A casuística da doença está concentrada na Amazônia Maranhense, Ilha de São Luís e Baixada Ocidental, no entanto, podem ser registrados casos espalhados por todo o Estado. Acomete populações de áreas rurais, semirurais e áreas antropomofizadas por desmatamento, garimpo e implantação de pasto. Essas modificações no ambiente proporcionaram a perpetuação da malária nas áreas endêmicas e tornaram vulneráveis áreas livres da doença (OLIVEIRA-PEREIRA & REBÊLO, 2000).

Atualmente, o Maranhão é responsável por aproximadamente 1% dos casos de malária da Amazônia Legal. O Estado está classificado, segundo critérios do Ministério da Saúde, como área de pequena expansão de redes de diagnóstico e tratamento, com falta de controle vetorial e com pequena participação dos governos municipais e estaduais em investimentos nas atividades de controle. O Estado está subdividido em diferentes áreas de classificação quanto à transmissão da malária (Figura 1): de alto risco, a região de Pré-Amazônia Maranhense; médio risco, áreas próximas à Pré-Amazônia; baixo risco, a maior parte do Estado, representado pela área de cerrado; e sem risco, onde as áreas mais expressivas são as da Região Centro-Sul, dominada pela soja (área desmatada) e Lençóis Maranhenses (sem mata densa) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

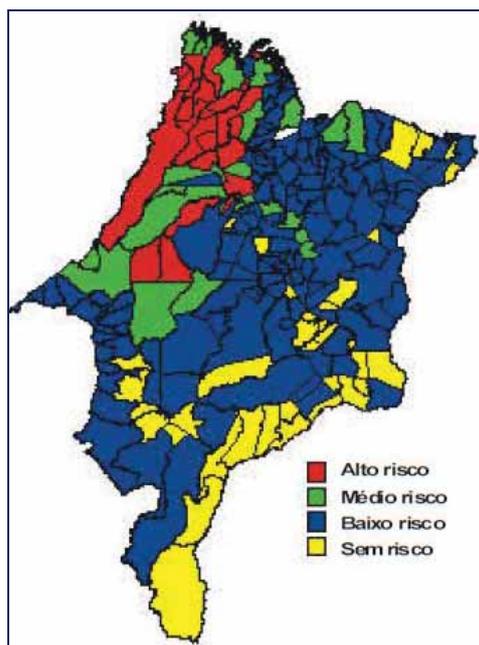


Figura 1. Área de transmissão da malária no Estado do Maranhão, usando a categorização de risco de transmissão, no ano de 1999. Fonte: MS/FUNASA/COORMA.

Em 2008, os municípios que mais registraram casos de malária no Estado do Maranhão foram: Alcântara, Presidente Sarney, Centro Novo do Maranhão, Santa

Helena, Cândido Mendes, São Luís, Boa Vista do Gurupi, Senador La Rocque, Governador Nunes Freire e Bacabal, com proporção de 16,5% dos exames positivos para *P. falciparum* e incidência parasitária anual (IPA) de aproximadamente 0,8 casos/1.000 habitantes.

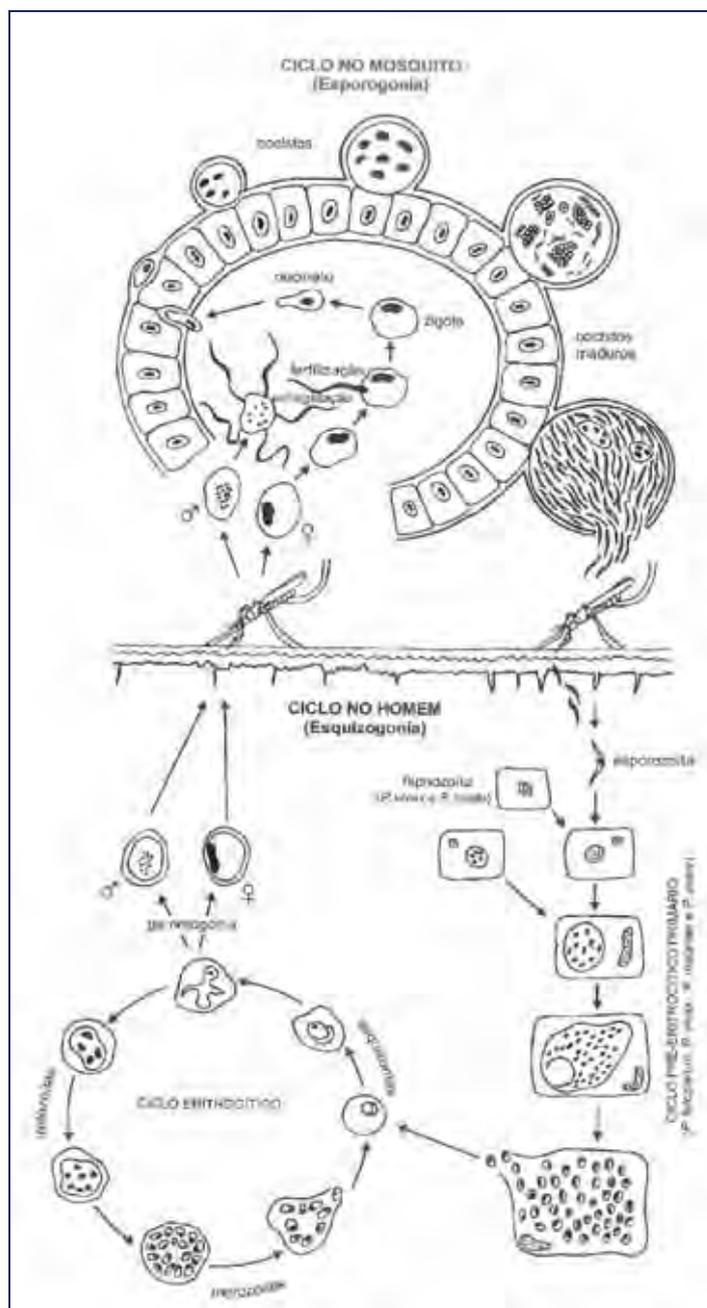
### **2.3 Transmissão e ciclo do *Plasmodium***

Os vetores dos plasmódios são dípteros culicídeos, com destaque para as espécies *Anopheles gambiae* (África) e *Anopheles darlingi* (América). *A. darlingi* tem importância epidemiológica pela capacidade de transmitir diversas espécies de plasmódio, pela sua abundância e ampla distribuição nas Américas Central e Sul e alto grau de antropofilia e endofagia.

O ciclo sexuado se inicia quando a fêmea do mosquito pica um hospedeiro vertebrado infectado para se alimentar e ingere os gametócitos. No estômago do mosquito, os gametócitos rompem as hemácias e ficam livres. A junção dos núcleos masculinos e femininos forma o zigoto, que se movimenta, sendo chamado de oocineto, e penetra no epitélio da parede do estômago do mosquito, transformando-se em oocisto. Este sofre várias esporogonias, e quando estão maduros rompem-se liberando os esporozoítas na hemocele, que se movimentam atingindo praticamente todo o corpo do mosquito e principalmente as glândulas salivares, de onde são liberados durante o repasto sanguíneo (MUTIS et al. 2005).

Os hospedeiros humanos são infectados quando picados por fêmeas do mosquito contendo esporozoítas nas glândulas salivares. Estas inoculam os esporozoítas que caem na corrente sanguínea e migram para o fígado, invadem os hepatócitos, iniciam e sofrem várias esquizogonias, evoluindo para esquizontes (COWMAN & CRABB, 2006). Ao final do ciclo tecidual ou exoeritrocítico, os esquizontes rompem os hepatócitos, liberando milhares de merozoítas na corrente sanguínea, que invadem os eritrócitos jovens, maduros ou velhos, dependendo da espécie, iniciando-se o ciclo sanguíneo ou eritrocítico.

Na fase eritrocítica, os merozoítas sofrem esquizogonia, originando trofozoítas e esquizontes, que rompem os eritrócitos 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 2 ilustra o ciclo de vida do *Plasmodium*.



**Figura 2.** Ciclo de vida sintetizado das espécies de plasmódios no homem e no mosquito vetor. Fonte: MUTIS et al. (2005).

## 2.4 Malária em primatas não humanos

Existem mais de 150 espécies conhecidas de *Plasmodium*, acometendo répteis, aves e mamíferos. Dessas, 29 parasitam os primatas (humanos e não humanos); onze infectam primatas do Velho Mundo (Família Cercopithecidae, na África e Ásia); duas infectam orangotangos (*Pongo pygmaeus*, na Indonésia e Malásia); três espécies acometem chimpanzés e gorilas (*Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla*, na África Central e no Oeste); quatro infectam gibões (*Hylobates lar* e *Hylobates moloch* no Sudeste da Ásia); duas infectam primatas do Novo Mundo (Famílias Cebidae, Atelidae e Callithrichidae na América do Sul); e sete espécies infectam lêmures (*Lemur* spp., em Madagascar) (COATNEY et al. 1971; LECLERC et al. 2004).

A origem do *Plasmodium* em primatas é bastante discutida, havendo duas hipóteses mais aceitas, uma considera que provavelmente o *Plasmodium* surgiu em primatas do Sudeste da Ásia, reforçada pela presença atual de uma maior variedade de espécies de plasmódios em primatas. E que 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).

Para as Américas, a teoria mais aceita afirma que o gênero *Plasmodium* é recente no Continente Americano, tendo chegado com os primeiros colonizadores europeus. Dessa forma, o parasita teria feito o caminho inverso ao realizado no Velho Mundo (que passou de primatas não humanos para humano), no Continente Americano o patógeno passou de humanos para os primatas do Novo Mundo (CARTER e MENDIS, 2002). Desde o século XIX, há referências sobre a observação de plasmódios em primatas na América.

Em 1908, em Hamburgo, Alemanha, foi identificado por Gonder & Berenberg-Gossler, *Plasmodium brasilianum* parasitando o primata *Cacajao calvus*, importado da região da Amazônia Brasileira. Em observações posteriores, perceberam a semelhança

com o *P. malariae*, que em infecções naturais a parasitemia é muito baixa e muitas vezes inaparente, e os ciclos das febres são quartãs. (COATNEY et al. 1971).

Na América do Sul, apenas duas espécies de *Plasmodium* foram descritas infectando primatas, *P. brasilianum* e *P. simium*. O *P. brasilianum* tem uma vasta distribuição geográfica, sendo encontrado na Floresta Amazônica desde o Panamá até o Brasil. Trabalhos como os de Clark, Taliaferro e Porter demonstraram que, no Panamá, era relativamente comum encontrar primatas infectados com *P. brasilianum* (COATNEY et al. 1971). Também foi descrito infectando primatas da Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Em uma abrangente revisão sobre malária símia no Brasil, foi demonstrado que *P. brasilianum* infecta todos os gêneros das famílias Cebidae e Atelidae, exceto *Aotus* (Cebidae) e, raramente, exemplares de *Saguinus midas niger* (Callithricidae) (DEANE, 1992).

*Plasmodium simium* foi encontrado somente em *Alouatta fusca clamitans* (bugio ruivo) e *Brachyteles arachnoides* (muriqui) de áreas de Mata Atlântica das regiões do Sul e Sudeste do Brasil, descoberto por Fonseca em 1951, mas erroneamente classificado de *P. brasilianum*. Passados dez anos, Deane solicitou a cepa e os esfregaços sanguíneos para reexaminar e teve a surpresa de observar que era uma nova espécie de plasmódio, o qual batizou de *P. simium* (FONSECA, 1951; DEANE, 1992). Porém a sua distribuição geográfica pode ser ainda mais ampla, levando-se em consideração que essas descrições foram baseadas apenas em análises de sangue periférico, por microscopia ótica, método de sensibilidade limitada (DUARTE et al. 2008). O *P. simium*, atualmente, encontra-se restrito às latitudes 20° e 30° sul, em uma área limitada ao norte pelo Espírito Santo e, ao sul, pelo Rio Grande do Sul (DEANE et al. 1969; DEANE, 1992).

O ciclo dos plasmódios em primatas é semelhante ao dos parasitas que infectam os humanos. No entanto, apesar de serem utilizados como modelos para estudo da malária humana, há poucos trabalhos relatando a dinâmica da doença (vetores e hospedeiros naturais), sintomatologia, patologia e tratamento nos primatas. Sabe-se que em infecção experimental, a doença é aguda e, na infecção natural, é crônica (OZWARA et al. 2003; CERUTTI JUNIOR, 2007).

Habitualmente, quatro espécies de plasmódios infectam o homem, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*, mas já está sendo aceita uma quinta espécie, *P. knowlesi*, que originalmente acometia chimpanzés (JONGWUTIWES et al. 2004; ONG et al. 2009). Algumas espécies já foram descritas como naturalmente infectantes em humanos, como o *P. cynomolgy*, *P. simium* e, de forma experimental, *P. knowlesi*, *P. schwezi*, *P. rodhaini*, *P. inui*, *P. cynomolgy*, *P. brasilianum* e *P. simium*.

As espécies de plasmódios podem ser classificadas por grupos de acordo com a periodicidade da febre, ou seja, a lise das hemácias e a liberação de merozoítas no sangue, seu comportamento e, em menor grau, a morfologia. Das espécies de plasmódios com tipos de febres conhecidas, o *P. knowlesi* não tem correlato entre as espécies humanas, sendo o único a apresentar ciclo febril de 24 horas, é virulento tanto para símios quanto para seres humanos. O comportamento dos parasitas *P. malariae* e *P. brasilianum*, no ciclo eritrocítico, provoca febres com ciclos de 72 horas, chamadas de malárias quartãs, enquanto o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. simium*, as febres são terçãs (ciclos de 48 horas).

Em decorrência das similaridades moleculares, clínicas e morfológicas existentes entre *P. malariae* e *P. brasilianum*, acredita-se que, nas Américas, a malária ocasionada por *P. malariae* possa ter caráter zoonótico, sendo considerada a mesma espécie que parasita os primatas, denominado *P. brasilianum*, permitindo-se admitir a denominação *P. malariae/brasilianum* (FANDEUR et al. 2000).

Em 1964, Deane, trabalhando no Horto Florestal da Cantareira, na periferia da cidade de São Paulo, identificou primatas da espécie *Alouatta fusca*, naturalmente infectados por *P. simium* e por *P. brasilianum*. (DEANE, 1964). Dois anos depois, na mesma região, Deane e seus colaboradores relataram a infecção natural de *P. simium* em humano (DEANE et al. 1966).

Deane (1992), em uma detalhada revisão sobre malária em primatas no Brasil, afirmou que, apesar do achado da alta prevalência de malária em primatas, não havia relação entre a malária símia e a humana nas regiões Sul e Sudeste. Porém, na Região Amazônica, estudos sorológicos revelaram alta ocorrência de anticorpos anti-*P. brasilianum/P. malariae* em índios residentes e em primatas, sugerindo a possibilidade

de entre eles a malária ser zoonótica. Em estudos recentes, tem se observado, tanto em primatas quanto em humanos, que vivem em áreas de florestas, altos níveis de soropositividade a antígenos do *P. malariae/P. brasilianum* (VOLNEY et al. 2002; DUARTE et al. 2006).

Diversas espécies de primatas neotropicais já foram encontradas naturalmente infectadas no Brasil, em vários Estados. No Pará, diagnosticou-se *P. brasilianum* em quatro primatas guaribas, *Alouatta belzebul*, de um total de 41 animais amostrados desta espécie (DEANE et al. 1971). Em municípios do estado de Goiás, hoje, em alguns que compõem o Estado do Tocantins, foi identificado *P. brasilianum* em *Alouatta caraya* (DEANE & FERREIRA NETO, 1973). Nas duas pesquisas supracitadas, os pesquisadores também trabalharam com espécies da família Callitrichidae, ambas sendo negativas. Pesquisando malária símia em Manaus-AM, dois *Alouatta seniculus* foram positivos para *P. brasilianum* de um total de 18 animais (DEANE & ALMEIDA, 1967). Ferreira Neto et al. (1970), ao examinarem sangue de 19 primatas da espécie *Alouatta belzebul belzebul*, no Estado do Maranhão, diagnosticaram *P. brasilianum* em sete amostras, cujos animais originalmente pertenciam aos limites orientais da Floresta Amazônica, localizados nos municípios de Santa Luzia e de Imperatriz.

Em região extra-amazônica, no Estado do Espírito Santo, foi identificado em *Brachyteles arachnoides* parasitado com *P. brasilianum* e *P. simium* (DEANE et al. 1968) e, em *Alouatta fusca*, identificou-se *P. simium* (DEANE et al. 1966).

Deane (1972), fazendo uma compilação dos dados de oito anos de pesquisa da sua equipe sobre malária símia no Brasil, verificou que foram examinados 1.900 primatas de 48 espécies, totalizando 368 animais positivos, sendo 223 espécimes positivos para *P. brasilianum*, 114 para *P. simium* e 31 animais estavam parasitados por ambas as espécies de plasmódio. O maior número de animais positivos foi encontrado na Região Sudeste, seguida da Região Amazônica.

Também, na Guiana Francesa, em um estudo de prevalência do *P. brasilianum* em primatas, foi demonstrado que esses animais podem ser importantes reservatórios de malária humana (DE THOISY et al. 2000). Os resultados de outro trabalho sustentam a ideia de que a transmissão de malária de primatas neotropicais para

humanos e vice-versa pode não ser um evento tão raro na Floresta Amazônica (VOLNEY et al. 2002).

### **2.5 Detecção direta por meio de gota espessa e esfregaço sanguíneo**

Tradicionalmente, o diagnóstico confirmatório da malária é feito por exames microscópicos do sangue, necessitando-se de material e reagentes adequados, bem como de técnicos bem treinados para sua realização. O exame objetiva a detecção e diferenciação das espécies de plasmódios (OPAS, 1975).

O exame microscópico do sangue pode ser feito em esfregaço delgado (distendido) ou em gota espessa, consistindo na observação direta do parasita em sangue periférico ao microscópio ótico, realizada após coloração (BRAGA & FONTES, 2005).

A gota espessa e o esfregaço delgado têm baixo custo, ambos permitem identificar, com facilidade e precisão, a espécie do plasmódio e quantificar a parasitemia por volume ( $\mu\text{L}$  ou  $\text{mm}^3$ ) de sangue, consideradas padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de malária (PERANDIN et al. 2004; ENDESHAW et al. 2008). A principal desvantagem da microscopia é a difícil detecção de infecções mistas, pelas similaridades morfológicas entre estágios jovens dos parasitas da malária de diferentes espécies (NOEDL et al. 2006).

### **2.6 Detecção sorológica**

Os testes sorológicos são usados para detecção da malária desde a década de 60, são grandes avanços para a pesquisa diagnóstica e muito utilizados em pesquisas epidemiológicas (BRUCE-CHWATT, 1985). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é capaz de detectar anticorpos por longos períodos, é um método muito utilizado para essa detecção, sendo considerado um teste padrão (DRAPER & SIRR, 1980). Os resultados da reação são expressos em títulos e são influenciados pela qualificação do

microscopista, tipo de antígeno e qualidade do conjugado, apresentando alta reprodutibilidade e especificidade (SULZER & WILSON, 1967).

Pela RIFI, anticorpos contra antígenos de superfície de estágios sanguíneos de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são detectados em lâminas com esfregaços sanguíneos, preparadas com eritrócitos de primatas infectados experimentalmente ou de humanos infectados ou, ainda, no caso de *P. falciparum*, com antígenos de cultura (VOLNEY et al. 2002). Sabe-se que há uma reação cruzada limitada entre as espécies que infectam humanos e primatas, pela técnica de RIFI. Por isso, são usados mais largamente antígenos preparados a partir de cultura *in vitro* de *P. falciparum*, por essa espécie ser a que se desenvolve melhor em meio de cultura e confere uma ótima sensibilidade. Antígeno de *P. gallinaceum*, cultivada *in vitro*, demonstrou sensibilidade superior ao *P. falciparum* na detecção de anticorpos na malária humana (BOULOS et al. 1984; DODERER et al. 2007). A RIFI é uma técnica subjetiva e requer técnicos bem treinados, particularmente, quando se utilizam amostras de soro com baixos títulos de anticorpos. A falta de padronização de reagentes e manipulações da RIFI tornam os resultados difíceis de serem comparados entre laboratórios (DODERER et al. 2007).

As formas do parasita utilizadas na RIFI são trofozoítos e esquizontes, tendo preferência para a última forma, por serem mais reativas, deixando o teste mais sensível (TARGET, 1970; HALL et al. 1978). A persistência de anticorpos depende da exposição ao parasita, intensidade da infecção e da sua duração na circulação (LOPEZ-ANTUÑANO & SCHMUNIS, 1998).

## **2.7 Detecção molecular**

As técnicas moleculares vêm ganhando espaço nas pesquisas, em consequência da sua sensibilidade e especificidade, podendo ser preferidas frente à microscopia (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. É também uma ferramenta muito útil no diagnóstico de infecções mistas, no monitoramento da resposta do paciente a drogas antimaláricas e na caracterização de genótipos (SINGH, 1997; MAKLER et al. 1998).

As técnicas de amplificação e/ou detecção de material genético do *Plasmodium* são diversas, podendo ser gênero ou espécie-específicas. O uso do gene que codifica o RNA da subunidade menor ribossomal (ssrRNA) como alvo é um exemplo importante, sendo que existem várias técnicas e protocolos descritos (SNOUNOU et al. 1993, KIMURA et al. 1997), devendo também ser citada a técnica de amplificação do gene mitocondrial codificador do 'citocromo b' (PERKINS & SCHALL, 2002).

A maior vantagem das técnicas moleculares é a habilidade em detectar infecção em pacientes com baixa parasitemia e serem particularmente úteis em estudos de diferenças de linhagens, mutações e genes envolvidos em resistência às drogas e para mostrar o nível de relação em linhagens associadas com diferentes surtos de malária (MAKLER et al.1998).

A desvantagem das técnicas moleculares é a aquisição do equipamento, a sua instalação em local adequado e a necessidade de técnicos especializados (SWAN et al. 2005). Em vista disso, em muitos locais das regiões Norte e Nordeste do Brasil não há infraestrutura e nem médicos para atender a população. Por isso, em municípios da Região Norte, o atendimento dos pacientes é realizado em barcos, pois não há outra forma de acesso a essas regiões, com muitos infectados morrendo antes mesmo de serem atendidos e, dessa forma, as autoridades de saúde não são notificadas. Essa situação permite dizer que, nas regiões Norte e Nordeste, há subnotificação dos casos, e a falta de interesse do poder público gera perpetuação do sistema simples de diagnóstico da malária, como a gota espessa, deixando os exames mais sensíveis e específicos para os grandes centros do país, portanto, longe das populações de área de risco da doença.

Apesar da implementação de ferramentas moleculares no diagnóstico de rotina da malária ser difícil, a possibilidade de um sistema de detecção fácil e barato, vai torná-las promissoras em um futuro próximo (MENS et al. 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Diagnosticar por técnicas morfológica, sorológica e molecular *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Detectar e identificar espécies de *Plasmodium*, utilizando-se técnica morfológica (gota espessa e esfregaço sanguíneo) e molecular;
- Identificar a existência de anticorpos anti-*Plasmodium* em primatas da Reserva Particular Sítio Aguahy e do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) na Ilha de São Luís.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de dissertação foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob o Protocolo nº020091/09, e teve autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade para a realização das atividades, licença nº 23.078-1.

### 4.1 Espécies amostradas e áreas de estudo

As colheitas das amostras foram realizadas em dois municípios da Ilha de São Luis, São José de Ribamar e São Luís, Estado do Maranhão. Em São Luis as colheitas ocorreram no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/São Luís-MA) e, em São José de Ribamar as capturas e colheitas ocorreram na reserva Particular Sítio Aguahy. Foram amostrados 70 primatas neotropicais, das espécies, *Aotus infulatus*, *Callithrix jacchus*, *Cebus* sp., *Saimiri sciureus* e *Saguinus midas niger*, no período de julho de 2009 a abril de 2011.

#### 4.1.1 Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS)

As colheitas no CETAS/São Luís-MA, ocorreram ao longo dos dois anos da pesquisa, totalizando 50 animais amostrados: 33 *Cebus* sp., 04 *Saimiri sciureus*, 05 *Callithrix jacchus*, 07 *Saguinus midas niger*, 01 *Aotus infulatus*.

O CETAS (Figura 3) é gerenciado pelo IBAMA e tem a finalidade de recepcionar, triar e tratar os animais silvestres resgatados ou apreendidos pelos órgãos de fiscalização. Também, recebe de particulares animais silvestres, que estavam sendo mantidos como animais de estimação em cativeiros domésticos de forma irregular.



Figura 3. Vista aérea das instalações do CETAS de São Luís-MA. Fonte: Digital Globe.

#### 4.1.2 Reserva Particular Sítio Aguahy

Em São José de Ribamar as capturas e colheitas ocorreram na Reserva Particular Sítio Aguahy (Figura 4) ( $2^{\circ}38'76''S$ ,  $44^{\circ}08'22''W$ ) no período chuvoso, de fevereiro a abril de 2011, totalizando 20 animais amostrados: 18 *Cebus* sp. e 02 *Saimiri sciureus*.

A área possui 600 hectares, composto de manguezais (120 ha), restinga (50 ha) e fragmento de Floresta Amazônica. No entorno da área existem seis comunidades e uma área de mata nativa de aproximadamente dois mil hectares, que sofre intensa pressão humana. A reserva está funcionando desde 2004 como “Área de Soltura e Monitoramento de Animais Silvestres” (ASAS) do CETAS de São Luís. Ocorrendo relações e formação de grupos entre os primatas que ocorrem naturalmente na área e os soltos pelo CETAS. Como naturalmente dentro da reserva só ocorrem duas espécies

de primatas, *Saimiri sciureus* e *Cebus* sp., o CETAS só realiza solturas dessas duas espécies. Assim sendo, não é possível ter certeza se os animais amostrados nessa área já passaram anteriormente pelo CETAS, uma vez que os animais soltos não possuem nenhum tipo de identificação.

Em um estudo prévio, identificaram-se as trilhas usadas pelos grupos de primatas na Reserva Particular do Sítio Aguahy, bem como os horários que eles se reuniam para forragear. As informações serviram para selecionar os locais de colocação das gaiolas armadilhas (Tomahawk) (Figura 6). Para que os animais se familiarizassem, as gaiolas foram colocadas por 20 dias, sem serem armadas, contendo frutas como iscas (banana, manga, mamão e milho verde). Depois desse período, elas foram armadas e monitoradas de longe com auxílio de binóculos.

Os grupos forrageavam pela manhã, entre seis e oito horas e, pela tarde, entre 16 horas e 17h e 30 minutos. Os animais capturados por gaiolas Tomahawk eram transferidos para gaiola de prensa (Figura 6), para realizar a contenção química (item 4.2.1) e a colheita. Depois os animais eram marcados com tinta vermelha de longa duração (Raidex®, Alemanha), para identificar aqueles que já haviam sido capturados.



Figura 4. Mapa da Ilha de São Luís, evidenciando a Reserva Particular Sítio Aguahy (linha vermelha) e o local de soltura dos animais (seta). Fonte Digital Globe.



Figura 5. Gaiola Tomahawk sendo removida após captura de *Cebus* sp. na Reserva Particular Sítio Aguahy, São José de Ribamar, Maranhão, no mês de março de 2011.



Figura 6. Gaiola de prensa usada para contenção física dos primatas antes de serem submetidos à anestesia.

## **4.2 Colheita das amostras**

### **4.2.1 Imobilização física e química**

A fim de minimizar o estresse no momento da contenção, foram realizadas imobilizações de natureza física e química, de acordo com a idade (jovem ou adulto), peso e espécie de primata. Para calitriquídeos, os materiais usados para a contenção física foram luvas de couro e puçás; para os primatas de porte médio foi usada gaiola de prensa. Após contenção física, foram aplicadas injeções intramusculares da associação de Cloridrato de Zolazepam e Cloridrato de Tiletamina (Tabela 1), com modificações a partir das doses indicadas pelo fabricante.

Tabela 1. Dosagens anestésicas da associação de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam aplicadas via intramuscular para a imobilização química de diferentes espécies de primatas neotropicais.

<b>Familia</b>	<b>Espécies</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>
Cebidae	<i>Cebus</i> sp.	1.000	4,4
	<i>Saimiri sciureus</i>		
Callithrichidae	<i>Callithrix jacchus</i>	200	2,2
	<i>Saguinus midas niger</i>	250	
Aotidae	<i>Aotus infulatus</i>	1.150	4,0

#### 4.2.2 Obtenção das amostras de sangue e soro

A colheita foi realizada por meio de venopunção da veia jugular ou femoral, utilizando-se agulhas e seringas esterilizadas. A veia de escolha para colheita bem como a quantidade de sangue a ser colhido e tamanho da agulha (13 x 4,5 mm a 25 x 7 mm), variou de acordo com a espécie, idade e massa corporal do animal. Parte do sangue colhido foi depositada em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante para uso na reação em cadeias da polimerase (PCR) e, a outra parte, em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro, para a detecção de anticorpos anti- *Plasmodium* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As amostras de sangue e soro foram mantidas a -20°C.

Para confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo e de gota espessa a colheita de sangue foi realizada por punção digital com lanceta, e as gotas aparadas nas lâminas.

#### 4.2.3 Confecção de lâminas de esfregaços sanguíneos e de gota espessa

Antes da punção digital procedeu-se a antissepsia da polpa digital com algodão embebido em álcool iodado. Com uma lanceta foi feita, uma punção digital, e as gotas de sangue foram depositadas em lâminas de vidro. Para a confecção da lâmina de gota espessa, o sangue foi espalhado em forma de quadrado (dois por lâmina) (Figura 7) e, para a lâmina de esfregaço sanguíneo, o sangue foi distendido.



Figura 7. Colheita de sangue digital de *Cebus* sp. e confecção de lâmina: A – colheita de sangue digital; B – preparo de lâmina de gota espessa.

Após a secagem do sangue, as lâminas de gota espessa foram imersas em azul de metileno tamponado com fosfato (1g de azul de metileno medicinal em pó, 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – misturam-se os sais, retira-se 1g dessa mistura e acrescentam-se 250 mL de água destilada) para desmembramento por 5 segundos. Em seguida, foram lavadas em água tamponada (6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro, 5g de

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água destilada q.s.q para um 1 litro) e coradas por sete minutos com Giemsa (Sigma®) diluído em água tamponada (3 gotas/mL e lâminas invertidas). Depois lavadas em água corrente e, após estarem secas, foram observadas em microscópio de luz com objetiva de imersão (100x) (BRASIL, 2005).

As lâminas de esfregaço sanguíneo foram fixadas pelo metanol (Synth ®) durante 3 minutos e coradas com Giemsa (lâminas invertidas) diluído em água tamponada por 30 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). As lâminas, inicialmente, foram observadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, e somente as positivas foram novamente observadas no Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN), realizada pela Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi.

### **4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

#### **4.3.1 Cultivo *in vitro* de *P. falciparum***

O isolado K1 de *P. falciparum*, gentilmente doado pela Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi, chefe do Laboratório de Malária da SUCEN, foi mantido em cultivo *in vitro*, no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária, da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

A cultura de *P. falciparum* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Trager & Jensen (1976), cultivada em eritrócitos do tipo A+, O+ ou O- (dependendo do doador), na concentração final de 4%, em placa de Petri contendo 8 mL de RPMI 1640 (Sigma ®) suplementado com 10% de soro humano, previamente inativado, a 56°C, por 30 minutos, e desfibrinado por centrifugação a 3.000 x g por 15 minutos, a 4°C. A cultura foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> na concentração de 5%, a 37°C.

A troca do meio de cultura foi realizada diariamente, e a parasitemia verificada por observações diárias em esfregaços corados pelo corante Giemsa. Quando a parasitemia alcançava 5% ou no quarto dia de cultivo era realizado o repique.

#### **4.3.2 Obtenção de antígeno de *P. falciparum* para confecção de lâminas para imunofluorescência**

Quando a parasitemia atingiu 10%, e as formas predominantes foram esquizontes, todo o conteúdo foi retirado e centrifugado em um tubo Falcon, a 1.000 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com RPMI incompleto por 3 vezes.

O sedimento foi ressuspenso em PBS (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 9,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), em quantidade necessária para evitar a sobreposição de células e em cada poço da lâmina de imunofluorescência, foi depositado 10µL dessa suspensão. As lâminas foram secas por doze horas em temperatura ambiente, embrulhadas e armazenadas a -20°C, até o momento de uso.

#### **4.3.3 Reação de Imunofluorescência indireta para *Plasmodium***

As amostras de soro a serem testadas foram diluídas a 1:20 em PBS pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 9,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Dessa diluição 10 µL, foram depositados em cada poço da lâmina com antígeno de *P. falciparum*, reservando-se dois poços para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo de paciente humano, infectado e não infectado, respectivamente, gentilmente doados pela Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi. O procedimento foi o mesmo para cada lâmina com soros testes.

As lâminas foram incubadas a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas três vezes, em PBS pH 7,2, durante cinco minutos cada e, após a última lavagem as lâminas foram secas a temperatura ambiente. A cada poço foram adicionados 10 µL de conjugado anti-IgG de macaco, marcado pelo isotiocianato

de fluoresceína e, nos poços das amostras controles anti-IgG humano, também marcado pelo isotiocianato de fluoresceína, diluídos conforme indicação do fabricante (Sigma®).

As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após a lavagem em PBS, conforme descrito acima, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (9 mL de glicerina para 1mL de solução carbonato-bicarbonato, pH 9,6). Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio equipado com luz de fluorescência (Olympus, BX-FLA).

#### **4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

##### **4.4.1 Extração de DNA de sangue total**

A extração de DNA de sangue total de primatas foi realizada com o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C para a realização da PCR.

##### **4.4.2 Reação de amplificação**

Foram empregadas três técnicas da PCR para identificação das espécies de plasmódios que ocorrem no Brasil: *P.malariae/P. brasilianum*, *P. vivax/P. simium* e *P. falciparum*. As reações foram realizadas de acordo com os protocolos preconizados por Rubio et al (1999), Kimura et al. (1997) e Snounou et al. (1993). Todas as técnicas amplificam o fragmento do gene que codifica a região 18S do RNAr do plasmódio.

Em todas as reações, a água foi utilizada como controle negativo e, como controles positivos, foram usados DNA de *P. vivax* e *P. malariae*, oriundos de pacientes infectados, e DNA de *P. falciparum*, cultivado *in vitro*, ambos doados pela Dra. Silvia Di Santi.

#### 4.4.2.1 Semi-nested multiplex PCR (Rubio et al. 1999)

A amplificação foi feita em duas etapas por meio da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores abaixo, para identificação genérica (RUBIO et al. 1999):

- PLF: 5' AGTGTGTATCAATCGAGTTT 3'

- HUF: 5' GAGCCGCCTGGATACCG 3'

- UNR: 5' GACGGTATCTGATCGTCTT 3'

E para identificação específica, foram usados na segunda reação os oligonucleotídeos iniciadores:

- MAR: 5' GCCCTCCAATTGCCTTCT 3'

- FAR: 5' AGTTCCCCTAGAATAGTTACA 3'

- VIR: 5' AGGACTTCCAAGCCGAAG 3'

Na primeira reação, com os oligonucleotídeos iniciadores UNR-HUF, o produto da PCR apresentam 231 pb, o fragmento é usado como controle individual positivo e deve estar presente em todas as amostras, exceto no controle negativo. Os oligonucleotídeos iniciadores UNR-PLF formam um produto da PCR que varia de 783 a 821 pb, dependendo da espécie do gênero *Plasmodium*.

Na primeira reação com volume final de 50µL, apresentava: 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada deoxinucleotídeos trifosfatos, 25pmol de PLF e de UNR, 1,25pmol de HUF, 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) e 5µL de DNA, completando-se com água ultrapura estéril (Invitrogen®) para o volume final. A programação usada no termociclador para a primeira reação foi: 94°C/5 minutos; 94°C/45 segundos; 62°C/45 segundos; 72°C/60 segundos, com 40 ciclos repetidos a partir do ciclo 2 ao ciclo 4, e extensão final de 72°C/10 minutos. A programação foi realizada em aparelho termociclador modelo PTC- 100TM – Peltier – Effect Cycling (MJ Research, Inc.).

Para a segunda reação, foram utilizados para uma reação de 25 µL: 4µL de produto da primeira reação (diluído 4/1000) 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 25 pmol de PLF, 3,13 pmol de MAR, 15 pmol de FAR, 2,5 pmol de VIR, 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), completando-se com água ultrapura estéril (InvitrogenR) para o volume final descrito. Os produtos da PCR indicativos de *P. malariae* tem 269 pb, de *P. vivax* 499 pb e de *P. falciparum*, 395pb.

A programação da segunda reação foi: 94°C/5 minutos e 35 ciclos de 94°C/20 segundos, 62°C/20 segundos e 72°C/30 segundos e extensão final de 72°C/10 minutos.

#### 4.4.2.2 Nested PCR (KIMURA et al. 1997)

A amplificação foi realizada em duas reações, a primeira de identificação genérica, por meio da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores (KIMURA et al. 1997):

- P1: 5'ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT3'

- P2: 5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT 3'

E a segunda reação de identificação específica, foram usados os oligonucleotídeos iniciadores:

- M1: 5' GGAAGCTATCTAAAAGAAACTCATAT 3'

- F2: 5' CAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATG 3'

- V1: 5' CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA 3'

A primeira reação continha volume final de 20µL, apresentando: 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 125 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, 0,4 µM de P1 e P2, 0,75 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) e 5 µL de DNA, completando-se com água ultrapura estéril (Invitrogen®) para o volume final. A programação no termociclador da primeira reação foi: 92°C/2 minutos, e 35 ciclos de 92°C/30 segundos e 60°C/90 segundos e extensão final de 60°C/5 minutos. A

programação foi realizada em aparelho termociclador modelo PTC- 100TM – Peltier – Effect Cycling (MJ Research, Inc.).

Na segunda reação, o produto da primeira reação foi diluído 50 vezes em tampão TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0). Dessa diluição usaram-se 2 µL para a reação de nested-PCR com 1,0 µM de P2 e de cada um dos oligonucleotídeos em cada reação específica (F2, M1,V1), 312,5 µM de cada uma das quatro bases fosfatadas e 1,25X de tampão. A mistura foi mantida em gelo até o preparo da diluição da Taq DNA polimerase (Invitrogen ®) em 0,75U/10 µL de 1X tampão. Dessa mistura, 10µL foram adicionados à reação. Foi então submetida a programação: 92°C/2 minutos e 18 ciclos de 92°C/30 segundos, 60°C/1 minuto e 60°C/5 minutos. As amostras positivas foram vistas a partir de 110 pb.

#### 4.4.2.3 Nested PCR (SNOUNOU et al. 1993)

Foram empregados na primeira reação os oligonucleotídeos iniciadores rPLU5 (5' CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3') e rPLU6 (5' TTAAAATTGTTGCAGTT AAAACG 3'), que apresentam produto de PCR do gênero *Plasmodium* com 1.200 pb. Na segunda reação, o tamanho dos fragmentos específicos diferia de acordo com a espécie: 205pb para *P. falciparum*, 120 pb para *P. vivax* e 144 pb para *P. malariae*, usando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores (SNOUNOU et al. 1993):

- rMAL 1: 5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC 3'
- rMAL 2: 5' AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3'
- rFAL 1: 5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3'
- rFAL 2: 5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3'
- rVIV 1: 5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3'
- rVIV 2: 5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3'

A primeira reação foi realizada com volume total de 20  $\mu\text{L}$ , contendo: 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 125  $\mu\text{M}$  de cada uma das quatro bases fosfatadas, 250 nM de rPLU 5 e rPLU 6, 0,4 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), completando com água ultrapura estéril (InvitrogenR) necessária para o volume final. A programação do termociclador foi: 94°C/5 minutos, 24 ciclos de 58°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e 94°C/1 minuto e depois 58°C/2 minutos e, finalmente, 72°C/5 minutos.

Para a segunda reação, foram utilizados os mesmos valores de reagentes da primeira, diferenciando apenas que nesta foi usado 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR, e os oligonucleotídeos foram colocados aos pares de acordo com a espécie. A programação do termociclador foi: 94°C/5 minutos, 30 ciclos de 58°C/2 minutos, 72°C/2 minutos e 94°C/1 minuto e depois 58°C/2 minutos e, finalmente, 72°C/5 minutos.

#### **4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etideo (Invitrogen®) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/ 350mA, durante 1 hora e 10 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®).

Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E), acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®).

## **4.6. Sequenciamento**

### **4.6.1. Extração dos amplicómeros do gel de agarose**

Após a PCR, os produtos de PCR foram cortados do gel de agarose com lâmina de bisturi estéril, pesados e colocados em tubos de polipropileno de 2,0 mL devidamente identificados. Foram purificados com Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Life Sciences®), de acordo com as recomendações do fabricante.

O material purificado foi quantificado em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific), por meio da leitura da absorbância de cada amostra a ser sequenciada. O sequenciamento foi realizado por meio de método automatizado. O sequenciamento foi conduzido em sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®).

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

### **4.6.2 Clonagem de fragmentos de DNA positivos na PCR em pGEM-T Easy® para sequenciamento**

Os produtos da reação de gênero da PCR do protocolo de Kimura et al. (1997), das amostras MP28, MP29, MP30, MP31, MP32, MP33, MP34, MP35, MP36, MP37, MP38, MP39 e MP40, tiveram que ser clonados para depois serem sequenciados, porque os fragmentos de DNA amplificados eram muito pequenos (entre 111 e 115 pb).

Para a reação de ligação com volume final de 10 µL, foram adicionados em um tubo tipo Eppendorf: 1 µL de produto da PCR (150 ng/ µL) quantificadas em Nanodrop® (Thermo Scientific), 1 vetor, 2 µL de água, 1 µL do vetor pGEM-T Easy (50 ng/ µL, Promega), 5 µL de tampão de ligação 2 x concentrado e 1 µL de T<sub>4</sub> DNA ligase. A reação foi incubada a 4°C por doze horas.

Os fragmentos clonados no vetor foram utilizados para transformação por choque térmico (HANAHAN, 1985) de células de *Escherichia coli* One Shot (Invitrogen). As células de *E. coli* competentes foram descongeladas em gelo e incubadas com 10 µL da reação de ligação por 20 minutos e, em seguida, submetidas a choque térmico a 42°C por dois minutos. Novamente foram incubadas em gelo por dois minutos.

Para a recuperação das células, foram adicionados 250 µL de meio de LB com 0,2% de glicose, a suspensão de células foi mantida em movimento de 100 rpm, a 37°C por uma hora. Após esse período, 150 µL dessa suspensão foram depositados em placa de Petri contendo: meio LB sólido, ampicilina (100 mg/L), 100 mM de IPTG e X-GAL (1mg/placa) e incubada a 37°C por 16 horas.

As colônias que cresceram no meio seletivo e que perderam a capacidade de quebrar o substrato X-GAL (colônias brancas), em virtude da introdução do inserto no sítio de multiclonagem, foram repicadas em outra placa contendo 5 mL de meio líquido LB, 0,2% de glicose e ampicilina. Após o cultivo dos clones, o precipitado de células (centrifugação a 1.000 rpm) foram utilizados para extração de DNA plasmidial por Mini Prep (SAMBROOK et al. 1989).

O DNA foi dosado em Nanodrop® e uma alíquota foi diluída a 100 ng/µL para a reação de PCR, para confirmação da inserção dos fragmentos. Após a confirmação, o material dos clones foram sequenciados, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores M13 forward e M13 reverse, no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

#### **4.6.3. Reação de Sequenciamento**

Os amplicons purificados e quantificados foram utilizados na concentração aproximada de 100 ng de DNA-amostra. Em gelo, foi preparada a reação, contendo: 3,5 µL de Tampão “Save-Money” (1M MgCl<sub>2</sub>; 1M Tris-HCl, pH 9,0; água estéril ultrapura q.s.p 200 µL), 0,5 µL de “BigDye” (Big Dyer Terminator V3.1 9 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems™) e 2 µL do oligonucleotídeos iniciador que

originou o amplímero (na concentração de 10pmol/ $\mu$ L). Utilizou-se uma placa de 96 cavidades (PP-PCR plate – Mil Halben Rand Fur ABI, Greiner Bio-One™) colocada em gelo e, em cada cavidade, foram adicionados 3  $\mu$ L de água ultrapura, 1  $\mu$ L da amostra a ser sequenciada e 6  $\mu$ L da reação (descrita anteriormente). Para as amostras contendo baixas quantidades de DNA, foi adicionado maior volume da amostra, e o volume de água foi alterado (q.s.p 10  $\mu$ L). A placa foi então submetida à centrifugação (Centrífuga de placa modelo – Rotina 46 R, Hettich-Zentrifuger™) por 20 segundos, a 1.200 rpm, e depois a placa foi vedada com tampa de silicone e colocada em aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller – Peltier Effect Cucling Cycler, Modelo PTC-100, MJ Research™), com a programação de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 52°C, 4 minutos a 60°C e, finalizando, a 4°C indefinidamente. Após essa etapa, foram adicionados 80  $\mu$ L de Isopropanol 75% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e incubada em centrífuga de placa a 20°C por 15 minutos. Após essa pausa, a placa foi centrifugada a 1.310 x g, a 20°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Adicionaram-se 200  $\mu$ L de Etanol 70% (temperatura ambiente) para cada amostra. A placa foi vedada com adesivo plástico e centrifugada a 20°C, em 1.310 x g, por 10 minutos.

Novamente, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente em papel absorvente. Essa etapa foi realizada duas vezes. A placa foi colocada invertida e sem tampa sobre o papel toalha e centrifugada à temperatura ambiente a 1.310 x g, por 20 segundos. Em seguida, a placa foi então colocada, sem tampa, em uma bomba de alto vácuo (Eduards™) por 5 minutos. Adicionaram-se 9  $\mu$ L de formamida (Hi Di, Applied Biosystems™) para cada amostra, vedou-se a placa com uma tampa de silicone e foi então colocada no aparelho termociclador com a programação de 95°C, por 5 minutos, e finalização a 4°C. Logo após o fim da programação no termociclador, a placa foi colocada em gelo por 3 minutos. Depois, a placa foi colocada no aparelho sequenciador (3100 Hitachi Genetic Analyser – ABI PRISM, Applied Biosystems™).

## **4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **4.7.1. Análise dos produtos sequenciados**

Após sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas e confrontadas com aquelas já publicadas no GenBank, onde foram verificadas similaridades entre elas, utilizando-se o programa BLAST (BENSON et al. 2002).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação morfológica de plasmódios (gota espessa/esfregaço sanguíneo)

Foram observadas 140 lâminas dos 70 animais amostrados, sendo 70 de esfregaços sanguíneos e 70 de gota espessa. Do total de lâminas avaliadas pelo exame de microscopia, em cinco (7,1%) lâminas, de cinco animais diferentes, foram identificadas formas sugestivas de *Plasmodium* spp., com achados em três lâminas de esfregaço sanguíneo e em duas lâminas de gota espessa (Figura 8). Todas as amostras positivas eram de animais do CETAS, sendo uma lâmina positiva de *Callithrix jacchus* e as outras quatro de primatas do gênero *Cebus*. As lâminas passaram por uma segunda análise, no Laboratório de Malária da SUCEN, realizada pela Dra. Silvia Di Santi, sendo confirmada a presença de formas sugestivas de *Plasmodium* spp.

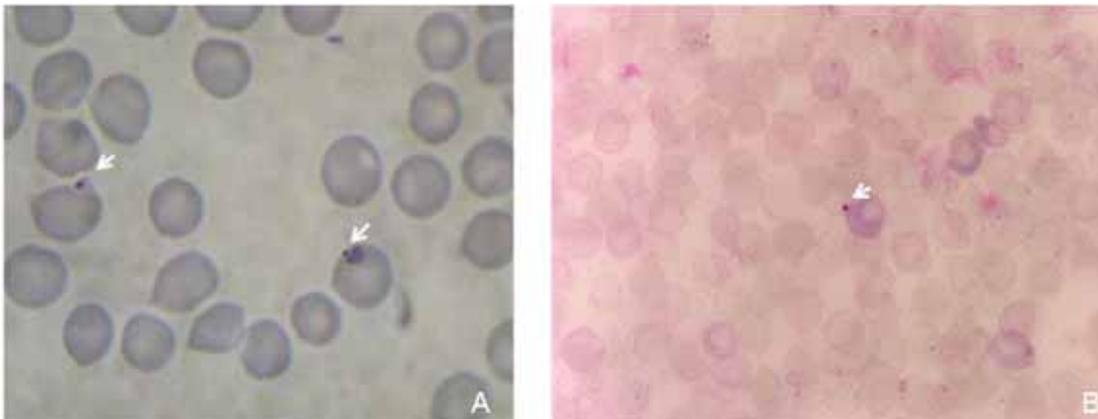


Figura 8. Identificação de formas sugestivas de *Plasmodium* spp. em lâminas de esfregaço sanguíneo: A – trofozoítas em forma de anel, de amostra de *Cebus* sp. (número 01); B – forma imatura de trofozoíta de amostra de *Cebus* sp. (número 18). Corado pelo corante Giemsa, objetiva 100x.

## 5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Na sorologia foram usadas soros humanos, sabidamente, positivo e negativo como controles em cada lâmina de RIFI (Figura 9). As 70 amostras de soros testados de primatas foram não reagentes pela RIFI, considerando-se a diluição inicial de 1/20 como ponto de corte.

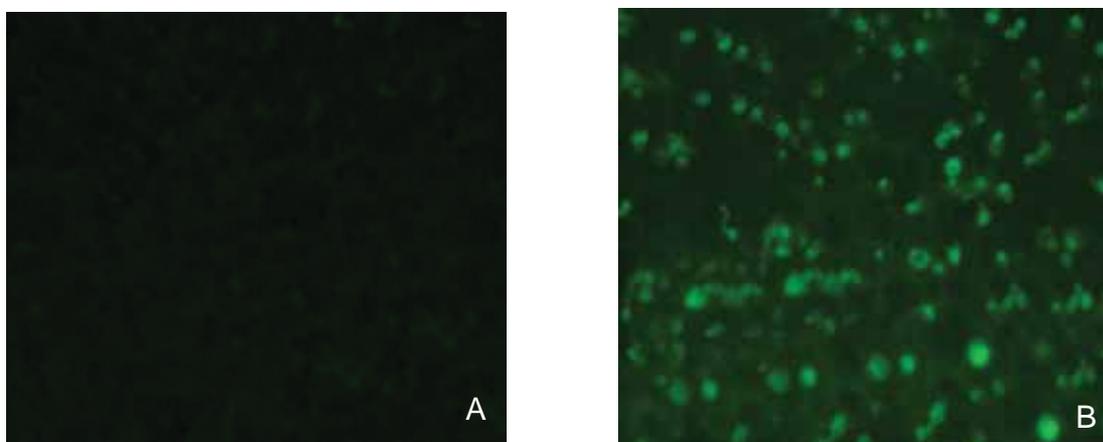


Figura 9. Controles da reação de imunofluorescência indireta com soros humanos: A – controle negativo; B – controle positivo.

## 5.3 Identificação molecular de *Plasmodium* spp.

Dos 70 primatas amostrados pelos três protocolos da PCR, foi possível observar produtos amplificados para *Plasmodium* spp. em 13 amostras, pela técnica descrita por Rubio et al. (1999) e, em nove amostras, pelo protocolo de Kimura et al. (1997).

Das 13 amostras positivas, oito (61,54%) eram de primatas da Reserva Particular Sítio Aguahy e cinco (38,46%) de primatas do CETAS, sendo que todos eram primatas do gênero *Cebus* sp.

Na primeira reação da PCR descrita por Rubio et al. (1999), as amostras MP28, MP30, MP33 e MP37 (colunas 3, 5, 8 e 12, respectivamente, na Figura 10) não amplificaram DNA de *Plasmodium*, no entanto, na segunda reação, de semi-nested multiplex PCR, as amostras amplificaram DNA de *Plasmodium* spp. (colunas 3, 5, 8 e 12, respectivamente, Figura 11).

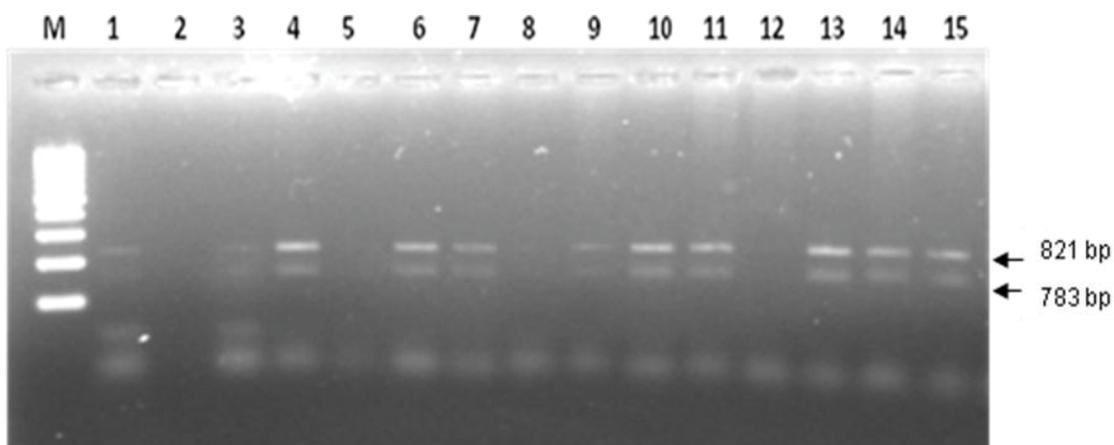


Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gênero *Plasmodium*, protocolo padronizado por Rubio et al. (1999), onde 231 bp é o controle endógeno da reação e 783-821 bp é um fragmento que indica positividade para plasmódio, o tamanho varia dependendo da espécie de *Plasmodium* spp.. Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Coluna 1: controle positivo de cultura de *P. falciparum*; Coluna 2: controle negativo; Colunas 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14 e 15: amostras positivas de *Cebus* sp.; Colunas 3, 5, 8, 12: amostras de *Cebus* sp. que não amplificaram.

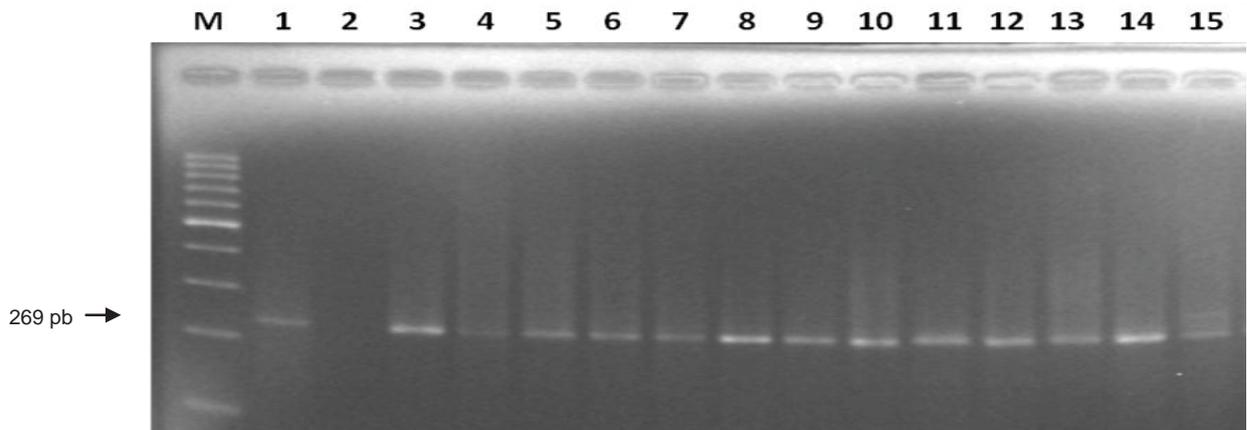


Figura 11. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al. 1999) para as espécies *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum* do Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Coluna 1: controle positivo de *P. malariae* (269 pb); Coluna 2: controle negativo; Colunas 3 até 10: amostras positivas de *Cebus* sp. (Reserva Particular Sítio Aguahy); Colunas 11 até 15: amostras positivas de *Cebus* sp. (CETAS-São Luís).

Na reação para o gênero *Plasmodium* na PCR pelo protocolo de Kimura et al. (1997), foi possível observar ampliações a partir de 110 pb em nove amostras (MP 28, MP30, MP31, MP32, MP34, MP35, MP37, MP39 e MP40), sendo consideradas positivas de acordo com o protocolo. A reação para espécies de *Plasmodium* (*P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*) confirmou a positividade nas nove amostras anteriormente positivas na primeira reação, apresentando fragmentos de DNA na direção de 111 a 115 pb, sendo considerados *P. malariae* de acordo com o preconizado por Kimura et al. (1997). Conseguiu-se a confirmação da inserção dos fragmentos dos produtos das amostras MP 28, MP29, MP30, MP31, MP32, MP33, MP34, MP35, PM36, MP37, MP38, MP39 e MP40, nos clones pela PCR (KIMURA et al. 1997) (Figura 12).

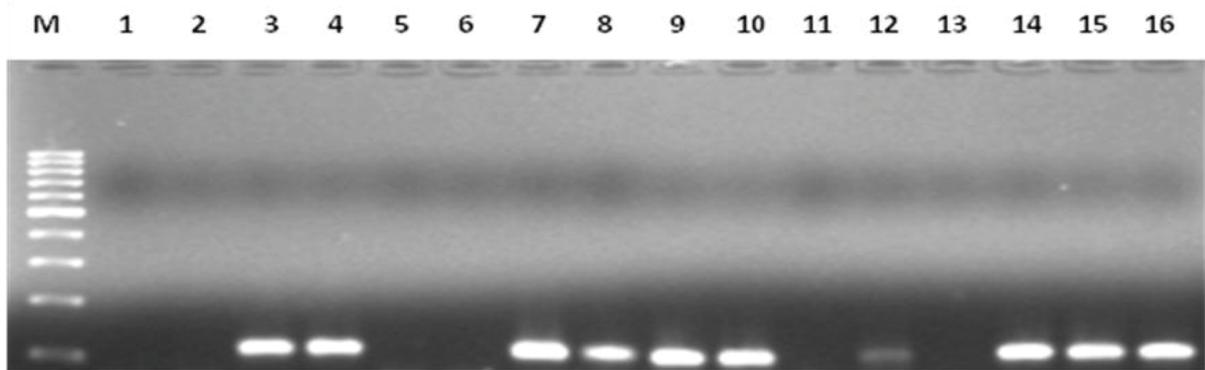


Figura 12. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à PCR dos clones (KIMURA et al. 1997) para o gênero *Plasmodium*. As colunas 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15 e 16 mostram a amplificação dos clones 33.3; 34.3; 35.2; 36.2; 37.3; 38.3; 39.3; 40.1; 40.2; 40.3, respectivamente. Coluna M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®); Colunas 1, 2, 5, 6, 11 e 13: clones que não amplificaram.

#### 5.4 Correlação dos resultados morfológicos (esfregaço sanguíneo/gota espessa), da sorologia e da PCR

A positividade das amostras só pôde ser observada em uma das técnicas utilizadas (microscopia ou PCR). Sendo assim, as 13 amostras positivas de sangue total de primatas pela técnica de PCR para identificação de *Plasmodium* spp., só foram positivas nessa técnica, assim como, nas cinco amostras positivas de sangue digital de primatas pela técnica de microscopia de luz, não houve amplificação de DNA de *Plasmodium* spp. em nenhum dos protocolos de PCR utilizados.

Portanto, do total de 70 amostras estudadas, 18 (25,7%) foram positivas; dessas, 13 (72,2%) pela técnica da PCR e cinco (27,7%) pela técnica de microscopia de luz. Em nenhuma das amostras pôde-se detectar anticorpos anti-*Plasmodium* spp. Na Tabela 2, foram compilados todos os resultados dos diagnósticos de morfologia, sorologia e molecular das 18 amostras positivas, inclusive sua origem e sexo.

Tabela 2. Resultados dos diagnósticos morfológicos (gota espessa/esfregaço sanguíneo), da sorologia e da PCR das 18 amostras positivas, com origem e sexo.

Nº da amostra	Diagnóstico			Sexo	Origem
	Morfológico (gota espessa/ esfregaço sanguíneo)	Sorológico	PCR (Rubio et al. 1999/Kimura et al. 1997)		
MP 28	-/-	-	+/+	M	Reserva Particular Sítio Aguahy, São José de Ribamar-MA
MP 29	-/-	-	+/-	M	
MP 30	-/-	-	+/+	M	
MP 31	-/-	-	+/+	M	
MP 32	-/-	-	+/+	M	
MP 33	-/-	-	+/-	M	
MP 34	-/-	-	+/+	M	
MP 35	-/-	-	+/+	M	
MP 36	-/-	-	+/-	M	
MP 37	-/-	-	+/+	M	CETAS de São Luís-MA
MP 38	-/-	-	+/-	M	
MP 39	-/-	-	+/+	M	
MP 40	-/-	-	+/+	M	
MP 01	-/+	-	-/-	M	
MP05*	-/+	-	-/-	M	
MP17	+/-	-	-/-	F	
MP18	+/-	-	-/-	F	
MP19	-/+	-	-/-	M	

\* *Callithrix jacchus* – único animal positivo que não pertence ao gênero *Cebus*.

## 5.5 Resultado do sequenciamento

Foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 13 produtos purificados, das 13 amostras que amplificaram na reação de semi-nested multiplex PCR (RUBIO et al. 1999) e 33 clones dos produtos da reação de gênero da PCR de Kimura et al. (1997). No entanto, devido aos pequenos fragmentos das amostras, 269 pb e 111 pb, dos protocolos de Rubio et al. (1999) e Kimura et al. (1997), respectivamente, o sequenciamento não foi realizado com sucesso.

Dessa forma, foram enviados ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP/USP, que possui aparelho sequenciador mais moderno, que utiliza microcapilares revestidos de poliacrilamida, capazes de sequenciar pequenos fragmentos de DNA, sete produtos purificados das amostras que foram amplificadas na segunda reação do protocolo de Rubio et al. (1999) e 10 clones dos produtos da reação de gênero da PCR de Kimura et al. (1997). Entretanto, os resultados desse sequenciamento ao serem confrontados com dados depositados no GenBank/BLAST não mostraram similaridade.

## 6. DISCUSSÃO

Doenças negligenciadas são doenças que prevalecem em condições de pobreza de qualquer país e contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade social e financeira, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Como exemplos de doenças negligenciadas, no Brasil, podem ser citadas: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária e tuberculose. A malária reduz a condição econômica e o tempo de vida produtiva do indivíduo doente. Para a malária, diversos estudos têm sido realizados, dentre eles, investigar qual o papel dos reservatórios na perpetuação dessa doença nas áreas de transmissão. O possível papel dos primatas, como reservatório, e sua participação na cadeia epidemiológica da malária humana vem sendo discutidos, e os ciclos naturais de transmissão, primata-vetor-humano, ainda não foram totalmente estabelecidos.

No presente estudo, de um total de 70 primatas estudados, foram identificados pela microscopia de luz (esfregaços sanguíneos e gota espessa), cinco animais com presença de *Plasmodium* spp., representando 7,1% de positividade, com parasitemia sempre baixa, de um a cinco parasitas a cada duas lâminas, por indivíduo. Embora a porcentagem de positividade seja baixa neste trabalho, ainda é maior do que a maioria dos trabalhos descritos na literatura, utilizando-se a mesma técnica de microscopia de luz (CHINCHILA et al. 2006; DUARTE et al. 2008; YAMASAKI et al. 2011). Na Costa Rica, de 104 bugios (*Alouatta palliata*) de vida livre estudados, em seis primatas (5,7%) foram observadas formas identificadas como *P. brasilianum* (CHINCHILA et al. 2006). No Brasil, em três biomas diferentes (Cerrado, Mata Atlântica e Mata Atlântica Semidecidual) foram amostrados 448 primatas, identificando-se também a presença de *P. brasilianum* em lâminas de apenas sete (1,56%) deles (DUARTE et al. 2008). Também, no estado de São Paulo, diagnosticaram em uma (2%) lâmina com amostra de sangue de bugio de vida livre, *P. brasilianum*, em um total de 50 bugios (*Alouatta guariba clamitans*,) de vida livre (YAMAZAKI et al. 2011). Já, na Guiana Francesa, de 214 primatas de vida livre das famílias Callitrichidae e Cebidae pesquisados,

detectaram pela microscopia de luz o *P. brasilianum* em dez (4,7%) amostras, sendo oito de *Alouatta seniculus* e dois de *Saguinus midas* (FANDEUR et al. 2000).

Neste trabalho, não foi possível por meio da microscopia de luz a identificação de espécies dentro do gênero *Plasmodium*, em decorrência a presença de uma única forma evolutiva (trofozoítas). No entanto, esse resultado não causa surpresa, pois é conhecido que mesmo na microscopia de luz, método de referência e mais utilizado no diagnóstico de *Plasmodium*, há sensibilidade e especificidade limitadas por vários fatores, entre eles, a baixa densidade parasitária (SNOUNOU et al. 1993). Como em primatas, a baixa parasitemia em infecções naturais é comum, a técnica não apresenta sensibilidade e a observação de todos os campos da lâmina torna-se necessária. A baixa parasitemia de infecções com *P. malariae*/*P. brasilianum* ocorre em razão da particularidade do parasita que só invade hemácias velhas (0,1% do total) que já estão próximas de serem retiradas da circulação pelo baço, enquanto *P. vivax* e *P. ovale* invadem preferencialmente as hemácias jovens e, *P. falciparum*, hemácias em qualquer fase evolutiva.

O uso da microscopia de luz, nas décadas de 70 e 80, como único método de diagnóstico de plasmódio em primatas, no Brasil, auxiliou no conhecimento da distribuição das duas espécies de plasmódios que infectam os primatas no país. Dessa forma, na Região da Amazônia Legal, foi identificada *P. brasilianum* como única espécie de plasmódio que acomete os primatas. No Maranhão, foram identificados 7/27 primatas parasitados por *P. brasilianum* (FERREIRA NETO et al. 1970) e também, foi identificado por Deane et al. (1971), no estado do Pará, em 7/77 primatas. No Acre, 2/51 primatas *Callicebus moloch cupreus* (FERREIRA NETO et al. 1972) e, no Estado do Amazonas, 7/18 *Alouatta seniculus straminea* foram identificados com *P. brasilianum* (DEANE & ALMEIDA, 1967). Pôde-se observar que o número de animais diagnosticados positivos pela técnica de microscopia de luz é sempre muito baixo, em virtude das características supracitadas, de baixa parasitemia, e a exigência da técnica, de boas lâminas para que se possa visualizar com precisão a morfologia do parasita.

Dessa forma, pode-se inferir que os animais em estudo podem ter adquirido o parasita e, rapidamente, eliminado a infecção, tornando difícil a observação do parasita

no sangue, assim como a detecção de anticorpos. Neste estudo, em nenhum dos soros testados pela RIFI foi possível detectar a presença de anticorpos anti-*Plasmodium*, nem mesmo em diluições iniciais de 1:20. Vale ressaltar a utilização de antígenos preparados a partir de cultura de *P. falciparu*, e a reação cruzada com outras espécies de *Plasmodium* é comum, mas a reatividade para cada espécie pode ser diferente. Sabe-se que os estágios eritrocíticos do *Plasmodium* (esporozoítas, merozoítas e gametócitos) apresentam antígeno-estágio-específico, mas há proteínas antigênicas compartilhadas por algumas espécies de plasmódio (DRUILHE et al. 1984), como os que infectam humanos e primatas brasileiros. Assim, infere-se que, possivelmente pela baixa quantidade de anticorpos presentes nas amostras, haveria uma necessidade de antígenos específicos de cada espécie de *Plasmodium*. Ou a infecção era inicial e só haveria a possibilidade de detecção de anticorpos anti-IgM, o que não foi pesquisado no presente trabalho. Outra possibilidade é que os merozoítas liberados de esquizontes teciduais podem ser diferentes antigenicamente de merozoítas liberados de esquizontes na fase sanguínea; na verdade, ambos diferem no tamanho e na forma (DRUILHE et al. 1984). Isso pode dizer que as formas parasitárias circulantes encontradas no sangue dos primatas estudados eram advindas de esquizontes teciduais, visto que se tratava de infecção natural e, possivelmente, na fase crônica (OZWARA et al. 2003; CERUTTI JUNIOR, 2007), enquanto, as formas parasitárias utilizadas no preparo dos antígenos para a reação de RIFI eram de formas sanguíneas.

Os resultados deste estudo discordam dos citados na literatura, porque relatam uma prevalência relativamente baixa de anticorpos em primatas. Tais como, a pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*, pela técnica de RIFI, em 777 soros de primatas, somente sororeagiram 28 (3,6%) soros de espécimes de *Alouatta* sp., de vida livre, e nenhum soro de primatas dos gêneros *Callithrix* e *Cebus* foram positivos (DUARTE et al. 2006; 2008). Este último resultado corrobora com os resultados deste trabalho, visto que, os soros dos primatas dos gêneros *Callithrix* e *Cebus* pesquisados também foram negativos. No entanto, altos títulos de anticorpos anti-*Plasmodium* foram encontrados em primatas da Amazônia Brasileira, usando-se a RIFI e o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) (ARRUDA et al. 1989).

Maior prevalência é obtida usando-se a técnica de ELISA, tanto para soros humanos quanto para soros de primatas, pois é mais sensível que a RIFI. Neste trabalho, foi utilizada apenas a RIFI. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as duas técnicas, ao pesquisar anticorpos para a malária em humanos e primatas na Guiana Francesa (VOLNEY et al. 2002). Na maioria dos trabalhos de soropidemiologia, no Brasil, utilizam-se as técnicas de ELISA (com peptídeos recombinantes para a detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*) e RIFI, para que uma possa suprir a desvantagem da outra em sensibilidade e especificidade.

Informações sobre o tempo de circulação de anticorpos anti-*Plasmodium*, classe e subclasse dos anticorpos reagentes (IgG1, IgG2 entre outros), no estudo da resposta imune de primatas neotropicais frente aos protozoários, são perguntas que ainda precisam ser respondidas. A importância da IgE na infecção malárica tem sido pesquisada, visto que essa imunoglobulina aparece em altos níveis durante infecções parasitárias em humanos e primatas (COHEN, BUTCHER & MITCHELL, 1974; DUARTE et al. 2007).

Ao ser realizada a técnica da PCR nas amostras, encontrou-se um número significativamente maior de resultados positivos em relação à microscopia de luz. Das 70 amostras analisadas, 13 (18,57%) foram positivas nas reações para gênero *Plasmodium* no protocolo do Rubio et al. (1999) e nove amostras positivas para esse gênero, usando-se o protocolo de Kimura et al. (1997), contrastando com os resultados da microscopia de luz na qual foram obtidas cinco (7,14%) lâminas positivas. A diferença de positividade foi de 12% no resultado da primeira técnica em relação à segunda. Esse resultado se deve à maior sensibilidade da PCR em relação à microscopia de luz. Em trabalhos de comparação de técnicas de diagnóstico para malária, a microscopia de luz é a técnica que sempre apresenta menor sensibilidade e especificidade, em relação às outras técnicas (SUARES-MUTIS & COURA, 2006; PÖSCHL et al. 2010).

Também, em amostras de primatas, Duarte et al. (2006; 2008) identificaram divergências entre as técnicas de microscopia e PCR e os resultados positivos obtidos, na primeira técnica, não foram confirmados na segunda. Segundo os autores, isso pode

ocorrer caso novas espécies de *Plasmodium* estejam circulando entre os primatas brasileiros. Dessa forma, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados não conseguiriam amplificar essas amostras.

Os resultados apresentados na técnica de Kimura et al. (1997) não concordaram com aqueles obtidos pela técnica descrita por Rubio et al. (1999), visto que, na primeira técnica, amplificaram somente nove amostras (seis de primatas de vida livre e 3 de primatas do CETAS), enquanto, na segunda, 13 amostras foram amplificadas; dessas, oito eram amostras de primatas de vida livre e cinco de primatas do CETAS. Na nested PCR, a espécie identificada pela reação foi a *P. malariae*, pois os fragmentos se apresentavam na direção dos 111 a 115 pares de base (KIMURA et al. 1997). Da mesma forma, os resultados da semi-nested multiplex PCR, os fragmentos se alinhavam com 269 pares de base, que identifica *P. malariae* (RUBIO et al. 1999). Os resultados deste estudo não divergem daqueles já descritos na literatura, nos quais o *P. malariae* é a espécie mais largamente identificada em primatas no Brasil, ressaltando que esta espécie é molecular e morfologicamente idêntica ao *P. brasilianum*, espécie que infecta primatas neotropicais (LAL et al. 1988; FANDEUR et al. 2000; CARTER & MENDIS, 2002; LECLER et al. 2004). Os resultados deste estudo corroboram com resultados encontrados na Guiana Francesa, os quais identificaram pela nested PCR, *P. brasilianum* em 17 (n=154) primatas, representando 11% de positividade. (FANDEUR et al. 2000). Assim como no Brasil, identificaram primatas do gênero *Alouatta* positivos pela PCR para espécies de *Plasmodium* em dois biomas diferentes, Mata Atlântica (n=71, positividade de 12,6%) e Mata Atlântica Semidecidual (n=235, positividade de 6,7%), identificando positividade, respectivamente, nas regiões acima, de 5,6% e 0,4% para *P. vivax/P. simium*; 5,6% e 5,5% para *P. malariae/P. brasilianum* e 1,4% e 0,8% para *P. falciparum* (DUARTE et al. 2006).

Não foi possível observar produtos amplificados de DNA de *Plasmodium* neste trabalho, utilizando-se a PCR pela técnica descrita por Snounou et al (1993).

Os resultados deste estudo divergem dos descritos na literatura (ZAKERI et al. 2002; BOONMA et al. 2007), porque consideram essa técnica sensível para diagnóstico de malária humana e de primatas (FANDEUR et al. 2000), identificando até 0,1

parasita/ $\mu\text{L}$ . No entanto, neste estudo, a técnica não se mostrou sensível. Acredita-se que seja devido aos primatas apresentarem baixa parasitemia, acrescentando-se a isso a pouca quantidade de DNA molde requerida pela técnica, que é de somente  $1\mu\text{L}$ . Os autores da técnica relatam que, em baixas parasitemias, a técnica não tem boa reprodutibilidade. É importante, ainda, levar em consideração que, em técnicas da PCR extremamente sensíveis, pode ocorrer o fenômeno de 'tudo ou nada', ou seja, detecção de possíveis resultados falsos positivos ou negativos. Isso ocorre ao se tentar detectar *Plasmodium* spp. em amostras com parasitemias muito baixas, nas quais o número de genomas adicionados à reação da PCR é próximo do limite de detecção. Nesses casos é provável que a mesma amostra seja positiva algumas vezes e em outras reações, negativa (BOONMA et al. 2007). Esse fato ocorreu durante a pesquisa para este trabalho, utilizando-se a técnica de Rubio et al (1999), na qual as amostras MP28, MP30 e MP37 amplificaram em uma primeira reação de gênero e, repetindo a reação não houve amplificação, mesmo sendo usado o mesmo DNA molde. Em uma terceira reação, as amostras MP28, MP30 e MP37 amplificaram da mesma forma que a primeira reação realizada.

Divergência também foi encontrada comparando-se os resultados da RIFI, da microscopia e da PCR, já que, em nenhum dos soros testados foi possível detectar anticorpos anti-*Plasmodium*, mesmo em amostras de animais positivos para *Plasmodium* na PCR ou na microscopia. Porém, a PCR e a microscopia detectam a presença do parasita na circulação sanguínea do animal, tratando-se de um resultado pontual. Para a manutenção de anticorpos circulantes, o animal deve estar constantemente em contato com o parasita transmitido pelo vetor.

Como não foi obtido sucesso no sequenciamento, não se pôde comparar os resultados deste trabalho com os dados depositados no Genbak. A dificuldade de sequenciar amostras com baixíssimas parasitemias e com fragmentos de DNA pequenos (111pb) foi uma constante na análise dos resultados deste estudo. Essa incapacidade de sequenciar as amostras se deve ao tipo de tecnologia usada, ou seja, o aparelho sequenciador ABI PRISM3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®) não tem boa capacidade de sequenciar amostras com menos de 300 pb.

O comportamento natural dos primatas de percorrer longas distâncias pode afetar a disseminação do *Plasmodium* no ambiente rural ou de floresta, comprovando-se que os primatas servem de reservatório para as espécies que afetam o homem.

## 7. CONCLUSÃO

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

1. Os primatas da região estudada apresentaram parasitemia baixa.
2. Testes específicos para amostras de primatas precisam ser elaborados.
3. Os primatas deste estudo não apresentaram anticorpos detectáveis pela técnica de RIFI frente ao antígeno de *Plasmodium*.

## 8. REFERÊNCIAS

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.

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

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.

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. 124-130, 2007.

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

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 de dezembro de 2009.

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

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

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

CERUTTI-JÚNIOR, C.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. C. L. D.; FALQUETI, A.; REZANDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. C.; COLLINS, W.; MALAFRONT, R. S. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malaria Journal, v. 6, p. 33, 2007.

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.

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, n. 6, p. 796-803, 1971.

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

COHEN, S.; BUTCHER, G.A.; MITCHELL, G.H. Mechanisms of immunity to malaria. Bulletin World Health Organization, n. 50, p. 251-257, 1974.

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

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.; ALMEIDA, F.G. Natural infection of red howler-monkeys, *Alouatta seniculus straminea*, with *Plasmodium brasilianum*, in the state of Amazonas, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 9, n. 5, p. 359-360, 1967.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; SITONIO, J.G. Estudos sobre malaria de macacos no Estado de Espírito Santo. Revista Brasileira de Biologia, v. 28, p. 531-538, 1968.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; OKUMURA, M.; FERREIRA, M. O. Malaria parasites of Brazilian monkeys. Revista do Instituto de Medicina Tropical, v. 11, p. 71-86. 1969.

DEANE, L.M. Simian malaria survey in Brasil: a brief summary of data obtained in 1964-1971. World Health Organization (WHO), 6p. 1972.

DEANE, L.M.; FERREIRA, M.O.; LEAL, A.; AROUCK, W. e BARROS, J. Malária de macacos no estado do Pará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 13, n. 3, p. 167-170. 1971.

DEANE, L.M.; FERREIRA NETO, J.A. Malária de macacos no estado de Goiás, Brasil: encontro de guaribas, *Alouatta caraya*, infectados com *Plasmodium brasilianum*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 15, n. 3, p. 107-111, 1973.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 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.

DE THOISY, B.; MICHEL, J. C.; VOGEL, I.; VIÉ, J. C. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. *The Journal of Parasitology*, v. 86, n. 5, p. 1035-1040, 2000.

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.

DRUILHE, P.; PUEBLA, R.M.; MILTGEN, F.; PERRIN, L.; GENTILINI, M. Species- and stage-specific antigens in exoerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 33, n. 3, p. 336-34, 1984.

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, J.; DESHPANDE, P.; GUIYEDI, V.; MÉCHERI, S.; FESEL, C.; CAZENAVE, P.A.; MISHRA, G. C.; KOMBILA, M.; PIED, S. Total and functional parasite specific IgE responses in *Plasmodium falciparum*-infected patients exhibiting different clinical status. *Malaria Journal*, v.6, n. 1, p. 1-13, 2007.

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.

ENDESHAW, T.; GEBRE, T.; NGONDI, J.; GRAVES, P.M.; SHARGIE, E.B.; EJIGSEMAHU, Y.; AYELE, B.; YOHANNES, G.; TEFERI, T.; MESSELE, A.; ZERIHUN, M.; GENET, A.; MOSHER, A.W.; EMERSON, P.M.; RICHARDS, F.O. Evaluation of light microscopy and rapid diagnostic test for the detection of malaria under operational field conditions: a household survey in Ethiopia. *Malaria Journal*, v. 7, p. 118, 2008.

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.

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.

FERREIRA NETO, J.A.; DEANE, L.M.; ALMEIDA, F.B. Malaria simiana no estado do Acre, Brasil: encontro de macacos zogue-zogue, *Callicebus moloch cupreus*, infectados com *Plasmodium brasilianum*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 14, n. 4, p. 231-234. 1972.

FONSECA, F. Plasmódio de primata do Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, p. 543-551, 1951.

GUERRANT, R.L.; BLACKWOOD, B.L. Threats to global health and survival; the growing crises of tropical infectious diseases – our “unfinished agenda”. Clinical and Infective Disease, v. 28, n. 5, p. 966-986, 1999.

HALL, C.L.; HAUNES, J.D.; DIGGS, C.L. Culture *P. falciparum* used as antigen in a malaria indirect fluorescent antibody test. American Tropical Medicine and Hygiene, v. 27, p. 849-852, 1978.

HANAHAN, D. DH5 $\alpha$  was derived from *E. coli* DH5. IN: DNA Cloning: A Practical Approach. Glover, D. M. (ed.), v. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia. 1985.

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.

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.

LAL, A.A.; DE LA CRUZ, V.F.; COLLINS, W.E.; CAMPBELL, G.H.; PORCELL, P.M.; MCCUTCHAN, T.F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Journal of Biological Chemistry, v.263, p. 5595-5598, 1988.

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.

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.

LOPEZ-ANTUÑANO, F.J.; SCHMUNIS, G. Diagnostico de malaria. Pan American health Organization, 1998.

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.

MENS, P.; SPIEKER, N.; OMAR, S.; HEIJNEN, M.; SCHALLIG, H.; KAGER, P. A. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, v. 12, n. 2, p. 238–244, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1º ed. 2005. Disponível: <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso: 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/arquivos/pdf/002\\_ma\\_relatorio\\_de\\_situacao.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/002_ma_relatorio_de_situacao.pdf) Acesso: 15 de julho de 2010.

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.

MUTIS, M.C.S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; ALBUQUERQUE, B.C.; COURA, J.R. Malária IN: COURA, J.R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 833-858 2005.

NOEDL, H.; YINGYUEN, K.; LAOBOONCHAI, A.; FUKUDA, M.; SIRICHAISINTHOP, J.; MILLER, R. S. Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 6, p. 1205–1208, 2006.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N. e 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.

ONG, C.W.M.; LEE, S.Y.; KOH, W.H.; OOI, E.; TAMBYAH, P.A. Case report: monkey malaria in humans: a diagnostic dilemma with conflicting laboratory data. *American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 6, p. 927-928, 2009.

OPAS. Organizacion Panamericana de La Salud, OMS. Manual para o diagnostico de la malaria. Washington, 1975.

OZWARA, H.; LANGERMANS, J. A.; MAAMUN, J.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; WEILER, H.; THOMAS, A. W. Experimental infection of the olive baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 2, p. 188-194, 2003.

PERANDIN, F.; MANCA, N.; CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GALATI, L.; RICCI, L.; MEDICI, M. C.; ARCANGELETTI, M. C.; SNOUNOU, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Development of a Real-Time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1214–1219, 2004.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 5, p. 972-978, 2002.

PÖSCHL, B.; WANEESORN, J.; THEKISOE, O.; CHUTIPONGVIVATE, S.; PANAGIOTIS, K. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in Northern Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n. 1, p. 56–60, 2010.

REBÊLO, J.M.M.; SILVA, A.R.; FERREIRA, L.A.; VIEIRA, J.A. *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu-Santa Luzia, pré-Amazônia Maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.2, p. 107-111, 1997.

RIBEIRO, M.C.T.; GONÇALVES, E.G.R.; TAUIL, P.L.; SILVA A.R.. Aspectos epidemiológicos de um foco de malária no município de São Luis, MA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n.3, p. 272-274, 2005.

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.

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 120p. 2001.

SINGH, B. Molecular Methods for diagnosis and Epidemiological studies of Parasitic Infections. *International Journal of Parasitology*, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

SINAN NET. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. 2009. Disponível: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_malaria\\_mes\\_notificacao\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_malaria_mes_notificacao_2009.pdf). Acesso: 09 de fevereiro de 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 polimerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.61, p.315-320, 1993.

SUÁREZ-MUTIS, M.C.; COURA, J.R. Avaliação da confiabilidade da gota espessa em um estudo de campo conduzido em uma área endêmica de malária no Médio Rio Negro, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 5, p. 495-497, 2006.

SULZER, A.J.; WILSON, M. The use of thick-smear in malaria indirect fluorescent antibody test. *Journal of Parasitology*, v. 53, p. 1110-1111. 1967.

SWAN, H.; SLOAN, L.; MUYOMBWE, A.; CHAVALITSEWINKOON-PETMITR, P.; KRUDSOOD, S.; LEOWATTANA, W.; WILAIRATANA, P.; LOOAREESUWAN, S.; ROSENBLATT, J. Evaluation of a Real-Time Polimerase Chain Reaction assay for the diagnosis os malaria in patients from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 5, p. 850–854, 2005.

TARGET, G.A.T. Antibody response to *P. falciparum* malaria: comparison of immunoglobulin concentration antibody titers and titers antigenicity of different asexual stage of the parasite. *Clinical Experimental Immunology*. v. 7, p. 501-517, 1970.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in Continuous culture. *Science* v. 193, p. 673-675, 1976.

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

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.

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.

ZAKERI, S.; NAJAFABADI, S.T.; ZARE, A.; DJADID, N.D. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malaria Journal, v. 1, n.2, p. 1-6, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Situation in 2005.