

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

**A INFECÇÃO MALÁRICA PELO *Plasmodium simium*/*Plasmodium vivax*  
EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DE TRÊS REGIÕES DA MATA ATLÂNTICA  
BRASILEIRA**

por

**Daniela Camargos Costa**

**Belo Horizonte**

**Junho/2014**

**TESE DBCM-CPqRR D. C. COSTA 2014**

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

**A INFECÇÃO MALÁRICA PELO *Plasmodium simium*/*Plasmodium vivax*  
EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DE TRÊS REGIÕES DA MATA ATLÂNTICA  
BRASILEIRA**

por  
**Daniela Camargos Costa**

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

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de  
Brito

Co-orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

Junho/2014

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837i 2014	<p>Costa, Daniela Camargos.</p> <p>A infecção malárica pelo <i>Plasmodium simium/Plasmodium vivax</i> em primatas não humanos de três regiões da Mata Atlântica brasileira/ Malaria infection caused by <i>Plasmodium simium/Plasmodium vivax</i> in non human primates from the brazilian Atlantic Forest/ Daniela Camargos Costa. – Belo Horizonte, 2014.</p> <p>xxv, 156 f: il.; 210 x 297mm.</p> <p>Bibliografia: f.: 167 - 181</p> <p>Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.</p> <p>1. Malária/transmissão 2. <i>Plasmodium vivax</i>/ parasitologia 3. Doenças dos Primatas/parasitologia. I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação) III. Carvalho, Luzia Helena (Co-orientação).</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.936 2</p>
---------------	---

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

**A INFECÇÃO MALÁRICA PELO *Plasmodium simium*/*Plasmodium vivax*  
EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DE TRÊS REGIÕES DA MATA ATLÂNTICA  
BRASILEIRA**

por  
**Daniela Camargos Costa**

Foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Dra. Rosely dos Santos Malafrente

Dra. Daniela Castanheira Bartholomeu

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Dra. Roberta Lima Caldeira

Suplente: Dra. Larissa Lopes Silva Scholte

Tese defendida e aprovada em: 27/06/2014

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou (IRR), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, co-orientação da Dra. Luzia Helena Carvalho e com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto René Rachou (IRR).

*Não basta a pesquisa sem maravilhar-se, ..., o trabalho sem a piedade, a ciência sem a caridade, a inteligência sem a humildade, o estudo sem a graça”.*

**São Boaventura**

(1221-1274)

*“Pelo ronco que brota da gaita  
O bugio se tornou conhecido  
Bicho à toa, crioulo do pampa  
Que traz na estampa um jeitão divertido  
No balanço maroto do taita  
O gaúcho inventou esta dança  
E o gaiteiro se espicha e se encolhe  
E na manha do fole  
A moçada balança  
Quando ronca lá no mato  
O bugio “tá com saudade  
Mas quando roncar a gaita  
Só não dança quem não sabe”  
**Raquel Perret***

À minha mãe, pelo imensurável  
amor e suporte.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me concedido força, graça e inspiração para conduzir com êxito mais esta etapa de minha vida acadêmica.

À minha mãe, pelo apoio e força imprescindíveis para a concretização dessa tese.

À minha família, que torna meus dias mais felizes e cheios de paz, pelo suporte imensurável.

Ao meu noivo Gustavo, por todo o carinho, paciência e amor sincero, que fez esta jornada sem sombra de dúvidas muito mais leve.

Às minhas orientadoras Dra. Cristiana e Dra. Luzia, pela oportunidade, credibilidade e crescimento que me proporcionaram ao longo destes seis anos no Laboratório de Malária.

À toda a equipe do LAMAL: Ana Luíza, Aracele, Armando, Bárbara, Caroline, Daniela, Denise, Fernanda, Flávia Alessandra, Flávia Carolina, Flora, Gabriela, Heverton, Jéssica, Letícia, Luciano, Marina, Michaelis, Ricardo, Sarah e Taís pelo convívio agradável. A Alice, Geraldo, Daniela e Stefanie pelo apoio constante, cruciais para o bom andamento deste trabalho. Aos colaboradores Flávia Alessandra, Flávia Carolina, Taís Nobrega, Flora Kano e em especial minha aluna de Iniciação Científica Gabriela Assis por toda dedicação, empenho e amizade.

Às grandes amigas que a pesquisa me proporcionou Flávia Alessandra, Letícia e Shara, por todo o apoio, carinho e inspiração.

Aos professores da pós-graduação do CPqRR e do departamento de genética da UFMG pelos ensinamentos imprescindíveis para minha formação.

Aos colaboradores externos Júlio, Zelinda, Walfrido, Vanessa, e a toda equipe do CEPESBI pelos momentos fantásticos com os animais do campo e do cativeiro.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XIV
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	XXI
<b>RESUMO</b> .....	XXIV
<b>ABSTRACT</b> .....	XXV
<b>1INTRODUÇÃO</b> .....	26
1.1 Malária no mundo e no Brasil.....	26
1.2 Malária em primatas não humanos (PNHs).....	30
1.3 Malária extra-Amazônica: a “malária de bromélias”.....	32
1.4 Ciclo biológico dos parasitos da malária.....	44
1.4.1 Invasão do eritrócito pelo <i>P. vivax</i> .....	48
<b>2JUSTIFICATIVA</b> .....	53
<b>3OBJETIVOS</b> .....	55
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos Específicos.....	55
<b>4MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
4.1. Descrição da área de colheita em Santa Catarina.....	56
4.2. Descrição da área de colheita no Paraná e no Mato Grosso do Sul.....	62
4.3. Colheita de material biológico nos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul.....	65
4.3.1 Coleta de material e exames realizados em um dos animais do CEPESBI sintomático com suspeita para malária.....	66
4.4 Extrações de DNA.....	66

---

4.4.1 Extração a partir de sangue total .....	66
4.4.2 Extração de DNA mediante sangue total em papel de filtro.....	67
4.4.3 PCR de citocromo B de mamíferos.....	68
4.5. Diagnóstico específico de plasmódios.....	69
4.5.1 Microscopia óptica.....	69
4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	69
4.5.2.1 Nested-PCR.....	69
4.5.2.2 PCR em Tempo Real.....	70
4.5.2.3 Amplificação de outros alvos moleculares.....	70
4.5.2.4 Amplificação do gene DARC de primatas neotropicais.....	74
4.5.2.5 Visualização dos fragmentos por gel de agarose.....	74
4.5.2.6 Controles das reações de PCR e iniciadores utilizados.....	75
4.6 Amplificação e Genotipagem dos marcadores moleculares.....	75
4.7 Sequenciamento de DNA.....	78
4.7.1 Purificação dos produtos de PCR.....	78
4.7.2 Reação de Sequenciamento.....	78
4.7.3 Reação de precipitação.....	79
4.8 Análise <i>in silico</i> das sequências de DNA.....	79
4.8.1 Análise da diversidade genética.....	80
4.8.2 Visualização das estruturas proteicas 3-D.....	81
4.8.3 Análises Filogenéticas.....	81
4.8.4 Sequências de DNA utilizadas.....	82
4.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra antígenos de <i>P. vivax</i> em soros de primatas de Mata Atlântica.....	83

4.10 Ensaio funcional de adesão e inibição da interação ligante-receptor.....	84
4.10.1 Ensaio de adesão entre a PvDBP e DARC de <i>Alouatta clamitans</i> .....	84
4.10.2 Ensaio de inibição da interação entre a PvDBP e DARC de <i>Alouatta clamitans</i> .....	85
<b>5 RESULTADOS</b> .....	86
5.1 Caracterização da infecção malárica em bugio sintomático.....	86
5.2 Levantamento de infecção malárica em primatas neotropicais da Mata Atlântica.....	90
5.3 Análise de marcadores moleculares em plasmódios simianos.....	93
5.4 Sequenciamento das amostras positivas e análises <i>in silico</i> .....	95
5.4.1 <i>dbpII</i> .....	95
5.4.2 DARC.....	103
5.4.3 MSP1 blocos 2 e 10.....	106
5.4.4 Subunidade menor 18S do RNA ribossomal.....	112
5.5 Ensaio Sorológicos.....	117
5.6 Ensaio de adesão e inibição da interação ligante-receptor.....	119
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	122
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	139
<b>8 ANEXOS</b> .....	141
8.1 ANEXO I Aprovação SISBIO 2011.....	141
8.2 ANEXO II Aprovação SISBIO 2013.....	144
8.3 ANEXO III Aprovação Comitê de Ética FURB.....	147
8.4 ANEXO IV Aprovação Comitê de Ética UFPR .....	148
8.5 ANEXO V Número de acesso sequências DBP.....	149
8.6 ANEXO VI Número de acesso sequências DARC-1.....	150

8.7 ANEXO VII Número de acesso sequências DARC-2.....	151
8.8 ANEXO VIII Número de acesso sequências MSP-1 blocos 2 e 10.....	152
8.9 ANEXO IX Número de acesso sequências 18S.....	153
8.10 ANEXO X Capítulo de livro aceito para publicação.....	154
8.11 ANEXO XI Carta de aceite da publicação.....	155
8.12 ANEXO XII Artigo aceito para publicação.....	156
8.13 ANEXO XII Artigos publicados durante a tese.....	166
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>167</b>

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA DA CAPA** Bugios de vida livre de Indaial – Santa Catarina, FONTE: Amaury Junglos, 2011..... I

**FIGURA 1** Distribuição da malária no mundo e estágios de eliminação segundo estratégias de controle. .... 27

**FIGURA 2** Distribuição sobreposta dos reservatórios simianos e vetores anofelinos na Ásia com os casos humanos descritos de malária simiana. Distribuição de anofelinos do grupo *Leucosphyrus* e vários reservatórios simianos naturalmente infectados pelo *P. knowlesi* na Ásia. .... 29

**FIGURA 3** Bioma de Mata Atlântica. **A.** Mapa do Brasil representando o domínio do bioma de Mata Atlântica e sua extensão compara aos demais biomas. **B.** Mata do Brasil apresentando o domínio da Mata Atlântica e o remanescente da mata (verde)..... 34

**FIGURA 4** Distribuição geográfica dos gêneros *Alouatta* e *Brachyteles* na América do Sul e espécies de primatas suscetíveis ao *P. simium*. **A.** Distribuição do gênero *Alouatta*. **B.** Distribuição do gênero *Brachyteles*..... 41

**FIGURA 5** Distribuição sobreposta dos reservatórios simianos e vetores anofelinos na América do Sul e casos humanos de malária simiana já descritos no Brasil. Distribuição de anofelinos e vários reservatórios simianos naturalmente infectados pelo *P. simium* e *P. brasilianum* na América do Sul..... 44

**FIGURA 6** Desenho esquemático do ciclo de vida do *Plasmodium vivax* no hospedeiro humano..... 47

**FIGURA 7** Esquema dos domínios estruturais da PvDBP, sendo as seis primeiras regiões domínios extracelulares e a última região um domínio transmembrana. Em destaque o domínio II, região do ligante localizada entre as cisteínas 4 e 7.....50

- FIGURA 8** Esquema da proteína DARC com sete  $\alpha$  hélices. Os primeiros sete aminoácidos N-terminais pertencem ao primeiro éxon e os aminoácidos restantes pertencem ao segundo éxon.....51
- FIGURA 9** Municípios onde foram capturados os primatas neotropicais do estudo.....56
- FIGURA 10** Área de colheita biológica em Santa Catarina. Em A, mapa do Estado de Santa Catarina, com a projeção do município de Indaial e as coordenadas do CEPESBI. Em B e C, foto do município de Indaial, mostrando a localização do Centro.....58
- FIGURA 11** *Alouatta clamitans* de cativeiro e de vida livre do município de Indaial, SC. **A.** Animais do cativeiro CEPESBI. **B.** Animais de vida livre do Morro Geisler. **C.** Animal resgatado vítima de atropelamento.....60
- Figura 12** Bugio ruivo com suspeita de infecção malárica (BL10 - Coquinho). **A:** foto do animal infectado. **B:** esfregaços sanguíneos a partir do sangue deste animal, com formas sugestivas de *Plasmodium* spp.....86
- FIGURA 13** Resultados da Nested PCR e PCR em Tempo Real de *Alouatta clamitans* (BL10) sintomático para malária (*P. simium*/*P. vivax*). **A:** Nested-PCR para plasmódio. **B:** Resultado da PCR em Tempo Real.....89
- FIGURA 14** Resultados da Nested PCR e PCR em Tempo Real para as amostras de bugios ruivos de Santa Catarina positivas para *P. simium*/*P. vivax*.....91
- FIGURA 15** Local onde cada um dos *Alouatta clamitans* positivos para *P. simium* foi capturado no estado de Santa Catarina (dados de GPS).....92
- FIGURA 16** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit dos haplótipos da PsDBP sequenciadas neste estudo.....96

**FIGURA 17** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de 19 haplótipos representativos da PvDBP no mundo e de oito amostras de *P. simium* sequenciadas neste estudo. As setas azuis representam SNPs já identificados em amostras de *P. vivax* no mundo. As setas pretas representam os polimorfismos exclusivos de *P. simium*, nas posições 1113 A<T, 1153 A<T e 1233 A<C. Sendo este último, presente em todas as amostras de *P. simium*.....97

**FIGURA 18** Topologia da árvore filogenética da Duffy Binding Protein dos haplótipos de *P. simium* e *P. vivax*, e sequências de *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*, gerada por meio do método de Máxima Verossimilhança, no software MEGA v.6.0.....101

**Figura 19** Estrutura tridimensional da Duffy Binding Protein de *P. simium*. Em azul piscina está representado o domínio 1 da proteína, em azul escuro o domínio 2 e em azul claro o domínio 3. Em amarelo estão caracterizados os resíduos de contato com DARC. Em branco estão representados os polimorfismos de *P. simium* e em vermelho os polimorfismos em *P. vivax*.....102

**Figura 20** Alinhamento múltiplo de uma sequência representativa de um fragmento de DARC de *Alouatta clamitans* e outra de *Homo sapiens*.....103

**FIGURA 21** Alinhamento múltiplo de uma sequência representativa de um fragmento de DARC de *Alouatta clamitans* e outra de *Homo sapiens* (posição 235 a 546 de *H. sapiens*, número de acesso JN251915.1). As substituições não sinônimas estão indicadas por estrelas.....104

**FIGURA 22** Topologia da árvore filogenética de DARC-1 de diferentes amostras de primatas a partir do método de Máxima Verossimilhança, gerada pelo software MEGA.....105

**FIGURA 23** Topologia da árvore filogenética de DARC-2 de diferentes amostras de primatas a partir do método de Máxima Verossimilhança, gerada pelo software MEGA.....106

**FIGURA 24** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit do haplótipo da MSP-1 bloco 02 de *P. simium* e 15 haplótipos da MSP-1 de *P. vivax*.....108

**FIGURA 25** Topologia da árvore filogenética da MSP-1 bloco 02 com o haplótipo único de *P. simium*, 15 haplótipos de *P. vivax*, uma sequência de *P. knowlesi* e outra de *P. cynomolgi* a partir do método de Máxima Verossimilhança, gerada pelo software MEGA.....109

**FIGURA 26** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de cinco haplótipos da MSP-1 bloco 10 de *P. simium*.....110

**FIGURA 27** Topologia da árvore filogenética da MSP-1 bloco 10 com cinco haplótipos de *P. simium*, 15 haplótipos de *P. vivax*, uma sequência de *P. knowlesi* e outra de *P. cynomolgi* a partir do método de Máxima Verossimilhança, gerada pelo software MEGA.....111

**FIGURA 28** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de onze haplótipos do 18S de *P. vivax* e o haplótipo único de *P. simium*.....113

**FIGURA 29** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de onze haplótipos do 18S de *P. vivax*, do haplótipo único de *P. simium*. E as espécies *P. brasilianum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum*.....115

**FIGURA 30** Topologia da árvore filogenética do 18S com um haplótipo único de *P. simium*, onze haplótipos de *P. vivax* e uma sequência das espécies *P. knowlesi*, *P. brasilianum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum* a partir do método de Máxima Verossimilhança, gerada pelo software MEGA.....116

**FIGURA 31** Índice de reatividade dos soros de primatas não humanos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* MSP-1<sub>19</sub>, AMA-1 e DBP<sub>II</sub> de Santa Catarina.....118

**FIGURA 32** Índice de reatividade dos soros de primatas não humanos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* MSP-1<sub>19</sub>, AMA-1 e DBP<sub>II</sub> do Paraná e Mato Grosso do Sul.....118

**FIGURA 33** Interação específica entre a PvDBP<sub>II</sub> expressa na célula COS7 (fluorescência) e a proteína DARC de eritrócitos de primatas não-humanos aderidos à PvDBP<sub>II</sub> formando uma roseta (amostra BL10).....119

**FIGURA 34** Representação dos controles positivos e negativos utilizados em todos os ensaios de ligação. **A:** Controle positivo (O<sup>+</sup>/DARC<sup>+</sup>). A seta branca indica uma roseta formada pela interação entre DARC dos eritrócitos que se ligaram à PvDBP<sub>II</sub> expressa na célula COS7 (fluorescente). **B:** Controle negativo, (O<sup>+</sup>/DARC<sup>-</sup>), onde não há formação de rosetas.....120

**FIGURA 35** Representação do ensaio de ligação de oito soros de bugios demonstrando o percentual de inibição da ligação de DARC, presente nas hemácias, à PvDBP, expressa nas células COS7. Os soros dos bugios foram separados em grupos: 1 (PCR + e ELISA +: vermelho), 2 (PCR – e ELISA +: verde) e 3 (PCR- e ELISA -: azul). ★BL10 - animal que apresentou sintomas clínicos de malária.....121

**FIGURA 36** Percentual de inibição da interação entre PvDBP e DARC em três diferentes diluições dos soros dos animais BL37 e BL69.....121

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Espécies de plasmódios descritas em PNHs do Velho Mundo e do Novo Mundo, seus respectivos hospedeiros naturais e distribuição geográfica. **Fonte:** Adaptado de Deane *et al.* 1992; Gysin, 1998; Leclerc *et al.*, 2004; Cormier, 2011.....31
- TABELA 2** Casos autóctones de malária registrados como *P. vivax* em regiões não endêmicas, no período de 2010 a 2013.....33
- TABELA 3** Espécies de plasmódio que infectam naturalmente PNHs do Velho Mundo e do Novo Mundo e as espécies que parasitam humanos com as quais apresentam similaridade morfológica.....40
- TABELA 4** Descrição das amostras obtidas dos animais de cativeiro do CEPESBI-Indaial (SC).....61
- TABELA 5** Descrição das amostras obtidas dos bugios de vida livre capturados no estado de Santa Catarina.....62
- TABELA 6** Número da amostra, espécie, faixa sexo etária e data da colheita dos primatas de vida livre capturados nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul.....64
- TABELA 7** Variantes da PCR, alvos, sequências dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e referências das reações de PCR utilizadas no estudo para amplificação do DNA do parasito e dos primatas.....71
- TABELA 8** Características dos Microssatélites utilizados no estudo padronizados para *P. vivax*, segundo Rezende e colaboradores (2010).....76
- TABELA 9** Descrição dos iniciadores e condições de amplificação dos microssatélites.....77

**TABELA 10** Valores hematológicos e bioquímicos referentes à amostra do bugio ruivo (*A. clamitans*) do cativeiro CEPESBI com suspeita de infecção malárica.....87

**TABELA 11** Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em primatas não humanos de três regiões da Mata Atlântica brasileira.....93

**TABELA 12** Alelos predominantes encontrados nas nove amostras positivas para *P. simium* através da genotipagem dos marcadores moleculares.....94

**TABELA 13** Diversidade do gene codificador da DP de isolados de *P. simium*.....96

**TABELA 14** Análise comparativa da diversidade genética da Duffy Binding Protein de *P. simium*, *P. vivax*, *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*.....99

**TABELA 15** Resultado do ELISA para as proteínas de *P. vivax* MSP1<sub>19</sub>, AMA I e DBPII em soros de primatas não humanos de Santa Catarina e do Paraná. Acrescentar IR, média e desvios.....117

**TABELA 16** Caracterização das amostras utilizadas no ensaio de inibição da interação DBP/DARC.....120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**aa** – Aminoácido

**AMA-1** – Antígeno 1 de membrana apical (*Apical membrane antigen 1*)

**CEPESBI** - Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial

**CEUA** – Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CSP** – Proteína circunsporozoíta

**DARC** – Antígeno *Duffy*/receptor para quimiocinas (*Duffy antigen/receptor for chemokines*)

**DBL<sub>1</sub>** Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC (*Duffy binding like domain*)

**dbp** – Gene que codifica a proteína que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC

**DBP** – Proteína que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC (*Duffy binding protein*)

**DBP<sub>II</sub>** – Domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC (*Duffy binding protein II*)

**dbpII** – Gene que codifica o domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**EBA-175** – Antígeno de 175 kDa que se liga a eritrócito (*175 kDa erythrocyte binding antigen*)

**EBPs** – Família de proteínas que se ligam aos eritrócitos e apresentam um domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC (*Duffy binding like domain Erythrocyte binding protein*)

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**ES** – Silenciado na linhagem eritróide (*erythroid silent*)

**FEPASA** - Ferrovias Paulistas S.A.

**F<sub>ST</sub>** - Índice de diversidade genética

**FURB** - Fundação Universidade Regional de Blumenau

**FUNASA** – Fundação Nacional de Saúde

**FY** – Locus do antígeno *Duffy*/receptor para quimiocinas (DARC)

**FY\*A**, **FY\*B** – Alelos DARC que codificam os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, respectivamente

**FY\*A<sup>ES</sup>**, **FY\*B<sup>ES</sup>** – Alelos DARC silenciados na linhagem eritróide

**FY\*X** – Alelo DARC que codifica uma expressão fraca ou qualitativamente reduzida do antígeno Fy<sup>b</sup>

**Fy<sup>a</sup>**, **Fy<sup>b</sup>** – Antígenos a e b do grupo sanguíneo DARC, respectivamente

**H** – Número de haplótipos

**Hd** – Diversidade haplotípica

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**MS** – estado do Mato Grosso do Sul

**MSP-1** – Proteína 1 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 1*)

**Nested-PCR** – Reação em cadeia da polimerase com dois passos de amplificação

**Nt** - nucleotídeos

**pb** – par de bases

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**PkαDBP** – Proteína α de *P. knowlesi* que se liga ao antígeno *Duffy*/DARC (*P. knowlesi Duffy binding protein α*)

**PNHs** – primatas não humanos

**PR** – estado do Paraná

**PsDBP** – Proteína de *P. simium* que se liga ao antígeno *Duffy/DARC* (*P. vivax Duffy binding protein*)

**PsDBP<sub>II</sub>** – Domínio de ligação (região II) da proteína de *P. simium* que se liga ao antígeno *Duffy/DARC* (*P. vivax Duffy binding protein II*)

**PvDBP** – Proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno *Duffy/DARC* (*P. vivax Duffy binding protein*)

**PvDBP<sub>II</sub>** – Domínio de ligação (região II) da proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno *Duffy/DARC* (*P. vivax Duffy binding protein II*)

**RBC(s)** – Célula(s) sanguínea(s) vermelha(s) (*Red blood cell*)

**Real-time PCR** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SC** – estado de Santa Catarina

**SNP(s)**- Polimorfismo(s) de base única (*Single nucleotide polymorphism*)

**SUCEN** – Superintendência de Controle de Endemias

**UF** – Unidade Federativa

**UFPR** – Universidade Federal do Paraná

**$\pi$** - Diversidade nucleotídica

## RESUMO

No Brasil, os casos de malária humana concentram-se na região amazônica. Entretanto, casos autóctones da doença têm sido relatados em diferentes regiões de Mata Atlântica. Sugere-se que a manutenção destes casos envolva a presença de macacos infectados. Nas regiões sul e sudeste do país circula o parasito de primatas *Plasmodium simium*, semelhante ao parasito de humanos *P. vivax*. No entanto, pouco se conhece sobre o parasito simiano e a sua proximidade morfológica, imunológica e genética com o *P. vivax* dificulta sua caracterização. Diante da necessidade de uma melhor compreensão da malária simiana, propôs-se neste trabalho realizar um levantamento da doença do ponto de vista clínico, molecular e imunológico em primatas de Mata Atlântica, dos estados Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul. Em SC, foi observada uma taxa de infecção malárica pelo PCR de 35% em animais de vida livre e 4% em animais de cativeiro. Todos os animais do PR e MS foram negativos. Entretanto, em todos os estados foi identificado por meio do ELISA, uma reatividade de anticorpos contra as proteínas recombinantes PvDBP<sub>II</sub>, PvMSP-1<sub>19</sub> e PvAMA-1. Ainda, anticorpos presentes no soro de bugios foram capazes de bloquear a interação PvDBP-DARC, com uma relação positiva entre a reatividade no ELISA e presença de anticorpos bloqueadores. Além disso, a interação específica PvDBP-DARC em amostras de bugios ruivos sugere que o parasito *P. simium* possui uma proteína ortóloga a PvDBP e dessa forma, compartilhe a mesma via de invasão que o *P. vivax*. A análise de microsatélites demonstrou alelos novos e exclusivos, trazendo perspectivas para a diferenciação das populações do parasito. Através da análise da diversidade genética das sequências obtidas de *P. simium* foi possível caracterizar polimorfismos conservados, sendo alguns deles nunca descritos em *P. vivax*. Contudo, apesar destes polimorfismos, a reconstrução da filogenia baseada nos genes DBP, MSP-1 e 18S não permitiu a separação das espécies, o que reforça a proximidade genética entre os parasitos e aponta para uma transferência de hospedeiros recente. Finalmente, a presença de símios infectados em áreas de Mata Atlântica sugere que os primatas possam atuar como reservatórios da doença, uma vez que casos humanos já foram descritos nas cidades estudadas.

**ABSTRACT**

In Brazil, human malaria is concentrated in the Amazon region. However, autochthonous cases of the disease have been reported in the Atlantic Forest region. It has been hypothesized that these cases occur due to accidental transmission from infected primates. *Plasmodium simium* is a parasite that circulates amongst primates in the southern and southeastern regions of Brazil. Critically, due to morphological, immunological and genetic similarities, it has not been possible to differentiate them. Faced with the need to obtain a deeper understanding of the relationship between human and simian *Plasmodia*, in this study we conducted a survey of plasmodia infection in the primates of regions of rainforest in Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states. In SC we identified plasmodia infection in 35% of wild animals, and in 4% of animals in captivity. However, for animals from all states, we successfully identified antibodies against the recombinant proteins PvDBP<sub>II</sub>, PvAMA-1 and PvMSP1<sub>19</sub> using ELISA. Moreover, antibodies in the serum of red howler monkeys blocked the interaction of PvDBP and its receptor DARC, with a correlation between a positive ELISA result and the presence of blocking antibodies. Furthermore, the specific interaction between DARC-PvDBP suggested that the simian parasite protein, an ortholog of PvDBP, was able to bind to the DARC receptor and thus, probably shares the same route of invasion as the *P. vivax* merozoite in the human reticulocyte. The genotyping analysis of the simian parasites uncovered new and unique alleles for each host, furthering prospects for differentiation between populations of the human and simian parasites. By analyzing the genetic diversity between the *P. vivax* and *P. simium* variants of this protein and also MSP-1, it was possible to characterize conserved polymorphisms in *P. simium*, some of them never described for *P. vivax*. However, despite these polymorphisms, the reconstruction of phylogeny based on DBP, MSP-1 and 18S genes did not allow for separation between the two species, confirming the high degree of genetic similarity between the parasites and also suggesting a recent host transfer, as previously hypothesized. Finally, the presence of infected primates in the Atlantic Forest highlights the likelihood that these animals could act as a reservoir for malaria, as human cases have been reported in the cities studied during this work.

## 1 INTRODUÇÃO

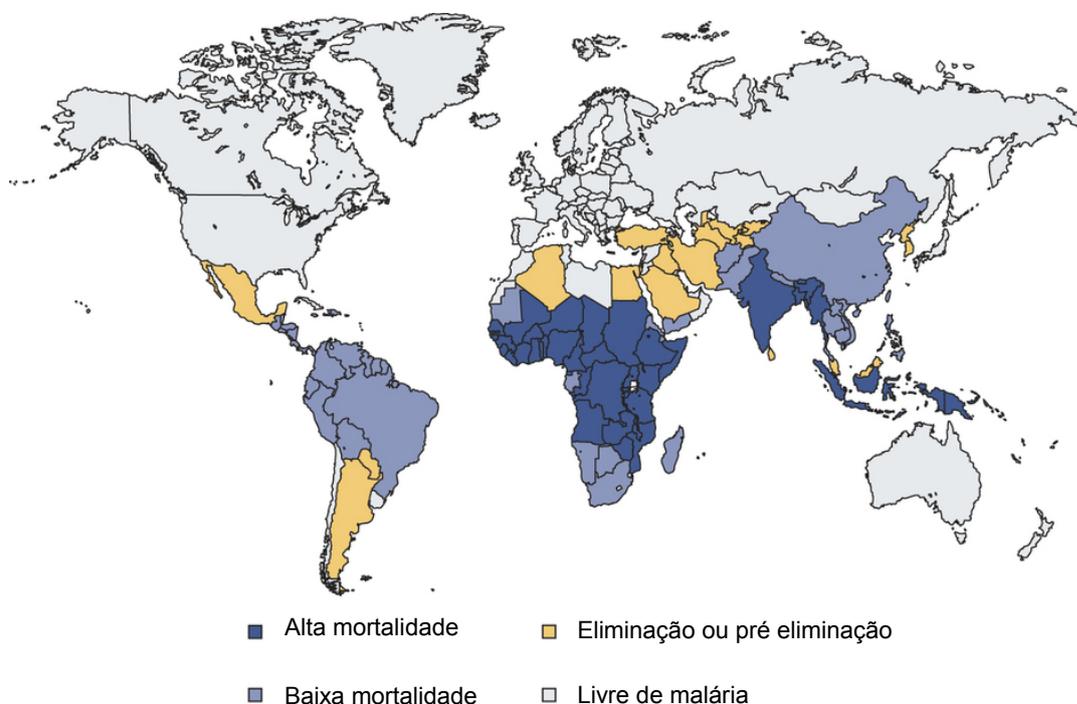
### 1.1 Malária no Mundo e no Brasil

A malária é a mais importante doença parasitária do planeta, atingindo 108 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo habitadas por cerca de três bilhões de pessoas. Somente no ano de 2010, foram registrados 216 milhões de casos e 655.000 mortes (WHO, 2011). Cerca de 40% da população mundial encontra-se em áreas de risco de transmissão, particularmente nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. A doença apresenta, além da alta mortalidade, uma intensa morbidade, ocasionando grandes perdas sociais e econômicas (Alonso & Tanner, 2013; Hawkes & Kain, 2007).

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida a seus hospedeiros vertebrados de forma generalizada, por mosquitos culicídeos. Existem mais de cem espécies de plasmódios que parasitam desde répteis e aves a mamíferos. Todos os plasmódios são transmitidos por insetos da Ordem Diptera, família Culicidae, exceto o *Plasmodium mexicanum* (Thompson and Huff, 1944), parasito natural de répteis, que tem como inseto vetor os flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) (Ayala & Lee, 1970). Cada espécie de parasito interage de forma específica com seus respectivos hospedeiros vertebrados e invertebrados em um processo refinado de coevolução (Ollomo *et al.*, 2009). As espécies que habitualmente parasitam o homem são: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881) e *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), sendo este último restrito ao continente africano, regiões da Ásia e Ilhas do Pacífico (Greenwood *et al.*, 2005).

Cerca de 90% de todos os casos descritos de malária humana concentram-se na África subsaariana, também responsável pelo alto número de mortes, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade e grávidas. Estima-se que 200.000 pessoas morram por dia na África em decorrência da malária (Sachs & malaney, 2002; WHO, 2011). Os demais casos da doença estão distribuídos nas Américas do Sul e Central, sudeste

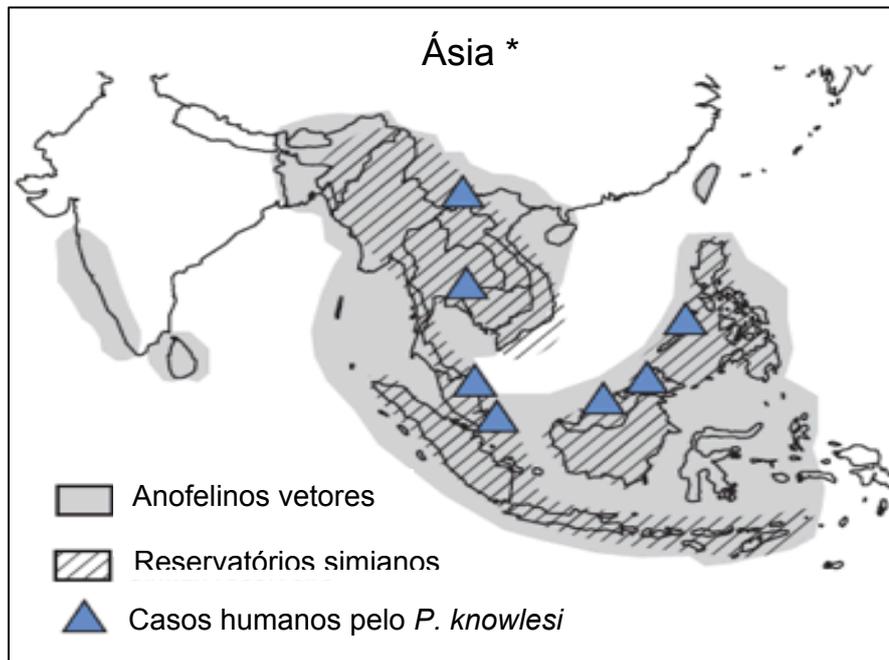
asiático e ilhas da Oceania (Figura 1). A alta mortalidade da doença na África está condicionada a espécie do parasito mais prevalente na região, o *P. falciparum*, um parasito associado às formas mais graves da doença; juntamente com a presença do vetor *Anopheles gambiae*, inseto transmissor de maior competência vetorial para a malária. Estes fatores se somam a uma realidade desumana de completa ausência de infraestrutura em saúde, descontinuidade das medidas de controle e a não disponibilização gratuita de drogas antimaláricas (Collins & Jeffery, 2003).



**Figura 1.** Distribuição da malária no mundo e estágios de eliminação segundo estratégias de controle. Fonte: modificado de Alonso & Tanner, 2013.

Estudos recentes no continente asiático têm levantado novas possibilidades sobre a epidemiologia da malária. Infecções em humanos causadas pelo *Plasmodium knowlesi*, um parasito que infecta naturalmente macacos do Velho Mundo, reforçam que a proximidade do homem com regiões de mata possibilita com que doenças que circulam naturalmente entre os animais em caráter silvestre, circulem também entre os humanos (Chin *et al.*, 1965; White, 2008; Galinski & Barnwell, 2009). A malária acidental causada

pelo *P. knowlesi* no homem é altamente virulenta, tendo muitas vezes curso fatal. Já em seus hospedeiros naturais, *Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina*, *Presbytis melalophos* e *Trachypithecus obscuras*, a infecção é branda e crônica, o que sugere certa especificidade e um processo ajustado de coevolução da espécie de plasmódio com seus hospedeiros naturais (Galinski & Barnwell, 2009; Moyes *et al.*, 2014). Casos humanos de malária pelo *P. knowlesi* já foram relatados na Malásia (Vythilingam *et al.*, 2008; Bronner *et al.*, 2009), Filipinas (Luchavez *et al.*, 2008), Myanmar (Zhu *et al.*, 2006), Tailândia (Jongwutiwes *et al.*, 2011), Singapura (Ng *et al.*, 2008) e Vietnã (Van den Eede *et al.*, 2009). No entanto, assumir que o *P. knowlesi* seja a quinta espécie causadora de malária em humanos ainda é considerado precoce. Embora tenham sido descritos casos de infecção grave em humanos onde os macacos atuaram como reservatórios da doença, ainda não há relatos de circulação do parasito através da sequência homem-anofelino-homem (Yamasaki *et al.* 2011). Contudo, essa questão precisa ser mais bem investigada, uma vez que casos de malária knowlesi e também de outras malárias simianas são completamente passíveis de disseminação em larga escala, uma vez que os hospedeiros simianos coabitam com os anofelinos vetores (Figura 2). Além disso, o parasito e seus hospedeiros podem se adequar ao longo da evolução de maneira que o homem seja incluído como hospedeiro/reservatório da doença, além do símio.



**Figura 2.** Distribuição sobreposta dos reservatórios simianos e vetores anofelinos na Ásia, com os casos humanos descritos de malária simiana. Distribuição de anofelinos do grupo *Leucosphyrus* e vários reservatórios simianos naturalmente infectados pelo *P. knowlesi* na Ásia. Fonte: modificado de Coatney *et al.*, 1971 e CDC, 2008.

No Brasil, a malária é um dos principais problemas de saúde pública, sendo registrados anualmente em torno de 300.000 casos (SVS, 2009). Apesar do principal mosquito vetor da malária, o *Anopheles darlingi*, estar presente em 80% do território nacional (Tauli & Daniel-Ribeiro, 1998), a grande maioria dos casos da doença (99,8%) encontra-se restrita à região da Amazônia legal. A principal espécie responsável pela malária no Brasil é o *P. vivax* (84%), seguida pelo *P. falciparum* (16%) e uma reduzida porcentagem causada pelo *P. malariae* (<0,1%) (SVS, 2009). Apesar do *P. vivax* não estar associado à alta mortalidade como o *P. falciparum* (Hemmer *et al.*, 2006), estudos recentes tem questionado o paradigma de que seja uma espécie benigna, pois casos de malária grave por *P. vivax* têm sido descritos em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil, com uma frequência cada vez maior (Phoas *et al.*, 2006; Lacerda, 2007; Genton *et al.*, 2008; Rodriguez-Morales *et al.*, 2009; Alexandre *et al.*, 2010).

## 1.2 Malária em primatas não humanos (PNHs)

O gênero *Plasmodium* compreende protozoários adaptados, capazes de infectar todos os grupos de vertebrados terrestres, incluindo os primatas. Tamanha adaptação reflete uma longa e antiga jornada evolutiva que envolve todos os componentes do ciclo, desde hospedeiros vertebrados, a invertebrados, bem como o próprio parasito. Além disso, este gênero ilustra uma adaptação de sucesso parasitário, tendo em vista o ciclo complexo, envolvendo sua sobrevivência e multiplicação em hospedeiros tão díspares, o que depende conjuntamente da combinação de fatores bióticos e abióticos bem ajustados (Coatney *et al.*, 1971; Nishimoto *et al.*, 2008).

Dentre as espécies de primatas não humanos descritas, um vasto número é altamente suscetível à infecção malárica no Velho Mundo e em uma menor proporção no Novo Mundo. Em um levantamento recente realizado por Cormier (2010), foram relatadas 65 espécies de primatas naturalmente vulneráveis à infecção pelos plasmódios. Com relação aos parasitos, já foram descritas 28 espécies de plasmódio capazes de infectar PNHs. Destas, três infectam chimpanzés e gorilas na África Central e do Oeste, duas capazes de infectar orangotangos na Indonésia e Malásia, quatro parasitam gibões no sudeste asiático, onze infectam macacos do Velho Mundo na África e Ásia, seis parasitam lêmures em Madagascar e apenas duas parasitam macacos do Novo Mundo das famílias Cebidae e Atelidae na América do Sul (Leclerc *et al.*, 2004; Gysin, 1998; Deane *et al.*, 1992) (Tabela 1). Estudos que envolvam os mais variados aspectos da malária simiana no Brasil e no mundo são ainda escassos, o que sugere a possibilidade de um número ainda maior de espécies de parasito e também de hospedeiros simianos suscetíveis.

**Tabela 1.** Espécies de plasmódios descritas em primatas não humanos do Velho Mundo e do Novo Mundo, seus respectivos hospedeiros naturais e distribuição geográfica.

LOCAL	GRUPO	ESPÉCIE	PRIMATAS NÃO HUMANOS
África central, sul e sudeste da Ásia	<b>Macacos do Velho Mundo</b>	<i>Plasmodium coatneyi</i>	<i>Macaca fascicularis</i> (Malásia e Filipinas)
		<i>Plasmodium cynomolgi</i>	<i>Macaca</i> spp., <i>Presbytis cristatus</i> , <i>Prebytis entellus</i> (sudeste da Ásia)
		<i>Plasmodium fieldi</i>	<i>Macaca nemestrina</i> (Malásia)
		<i>Plasmodium fragile</i>	<i>Macaca sinica</i> , <i>Macaca radiata</i> (Sri Lanka)
		<i>Plasmodium gonderi</i>	<i>Cercocebus</i> spp. , <i>Mandrillus leucophaeus</i> (Congo e Camarões)
		<i>Plasmodium inui</i>	<i>Cynopithecus Níger</i> , <i>Macaca</i> spp., <i>P. cristatus</i> ., <i>Presbytis obscurus</i> (sudeste da Ásia)
		<i>Plasmodium knowlesi</i>	<i>M. fascicularis</i> , <i>M. nemestrina</i> , <i>Presbytis malalophus</i> (sudeste da Ásia)
		<i>Plasmodium shortti</i>	<i>M. radiata</i> (sul da Índia)
		<i>Plasmodium simiovale</i>	<i>M. sinica</i> (Sri Lanka)
		<i>Plasmodium georgesio</i>	<i>Cercocebus albigena</i> , <i>Cercocebus galeritus</i> (Quênia)
<i>Plasmodium petersi</i>	<i>C. albigena</i> (Uganda)		
África central e oeste	<b>Macacos do Velho Mundo: Chimpanzés e Gorilas</b>	<i>Plasmodium reichenowi</i>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorila gorila</i>
		<i>Plasmodium rodhaini</i>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorila gorila</i>
		<i>Plasmodium schwetzi</i>	
Indonésia e Malásia	<b>Macacos do Velho Mundo: Orangotangos</b>	<i>Plasmodium pitheci</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
		<i>Plasmodium silvaticum</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
Sudeste da Ásia	<b>Macacos do Velho Mundo: Gibões</b>	<i>Plasmodium eylesi</i>	<i>Hylobates lar</i>
		<i>Plasmodium jefferyi</i>	<i>Hylobates lar</i> , <i>Hylobates moloch</i>
		<i>Plasmodium youngi</i>	
		<i>Plasmodium hylobati</i>	
Madagascar	<b>Macacos do Velho Mundo: Lêmures</b>	<i>Plasmodium foleyi</i>	<i>Lemur fulvus fulvus</i> , <i>Lemur fulvus rufus</i>
		<i>Plasmodium girardi</i>	<i>Lemur fulvus fulvus</i> , <i>Lemur fulvus rufus</i> , <i>L. fulvus fulvus</i>
		<i>Plasmodium uilenbergi</i>	
		<i>Plasmodium percygarnhami</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>
		<i>Plasmodium coulangesi</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>
		<i>Plasmodium bucki</i>	
América do Sul	<b>Macacos do Novo Mundo</b>	<i>Plasmodium simium</i>	<i>Alouatta</i> spp, <i>Brachyteles arachnoides</i>
		<i>Plasmodium brasilianum</i>	<i>Alouatta</i> spp., <i>Ateles</i> spp, <i>Aotus vociferans</i> , <i>Brachyteles arachnoides</i> , <i>Cacajao calvus</i> , <i>Callicebus</i> spp., <i>Cebus</i> spp., <i>Chiropotes satanas</i> , <i>Lagothrix</i> spp., <i>Saguinus midas</i> , <i>Pithecia pithecia</i>

**Fonte:** Adaptado de Deane et al. 1992; Gysin, 1998; Leclerc et al., 2004; Cormier, 2011.

### 1.3 Malária extra-Amazônica: a “malária de bromélias”

Além do grande número de casos de malária na Bacia Amazônica, casos da doença têm sido reportados fora da área de transmissão ativa. Entre eles, casos importados caracterizados por indivíduos que viajaram para áreas endêmicas e casos autóctones de malária mantida em pequenos focos ou surtos, com características específicas, como os reportados em áreas de Mata Atlântica (revisado em Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Os casos de malária autóctone descritos nos estados que fazem parte do bioma de Mata Atlântica (Tabela 2 e Figura 3) são caracterizados por baixa parasitemia, sintomatologia branda ou em alguns casos assintomática e, geralmente, diagnosticados como malária vivax (Curado *et al.*, 1997; Curado *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2008). A transmissão nessas áreas ocorre, em geral, de forma isolada ou em pequenos surtos (Carréri-Bruno *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2010). Os mosquitos do grupo *Kerteszia*, *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* têm sido incriminados como vetores potenciais da malária nessas regiões (Azevedo, 1997). A infecção em regiões de resquício de Mata Atlântica é conhecida como “malária de bromélias” (termo introduzido por Pittendrigh, 1948) devido à associação de sua ocorrência em matas ricas neste tipo de vegetal, dentro das quais se desenvolvem as formas imaturas do mosquito vetor (Deane, 1992; Portes *et al.*, 2010).

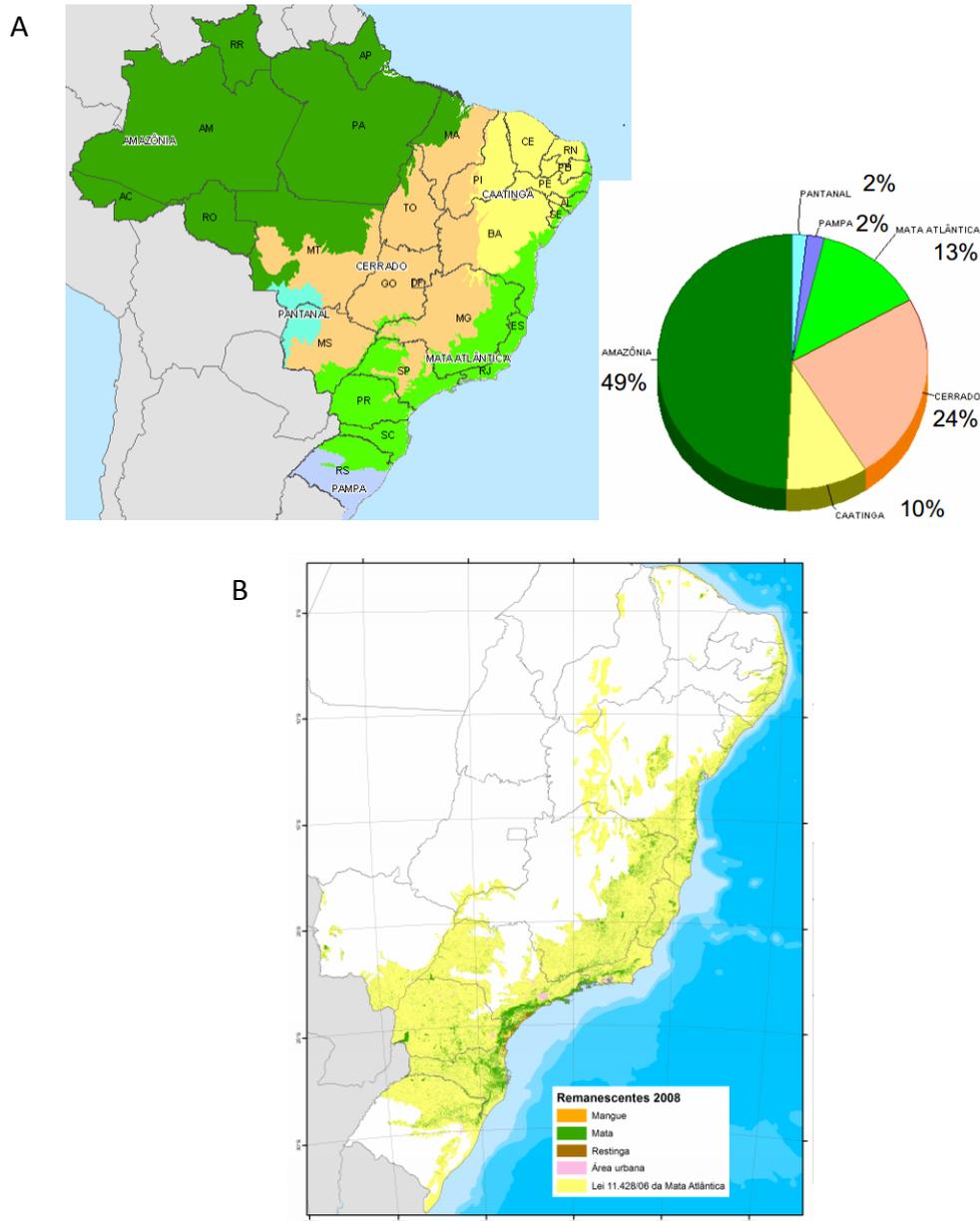
**Tabela 2.** Casos autóctones de malária registrados como *P. vivax* em regiões não endêmicas, no período de 2010 a 2013.

UF de notificação	Anos				Total
	2010	2011	2012	2013*	
Piauí	36	25	16	5	84
Ceará	1	6	3	0	10
Rio Grande do Norte	4	2	2	1	9
Paraíba	1	0	0	0	1
Pernambuco	2	1	1	0	5
Alagoas	4	2	1	0	7
Bahia	2	2	4	0	8
Minas Gerais	4	2	5	1	12
Espírito Santo	45	34	26	19	125
Rio de Janeiro	9	3	4	5	21
São Paulo	20	11	26	9	67
Paraná	55	16	5	6	83
Santa Catarina	3	1	3	4	11
Rio Grande do Sul	0	2	4	2	8
Mato Grosso do Sul	1	2	1	1	5
Goiás	15	5	2	0	22
Distrito Federal	0	5	1	1	7
<b>Total</b>	<b>202</b>	<b>119</b>	<b>104</b>	<b>54</b>	<b>485</b>

\*Dados parciais.

Fonte SINAN, <acesso em 24/01/2014

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/malaria/bases/malabrnet.def>.



**Figura 3.** Bioma de Mata Atlântica. **A.** Mapa do Brasil representando o domínio do bioma de Mata Atlântica e sua extensão compara aos demais biomas. **B.** Mata do Brasil apresentando o domínio da Mata Atlântica e o remanescente da mata (verde). *Fonte:* Sistema Integrado de Gestão Ambiental, 2009.

No estado de São Paulo, Wanderley e colaboradores (1994) realizaram um levantamento epidemiológico de malária entre os anos de 1983 e 1992. Durante este período, foram notificados 20.200 casos de malária no estado, dos quais 410 foram autóctones. O grupo discute sobre uma área bem definida no estado, recoberta por Mata Atlântica, com predomínio de casos por *P. vivax*, de baixa parasitemia e onde estão presentes anofelinos do subgênero *Kerteszia*. A área de transmissão mais importante, responsável por 90% dos casos, envolve os municípios do litoral norte, baixada Santista, Vale do Ribeira e Grande São Paulo, todos eles associados ao bioma de Mata Atlântica (Carréri-Bruno *et al.*, 1995). Marques e colaboradores (2008) realizaram um estudo epidemiológico no litoral norte do estado de São Paulo, em série temporal (1985 a 2006), de casos de malária autóctone na região. Em todos os 83 casos identificados pela microscopia neste período, o único agente etiológico envolvido na infecção foi o *P. vivax*. Por meio da busca ativa de casos, foram caracterizados quatro casos assintomáticos durante o estudo. Nas coletas entomológicas, a espécie predominante foi o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (76% ou 171/226). Carréri-Bruno e colaboradores (1995), no ano de 1993, descreveram no município de São Vicente, localizado na baixada santista, um pequeno surto de malária autóctone. O município apresenta desmatamentos, com áreas habitadas por agricultores ou indivíduos que realizam cultivos de subsistência (áreas de posse), bem como funcionários da empresa ferroviária FEPASA (Ferrovias Paulistas S.A.) que faz o acesso de Santos a São Paulo. Além desses indivíduos, a região é também ocupada por indígenas, extrativistas clandestinos e pessoas que buscam lazer nos finais de semana. O parasito identificado nas lâminas dos sete casos descritos no surto foi o *P. vivax*. Do total de casos do estudo, três deles foram descritos entre funcionários da SUCEN, após atividade entomológica para o controle da malária na região. A equipe utilizou armadilha de Shannon e capturou em três dias, por três horas, 1.170 exemplares de uma única espécie de anofelino, o *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Não houve levantamento de infecção malárica entre a população de símios da região durante este estudo. Este trabalho cita ainda que existiam outros relatos de malária entre funcionários da SUCEN na região, porém nenhum deles havia sido oficialmente reportado para a comunidade científica, reforçando que tais casos são extremamente

subestimados. No município de Ilha Comprida, ainda no estado de São Paulo, foram realizadas capturas entomológicas com armadilha do tipo CDC entre os meses de setembro de 2001 a setembro de 2002. Do total de 55.226 mosquitos coletados, 2,4% eram *An. bellator* (do total de Culicidae) e 11% *An. cruzii*, sendo a maioria capturada na copa das árvores. Apesar do caráter acrodendrofilico das duas espécies (maioria presente na copa das árvores), a presença de espécimes coletadas próximas ao solo é preocupante uma vez que casos de malária autóctone foram descritos na região (Ueno *et al.*, 2007). Mais recentemente, Neves e colaboradores (2012) caracterizaram uma taxa de infecção equivalente a 0,24% de anofelinos infectados (n=506) por *P. malariae* e *P. vivax* nas proximidades da tribo indígena Guarani, na reserva Curucutu, no município de Intanhém, São Paulo. O trabalho também discute a possibilidade de um ciclo zoonótico nesta região. Ainda no estado de São Paulo, foi caracterizada a infecção pelo *P. vivax* (diferentes variantes VK210 e VK247) em anofelinos do grupo *Kerteszia*. A infecção, apesar de baixa, foi demonstrada nos municípios São Vicente e Jujutiba, no estado de São Paulo (Branquinho *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2008).

Cerutti-Junior e colaboradores (2007) realizaram um levantamento epidemiológico no estado do Espírito Santo, onde foi possível caracterizar pela microscopia ótica a infecção por *P. vivax* em 51 pacientes sem histórico de viagens para áreas endêmicas. Dos 51 casos, 48 foram testados pela PCR, sendo 45 positivos para *P. vivax*, 1 positivo para *P. malariae* e 2 resultados negativos. Ainda neste estudo, soros de 50 pacientes foram testados no ELISA, onde 50% dos indivíduos apresentaram anticorpos contra a proteína circumsporozoíta (CSP) de *P. vivax* e *P. malariae*. Na captura entomológica, foram detectados 785 anofelinos e um “pool” de sete espécimes amplificou para *P. vivax*. Foi avaliada a presença de plasmódio em quatro bugios do cativeiro do Centro de reintrodução do estado e em um animal de vida livre acidentado que fora recepcionado. Foi possível confirmar a infecção pela microscopia e pelo PCR com a presença do *P. brasilianum/P. malariae* em dois animais, um de cativeiro e no animal de vida livre. Finalmente, o estudo aponta para uma possível zoonose, baseando-se nas evidências de símios infectados na região.

Em regiões de Mata Atlântica do sul do país, casos autóctones foram descritos por Bértoli & Moitinho (2001). Neste estudo, um levantamento epidemiológico foi realizado no estado do Paraná de 1994 a 1999, onde foi possível caracterizar 2.366 infecções maláricas, sendo que destas, 15,5% (367) correspondia a casos autóctones da doença em resquícios de Mata Atlântica. Em Santa Catarina, apesar de a malária ter sido eliminada na década de 80, casos autóctones e esporádicos tem ocorrido desde então. Portes e colaboradores (2010) realizaram um levantamento entomológico em 48 municípios do estado e identificaram dentre os culicídeos coletados (n=12.310), 93,7% pertencentes ao gênero *Anopheles*, agrupados em três subgêneros e 13 espécies, sendo 21% *An. (K.) cruzii*. Embora esta espécie apresente preferência por picar nos níveis elevados das florestas, nas copas das árvores (acrodendrofilia), todas as coletas foram realizadas ao nível do solo, o que reforça o caráter oportunista e eclético deste vetor, que já havia sido demonstrado por outros autores (Ueno *et al.*, 2007). Os autores discutem a importância desses culicídeos na manutenção da malária autóctone no estado, uma vez que entre 1996 e 2003, dos 366 casos notificados em Santa Catarina, 8 eram autóctones distribuídos entre os municípios de Indaial, Garuva, Barra Velha, Gaspar e Rodeio. Entre os anos de 1980 a 1982 foram descritos casos de malária em dois municípios do estado de Santa Catarina causados pelo *P. vivax* (Gadelha, 1994). Ainda em Santa Catarina, Machado e colaboradores (2003) apresentaram o perfil epidemiológico da malária no estado segundo os dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), relativos ao período de 1996 a 2001. Das 4.707 lâminas examinadas, 5,5% eram positivas. As infecções pelo *P. vivax* foram equivalentes a 69%, 25,6% por *P. falciparum*, 5% de infecções mistas por ambas as espécies e somente 0,4% por *P. malariae*. Foram observados 32,6% de casos autóctones. Os municípios de Blumenau, Joinville, São Francisco do Sul e Florianópolis foram responsáveis pelo maior número de autoctonia no biênio 1996/97. O trabalho reforça a necessidade de monitoramento desses municípios uma vez que a reemergência da doença é contínua.

Nas décadas de 60 e 70, foram adotadas medidas para o controle da malária na região da Serra do Mar, que se estende desde o estado do Rio de

Janeiro até Santa Catarina. As medidas incluíram a destruição das bromélias e aplicação de larvicidas e inseticidas nas matas (Deane, 1988). No entanto, as espécies do subgênero foram capazes de persistir na região. Ueno e colaboradores (2007) discutem que se diante de medidas tão intensas os anofelinos foram capazes de se reestabelecer na região, é possível que um controle específico desses mosquitos não seja viável. A região da Serra do Mar é hipoendêmica de malária, cuja epidemiologia dos casos autóctones tem sido debatida, existindo evidências de circulação de variantes de *P. vivax* em plasmódios simianos (*P. simium*/*P. vivax*) na população (Branquinho *et al.*, 1997). Essa malária residual e persistente deve ser levada em consideração, já que as investigações citadas ainda são subestimadas (Ueno *et al.*, 2007). Todos estes casos autóctones reportados na Mata Atlântica reforçam a importância de maiores estudos, uma vez que o risco de reintrodução da doença nessas áreas é grande, devido à presença abundante do anofelino vetor. Além disso, a alta mortalidade associada ao diagnóstico tardio é frequente em áreas não endêmicas, de forma que somente em 2011, a letalidade da malária fora da região amazônica foi 108 vezes maior do que na área endêmica (SVS, 2013).

O professor Leônidas M. Deane sugeriu na década de 80 que as duas espécies de plasmódio simianas descritas no Brasil poderiam ser responsáveis pela ocorrência destes casos autóctones em áreas de Mata Atlântica (Deane, 1992). Na Mata Atlântica brasileira, coabitam macacos dos gêneros *Allouata* e *Cebus* nas copas das árvores, juntamente com os anofelinos vetores *Anopheles* (Kertezia) *cruzii* e *Anopheles* (Kertezia) *bellator* em coleções de águas formadas dentro das bromélias. Estes dois vetores tem ampla distribuição ao longo da costa Atlântica brasileira, sendo conhecidos como transmissores de *P. vivax* e também de *P. simium* e de *P. brasilianum*, estas últimas duas espécies parasitos de primatas não humanos. O *A. (Ker.) cruzii* é antropofílico, com atividade ao longo das 24 horas do dia com picos crepusculares. Nestas regiões, os macacos dos gêneros *Allouata* e *Cebus* se apresentam comumente infectados com *P. brasilianum* e *P. simium*. Em tribos indígenas da Amazônia, Arruda e colaboradores (1989), identificaram o parasito *P. brasilianum* em macacos domesticados e selvagens distribuídos

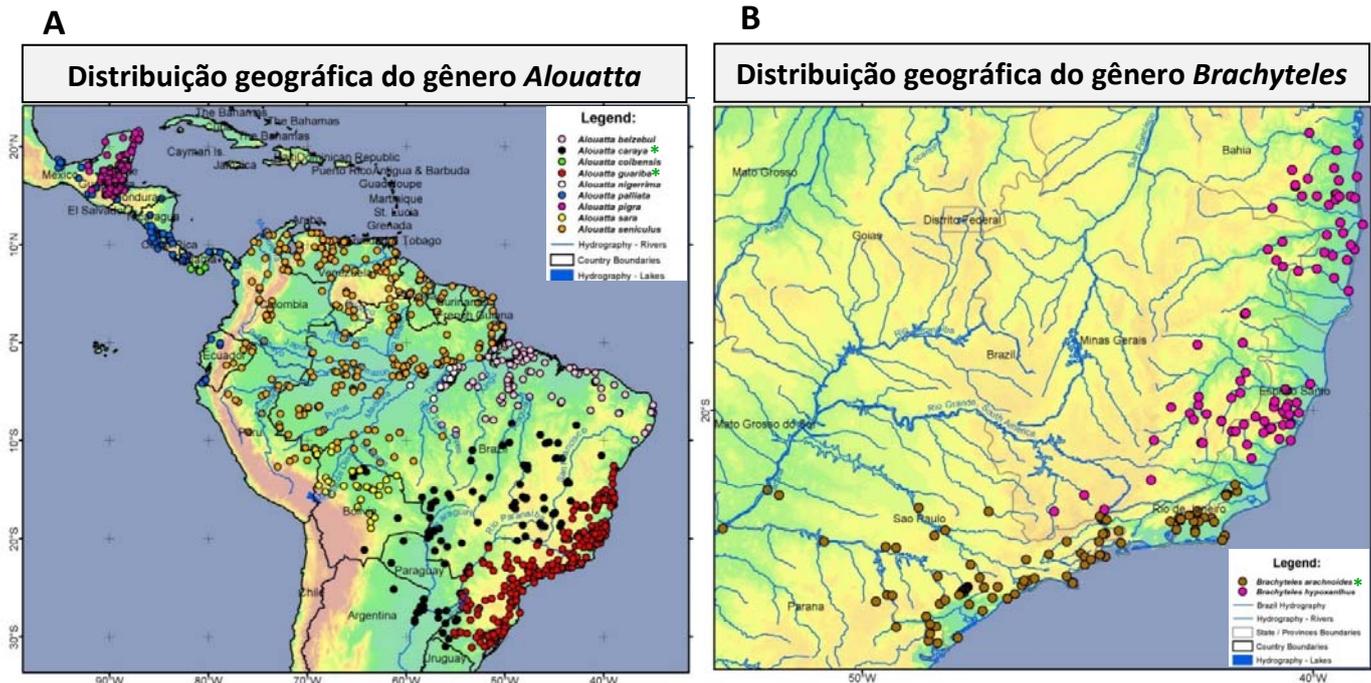
entre os gêneros *Alouatta* e *Cebus*, e também *Ateles*, *Saimiri* e *Chiropotus* (Deane *et al.*, 1984; Ferreira-Neto *et al.*, 1970; Lourenço-de-Oliveira & Deane, 1995). *Plasmodium brasilianum* foi descoberto em 1908 por Gonder e Berenberg-Gossler (Ferreira-Neto *et al.*, 1970) em um macaco de circo, o *Cacajao calvus*, da cidade de Hamburgo, na Alemanha, que havia sido importado da região Amazônica brasileira. *Plasmodium simium* foi descrito por Fonseca (Fonseca, 1951; Collins *et al.*, 1969) em bugios da espécie *Alouatta fusca*, no estado de São Paulo. Apesar dos hospedeiros vertebrados naturais das espécies *P. simium* e *P. brasilianum* serem primatas não humanos, infecções na população humana já foram descritas na literatura científica (Deane, 1992; Cerutti-Junior, 1995; Arruda *et al.*, 2007).

*Plasmodium brasilianum* e o *P. simium* infectam naturalmente macacos das famílias Cebidae e Atelidae. O *P. brasilianum* apresenta uma ampla distribuição geográfica sendo que relatos de primatas não humanos infectados por este espécime já foram descritos no Panamá, Venezuela, Peru e Brasil. Além da vasta distribuição geográfica, o *P. brasilianum* apresenta uma grande plasticidade com relação ao número espécies de primatas neotropicais que é capaz de infectar (Tabela 3). Em um levantamento realizado por Deane no Brasil (1992) por meio da gota espessa, dos 46 macacos da família Cebidae examinados, 28 foram encontrados positivos para *P. brasilianum* e 2 para *P. simium*. Em duas regiões do estado de Rondônia, Balbina e Samuel, foram detectados em 15,8% e 9,9% de macacos infectados com *P. brasilianum*, respectivamente (Lourenço-de-Oliveira & Deane, 1995). Em contrapartida, o *P. simium* apresenta uma distribuição geográfica e uma capacidade de infectar primatas neotropicais extremamente restritas. Esta espécie foi encontrada infectando apenas macacos dos gêneros *Alouatta* (bugios) e *Brachyteles* (muriquis), na Mata Atlântica brasileira (Deane, 1992). Embora a distribuição destes dois macacos suscetíveis seja relativamente ampla (Figura 4 – espécies com asterísco), o *P. simium* foi encontrado apenas nas regiões sul e sudeste do Brasil.

**Tabela 3.** Espécies de plasmódio que infectam naturalmente PNHs do Velho Mundo e do Novo Mundo e as espécies que parasitam humanos com as quais apresentam similaridade morfológica.

Plasmódios de PNHs	Plasmódios de humanos	Distribuição geográfica dos plasmódios de PNHs	Casos descritos em humanos
<b>Velho Mundo</b>			
<i>P. coatney</i>	<i>P. falciparum</i>	Malásia, Filipinas	-
<i>P. cynomolgi</i>	<i>P. vivax</i>	Índia, Indonésia, Malásia, Sri Lanka, Taiwan	Eyles <i>et al.</i> , 1960
<i>P. eylesi</i>	<i>P. vivax</i>	Malásia	-
<i>P. fragile</i>	<i>P. falciparum</i>	Índia, Sri Lanka	-
<i>P. hylobati</i>	<i>P. vivax</i>	Indonésia	-
<i>P. inui</i>	<i>P. malariae</i>	Índia, Indonésia, Malásia, Filipinas, Sri Lanka, Taiwan	-
<i>P. jeffreyi</i>	<i>P. vivax</i>	Indonésia, Malásia	-
<i>P. knowlesi</i>	<i>P. falciparum</i> , <i>P. malariae</i>	China, Indonésia, Malásia, Filipinas, Singapura, Tailândia, Taiwan	CDC, 2008
<i>P. pitheci</i>	<i>P. vivax</i>	Malásia	-
<i>P. simiovale</i>	<i>P. ovale</i>	Sri Lanka	-
<i>P. silvaticum</i>	<i>P. vivax</i>	Malásia	-
<i>P. youngi</i>	<i>P. vivax</i>	Malásia	-
<b>Novo Mundo</b>			
<i>P. brasilianum</i>	<i>P. malariae</i>	Brasil, Colômbia, México, Panamá, Peru, Venezuela	Arruda <i>et al.</i> 1989
<i>P. simium</i>	<i>P. vivax</i>	Brasil (floresta atlântica – sul e sudeste)	Deane, 1992

**Fonte:** modificado de CDC, 2008 e Coatney *et al.* 1971. Em negrito, espécies com relatos de infecção em humanos.



**Figura 4.** Distribuição geográfica dos gêneros *Alouatta* e *Brachyteles* na América do Sul e espécies de primatas suscetíveis ao *P. simium*. **A.** Distribuição do gênero *Alouatta*. **B.** Distribuição do gênero *Brachyteles*. \* Espécies suscetíveis ao *P. simium*. **Fonte:** adaptado de Banco de Dados Georreferenciado das Localidades de Ocorrência de Primatas Neotropicais, ICB-UFMG. Acesso em: 28/01/14 [http://www.icb.ufmg.br/zoo/primatas/home\\_bdgeoprim.htm](http://www.icb.ufmg.br/zoo/primatas/home_bdgeoprim.htm) e Deane 1992.

A descoberta do *P. simium* está vinculada a uma interessante história na literatura científica. Apesar da espécie não ter sido oficialmente descrita pelo respeitável professor Deane, tal pesquisador teve uma contribuição importante na descoberta deste parasito (Deane *et al.* 1969). Em 1939, o pesquisador Flávio da Fonseca trabalhava no Instituto Butantan com o vírus da febre amarela em primatas não humanos da floresta de Itapeçerica da Serra, próxima da cidade de São Paulo. Acompanhando os animais continuamente, ele observou uma temperatura incomum em um dos bugios ruivos que o levou a confeccionar lâminas de esfregaços sanguíneos deste animal. Ao analisar as lâminas sob microscópio óptico, foram identificadas formas do parasito dentro das hemácias associadas à infecção por *Plasmodium* sp., onde em uma análise mais minuciosa foi caracterizado como *P. brasilianum*, descrevendo assim o primeiro relato de *P. brasilianum* no país. Dez anos depois, em 1963, o professor Leônidas Deane, que havia sido convocado pela Organização

Mundial de Saúde (OMS) para trabalhar com malária simiana no Brasil após o primeiro caso de infecção humana por um plasmódio de PNHs nos Estados Unidos (o *P. cynomolgi*, em 1960), solicitou mais detalhes da investigação de Fonseca. Finalmente, no momento em que Fonseca reavaliava as lâminas, para sua surpresa, percebeu que não se tratava de *P. brasilianum*, mas sim de uma nova espécie que foi por ele denominada *Plasmodium simium*, em 1951.

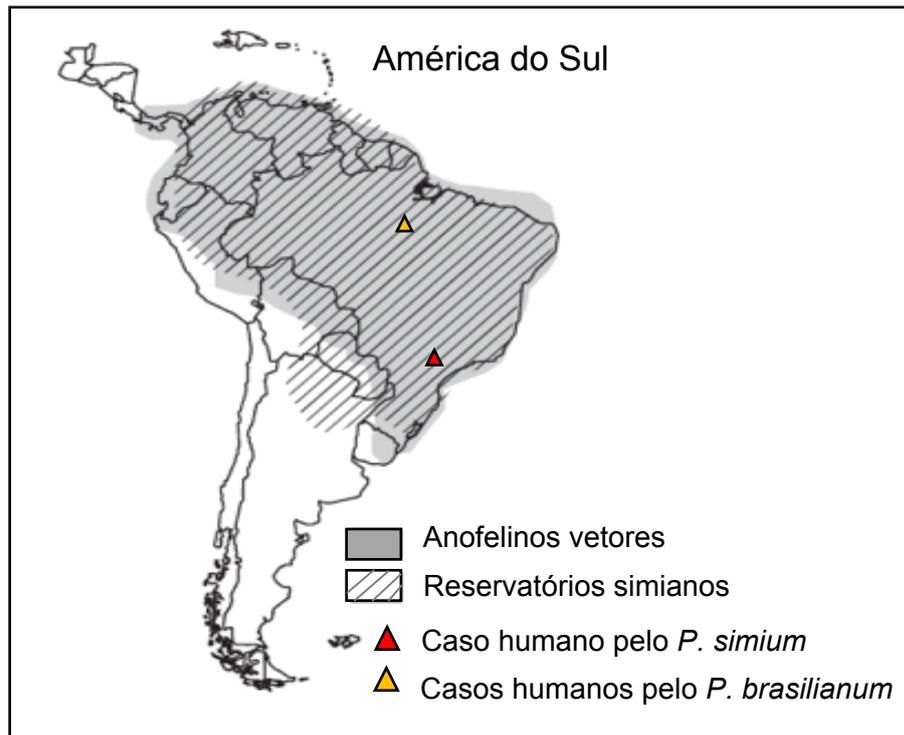
A correta e precisa caracterização dos parasitos simianos é considerada um problema de saúde pública. Na microscopia ótica, as características que diferenciam os parasitos simianos dos parasitos que infectam os humanos (Tabela 3) são extremamente sutis e mesmo microscopistas de excelência, apresentam dificuldades na identificação. Tanto o *P. brasilianum* quanto o *P. simium* são muito semelhantes aos parasitos *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente. Tal similaridade ocorre em nível morfológico, por meio da microscopia ótica; imunológico, por meio da análise da resposta de anticorpos, e ainda do ponto de vista genético, através de técnicas moleculares (Collins *et al.*, 1969; Leclerc *et al.*, 2004).

A microscopia, apesar de ser a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de malária, apresenta uma série de limitações. Uma delas é a dificuldade de diferenciar certos plasmódios de primatas não humanos dos parasitos que infectam humanos e a baixa sensibilidade em baixas parasitemias. Entretanto, as atuais ferramentas de biologia molecular que facilitaram a identificação do *P. knowlesi* no continente asiático não tem tido o mesmo sucesso para o diagnóstico diferencial dos plasmódios humanos e simianos no Brasil (CDC, 2008; Yamasaki *et al.*, 2011). A caracterização apropriada dos parasitos de primatas não humanos seria crucial para elucidar a epidemiologia da malária na Mata Atlântica brasileira, no que tange ao papel de primatas neotropicais enquanto reservatórios da doença (Collins *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1979).

Apesar das limitações anteriormente citadas com relação à diferenciação dos parasitos humanos e simianos, dois trabalhos descreveram a infecção em humanos por parasitos de primatas neotropicais no Brasil (Tabela 3, Figura 5). O primeiro deles foi descrito por Leônidas Deane e colaboradores (1966), em um de seus empregados, um guarda do Horto Florestal da Cantareira em São

Paulo. Enquanto o guarda realizava coletas entomológicas para a pesquisa de malária simiana apresentou três paroxismos maláricos (com intervalos de 48 horas), caracterizados por tremores, dores de cabeça e febre. Após o terceiro paroxismo, o paciente evoluiu para cura espontânea. Acredita-se que os vetores envolvidos neste caso sejam do grupo *Kerteszia*, da espécie *A. cruzii*, abundante nas capturas entomológicas e sabidamente conhecido como vetor para os macacos em São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Deane *et al.* 1966).

O segundo caso foi descrito por Arruda e colaboradores (1989) em quatro tribos indígenas da Amazônia, compreendendo os estados do Pará e Mato Grosso, sendo as tribos estudadas: Arara, Parakana, Asurini e Metuktire. Apesar da parasitemia identificada pela análise das lâminas dos indivíduos das tribos ter sido muito baixa (<0,02%), anticorpos contra a proteína Circumesporozoíta (CSP) de *P. brasilianum/P. malariae* foram detectados em 56% dos indivíduos estudados (218/390). De um total de 13 macacos domesticados nas tribos e 28 selvagens analisados durante o estudo conduzido na Amazônia, quatro animais domesticados apresentaram lâmina positiva para *P. brasilianum* e 56% destes animais apresentavam anticorpos contra a CSP *P. brasilianum/P. malariae*. Dos animais de vida livre investigados 100% deles exibiam anticorpos contra a mesma proteína. Além de humanos e reservatórios simianos infectados na mesma área, o grupo avaliou a resposta de anticorpos contra a CSP em mosquitos *A. darlingi*, de um total de 755 mosquitos analisados, três deles eram positivos. Estes resultados levaram a conclusão que a malária se comportou como zoonose nas tribos amazônicas do estudo.



**Figura 5.** Distribuição sobreposta dos reservatórios simianos e vetores anofelinos na América do Sul e casos humanos de malária simiana já descritos no Brasil. Distribuição de anofelinos e vários reservatórios simianos naturalmente infectados pelo *P. simium* e *P. brasilianum* na América do Sul. O caso humano pelo *P. simium* foi descrito em São Paulo (Deane *et al.*, 1966) e os casos por *P. brasilianum* foram descritos no Pará e Mato Grosso (Arruda *et al.* 1989). **Fonte:** modificado de CDC, 2008.

#### 1.4 Ciclo biológico dos parasitos da malária

A forma infectante do parasito no hospedeiro vertebrado é o esporozoítio, que penetra na pele pela probóscide do inseto anofelino no momento do repasto sanguíneo. Estima-se que entre 15 a 200 parasitos sejam depositados sob a pele do hospedeiro durante a alimentação sanguínea (Coatney *et al.*, 1971). Os esporozoítios não atingem a circulação sanguínea logo que são injetados, podendo permanecer por horas na pele (Mota & Rodriguez, 2004; Sinnis & Zavala, 2008; Amino *et al.*, 2006). As formas que escapam do sistema imunológico e atingem a circulação sanguínea migram para o fígado e penetram nas células hepáticas (Amino *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007). No fígado, inicia-se o ciclo exoeritrocítico, onde os esporozoítios podem migrar ativamente nos hepatócitos, até finalmente se estabelecer em uma célula específica. Esta migração trans-celular é importante, provavelmente, para a

indução da exocitose de organelas apicais do parasito, tornando-os aptos a infectar o hepatócito e se desenvolver dentro do vacúolo parasitóforo (Mota *et al.*, 2002; Mota & Rodriguez, 2004; Amino *et al.*, 2006).

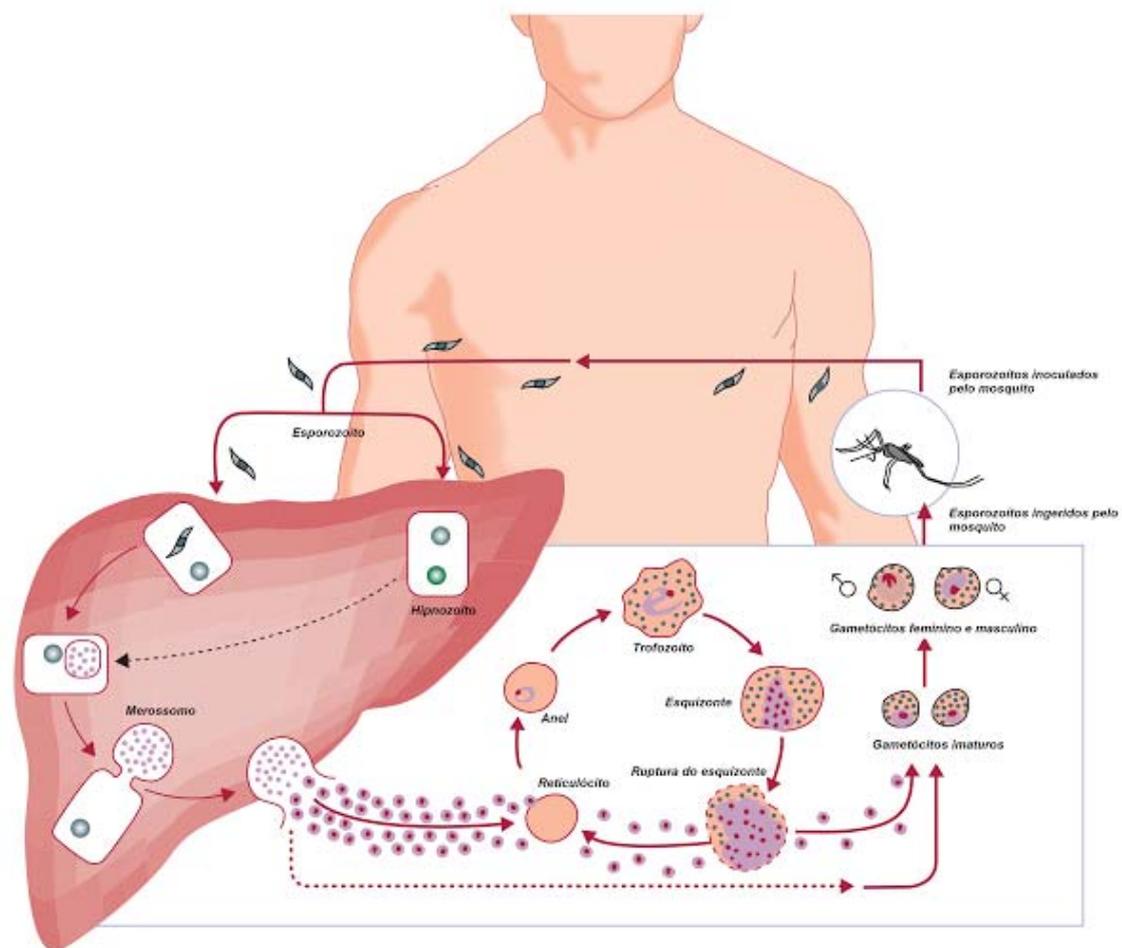
No caso dos parasitos humanos *P. vivax* e *P. ovale*, e dos parasitos simianos *P. cynomolgi*, *P. fieldi* e *P. simiovale*, os esporozoítos podem diferenciar-se em formas latentes no interior do fígado, os denominados hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos após a infecção (Krotoski, 1985).

Ao se estabelecerem no hepatócito, os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente resultando na formação dos merozoítos. Os merozoítos são liberados gradativamente na circulação sanguínea sob a forma de estruturas denominadas merossomas, dando assim, continuidade ao ciclo (Sturm *et al.* 2006). Na circulação sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos por meio de interações específicas entre a membrana do parasito e os receptores presentes na superfície dessas células (ver item 1.4.1).

Dentro das hemácias, os parasitos continuam a se multiplicar de forma assexuada, sendo o ciclo eritrocítico responsável por toda a sintomatologia clínica da doença. Dentro dos eritrócitos os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e finalmente em esquizontes. Dependendo da espécie, cada esquizonte gera cerca de 10 a 30 merozoítos que penetrarão em outras células sanguíneas, reiniciando o ciclo eritrocítico. A duração da esquizogonia sanguínea pode ser de 24 horas (febre cotidiana), 48 horas (febre terçã) ou 72 horas (febre quartã), de acordo com a espécie envolvida na infecção. Apenas uma espécie tem ciclo de 24 horas, o *P. knowlesi*, sendo que a grande maioria das espécies apresenta ciclo de 48 horas (febre terçã). Após um período que varia de 3 a 10 dias, conforme a espécie do parasito, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos (Coatney *et al.*, 1971).

As fêmeas dos anofelinos, ao se alimentarem do sangue de um indivíduo infectado, ingerem os gametócitos e é nessa fase que se inicia o ciclo sexuado, no intestino médio do inseto vetor. Esses gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, que em seguida são fecundados

produzindo zigotos. O zigoto se torna alongado e móvel sendo denominado oocineto. Os oocinetos completam sua maturação ainda no bolo alimentar, no intestino do hospedeiro invertebrado. Após a maturação, os oocinetos estão aptos a realizarem o processo de invasão (Mueller *et al.* 2009). A primeira barreira enfrentada pelo parasito ao sair do intestino médio, é a matriz peritrófica (MP), estrutura acelular que recobre o intestino. Após atravessar a MP, o oocineto sai das células epiteliais e entra em contato com a lâmina basal. Esse contato induz a transformação do oocineto em oocisto, uma forma sésil. Em cada oocisto, são ativadas as maquinarias de replicação do DNA e de síntese de proteínas para a multiplicação assexuada gerando a produção de milhares de esporozoítos. Conseqüentemente, a cápsula do oocisto se torna mais fina e fragmentada, possibilitando o aparecimento de perfurações, por onde os esporozoítos escapam (Meis *et al.*, 1992). Ao caírem na hemolinfa, os esporozoítos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num próximo repasto sanguíneo, inocular as formas infectantes no hospedeiro vertebrado (Figura 6). A fase sexuada no hospedeiro invertebrado apresenta grande importância evolutiva para o parasito, uma vez que é neste momento que ocorre a recombinação meiótica.



**Figura 6.** Desenho esquemático do ciclo de vida do *Plasmodium vivax* no hospedeiro humano. Fonte: modificado de Mueller *et al.*, (2009).

### 1.4.1 Invasão do eritrócito pelo *P. vivax*

O processo de invasão dos eritrócitos pelo merozoíto do *P. vivax* é complexo e envolve uma série de etapas. Inicialmente, ocorre o processo de reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à superfície do eritrócito. Em seguida, o parasito reorienta sua porção apical voltando-a para a membrana plasmática do eritrócito. Logo após o processo de reorientação, ocorre a formação de uma junção irreversível entre o cone apical do plasmódio e a membrana da célula hospedeira. Finalmente, ocorre a invaginação da membrana plasmática do eritrócito até que o parasito se encontre dentro da célula, totalmente envolto pelo vacúolo parasitóforo (Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1976). Durante todo o processo de invasão, ocorre uma interação específica entre proteínas do parasito e da célula hospedeira. Esta especificidade celular e molecular foi primeiramente sugerida nos trabalhos de McGhee em 1953, onde observou que os merozoítos do *Plasmodium lophurae*, um parasito de aves, invadiam preferencialmente eritrócitos de patos ao invés galinhas. Desde então, passou-se a estudar proteínas de superfícies envolvidas no processo de invasão do parasito. A invasão dos merozoítos da maior parte das cepas de *P. vivax* e do *P. knowlesi* no eritrócito dependem da interação entre a proteína de ligação do antígeno Duffy (DBP) e o próprio antígeno Duffy (Duffy Antigen/receptor for Chemokines - DARC) na superfície do eritrócito (Hadley, 1986; Miller *et al.*, 1988). Em contrapartida, a invasão pelo *P. falciparum* envolve pelo menos cinco vias, apresentando diferentes alternativas para invadir o eritrócito, ao contrário do *P. vivax* e *P. knowlesi* que parecem ter uma única via predominante (Adams *et al.*, 1992; Gaur *et al.*, 2004).

A proteína PvDBP possui 140kDa e faz parte da superfamília de proteínas homólogas que se ligam ao eritrócito (Erythrocyte Binding Protein – EBPs). Esta proteína apresenta um domínio rico em cisteína que caracteriza um domínio funcionalmente importante, conhecido como DBL (Duffy Binding like), característico de todas as proteínas desta superfamília. Como exemplo de outras EBPs, é possível citar as EBPs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de *P. knowlesi* (Adams *et al.*, 1992). A EBP Alfa de *Plasmodium knowlesi* (*Pk*  $\alpha$ ) apresenta diferentes sítios de ligação, o que explica sua capacidade de se ligar a diferentes receptores no

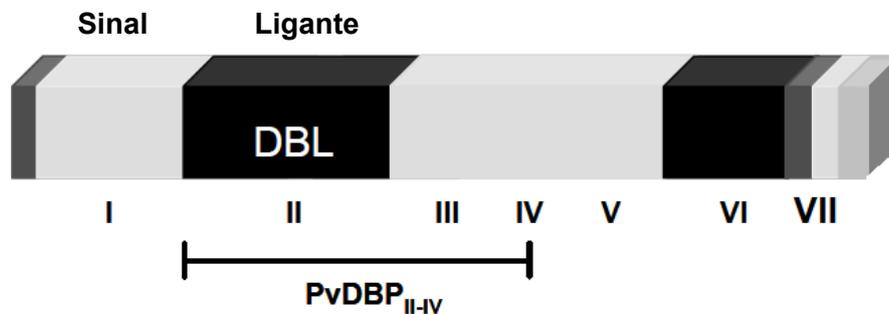
eritrócito. No entanto, a interação específica entre esta proteína e o antígeno DARC não requer a dimerização do domínio DBL (Duffy Binding like) (Howell *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006). Eritrócitos humanos que não expressam a proteína DARC na superfície do eritrócito são resistentes à invasão pelo merozoíto de *P. knowlesi*, o que sugere que o grupo sanguíneo Duffy está relacionado ao processo de internalização do parasito no eritrócito, assim como na invasão por *P. vivax*. Contudo, dois determinantes eritrocíticos são necessários neste processo. O primeiro deles está presente tanto nos eritrócitos Duffy negativos quanto Duffy positivos e é responsável pela adesão do merozoíto à membrana celular. O segundo determinante está presente apenas nos eritrócitos Duffy positivos, sendo crucial para a formação da junção irreversível, necessária para a invasão (Hadley *et al.*, 1986). Além do *P. knowlesi* e *P. vivax* compartilharem a mesma via de invasão, ambos são capazes de infectar um grande número de espécies de primatas do Novo Mundo (Miller *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1977).

A PvDBP se localiza na porção apical do merozoíto, mais especificamente nos micronemas, sendo liberada apenas no momento da invasão (Wertheimer & Barnwell, 1989). A região funcional, PvDBP<sub>II</sub>, corresponde ao domínio DBL, que compreende 330 aminoácidos contendo 12 resíduos de cisteínas (Adams *et al.*, 1992).

Além da região II, a proteína está subdividida em outras seis regiões, classificadas segundo similaridade da estrutura gênica e sequência de aminoácidos com os outros membros da família EBP (Figura 7). A região I contém o pepídeo sinal, as regiões II e VI são ricas em cisteínas amino e carboxiterminal, as regiões III, IV e V são hidrofílicas e finalmente a região VII, apresenta um domínio transmembrana e um curto segmento citoplasmático (Adams *et al.*, 1992).

A proteína PvDBP, segundo características já citadas, é um interessante alvo para uma vacina contra a malária causada pelo *P. vivax*. Entretanto, uma série de estudos tem sugerido que os polimorfismos ao longo da proteína podem modificar o seu caráter antigênico e interferir no bloqueio da ligação PvDBP-DARC (VanBuskirk *et al.*, 2004). A região II da PvDBP, que se liga ao

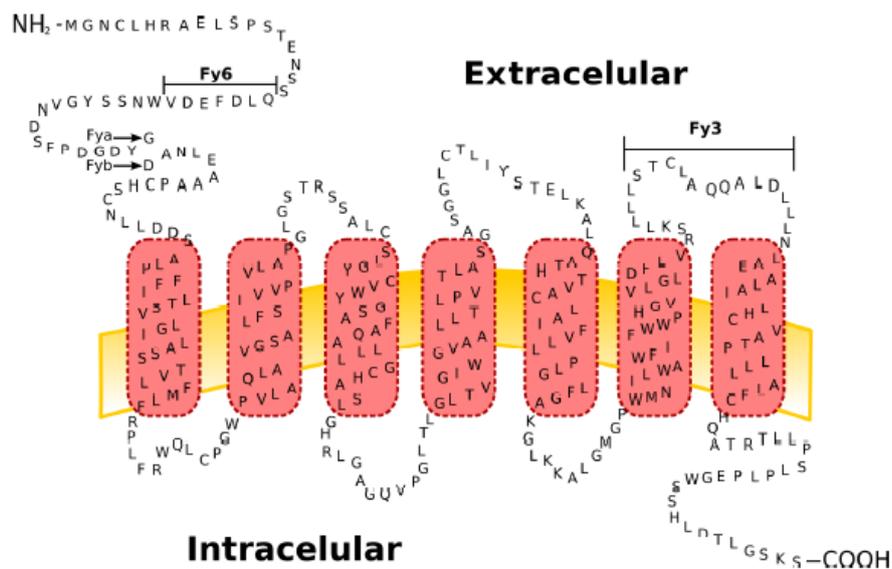
antígeno DARC no eritrócito é a que apresenta maior variabilidade genética (Gosi *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Esquema dos domínios estruturais da PvDBP, sendo as seis primeiras regiões domínios extracelulares e a última região um domínio transmembrana. Em destaque o domínio II, região do ligante localizada entre as cisteínas 4 e 7 (adaptado de VanBuskirk *et al.* 2004).

O Receptor Antigênico Duffy para Quimiocinas (Duffy Antigen Receptor for Chemokines - DARC) está presente em várias células, como eritrócitos, células endoteliais de vênulas, células do cerebelo e células de Purkinje (Hadley & Peiper, 1997). A proteína Duffy (Fy) é uma glicoproteína cuja sequência atravessa a membrana plasmática por sete vezes, possuindo um domínio extracelular amino-terminal e um domínio intracelular carboxi-terminal (Figura 8). A proteína DARC é homóloga ao receptor IL-8 de humanos e coelhos, sendo codificada por um pequeno gene de cópia única (1.5Kb) que apresenta dois éxons e está localizado no cromossomo 1, 1q22-q23 (Neote *et al.*, 1994; Langhi & Bordin, 2006; Demogines, *et al.* 2011). A unidade de transcrição do gene compreende 1781 nucleotídeos, com o primeiro éxon de 21 nucleotídeos, um íntron de 480 nucleotídeos e o segundo éxon de 990 nucleotídeos (Iwamoto *et al.*, 1996). O gene Duffy é caracterizado por três alelos: *Fy*\*A, *Fy*\*B e *Fy*\*B<sup>ES</sup> (ES, *erythroid silent*; silenciado na linhagem eritróide). O polimorfismo antigênico que define os alelos *Fy*\*A e *Fy*\*B ocorre em função de uma mutação pontual na posição 125G>A, sendo co-dominantes. A mudança do aminoácido glicina por um ácido aspártico nesta posição (42) é que define os antígenos Fy, a glicina (Gly<sup>42</sup>) define o antígeno Fy<sup>a</sup> e o ácido aspártico (Asp<sup>42</sup>) define o Fy<sup>b</sup> (Chaudhuri *et al.*, 1993). A

mutação que define o alelo  $Fy^*B^{ES}$  presente em abundância na população negra, está localizada na posição -67 T>C da região promotora do alelo  $Fy^*B$ . Esta mutação bloqueia o sítio de ligação do fator de transcrição GATA-1, afetando sua transcrição em células sanguíneas (Chaudhuri *et al.*, 2000). A mutação no alelo  $FyA$  gerando o alelo  $FyA^{ES}$  também já foi descrita, mas apenas na Papua Nova Guiné (Zimmerman *et al.*, 1999). Na população caucasiana foi identificado outro alelo, o  $Fy^*X$ , que reduz a densidade da proteína na superfície celular levando a um fenótipo Fy negativo atenuado. Este fenótipo é causado por duas mutações no éxon 2, nas posições 265 C > T e 298 G > A (Olsson *et al.*, 1998).



**Figura 8.** Esquema da proteína DARC com sete  $\alpha$  hélices. Os primeiros sete aminoácidos N-terminais pertencem ao primeiro éxon e os aminoácidos restantes pertencem ao segundo éxon. Na figura, está representada a mutação que caracteriza os antígenos Fya e Fyb, além de indicar os dois principais epítipos da proteína Fy6 e Fy3. Os retângulos em rosa representam os domínios transmembrana (Hadley & Peiper, 1997).

Foi demonstrado por Miller e colaboradores (1975) que humanos que apresentavam o fenótipo negativo para DARC Fy(a-b-) eram altamente resistentes à invasão pelo *P. knowlesi*. Além disso, este grupo observou o bloqueio da invasão em eritrócitos Fy(a+ b-) e Fy(a- b+), pelos anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup>, respectivamente. Posteriormente, foi demonstrado que os merozoítos de *P. vivax* eram incapazes de invadir reticulócitos Fy(a- b-) (Barnwell *et al.*, 1989).

A ausência de *P. vivax* na África está correlacionada com a ampla distribuição do fenótipo DARC negativo, sendo que a quase totalidade da população (95%) apresenta o fenótipo Fy(a- b-) (Miller *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1979). A ausência do antígeno Duffy foi fixada na população africana, enquanto a presença do antígeno é quase universal em outras populações do mundo, em uma proporção bem menor (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

## 2 JUSTIFICATIVA

A alta similaridade morfológica, imunológica e genética entre o parasito que infecta primatas neotropicais brasileiros, o *P. simium* e sua espécie correspondente que infecta a população humana, o *P. vivax*, têm dificultado o diagnóstico específico da malária em regiões de Mata Atlântica. A dificuldade da diferenciação molecular destas duas espécies, além da proximidade evolutiva entre as mesmas, se deve ao limitado número de sequências de plasmódios de primatas não humanos disponíveis em bancos de dados públicos. A limitação de informação genômica, somada a um número também limitado de estudos sobre plasmódios de primatas brasileiros nos motivou a estudar a infecção malárica na Mata Atlântica brasileira a fim de compreendermos melhor questões ainda não respondidas, tais como: Existe variabilidade genética entre os parasitos humanos e simianos? É possível desenvolver um diagnóstico para estas espécies tão semelhantes? A via de invasão pelo merozoíto dos parasitos simianos é a mesma que a dos parasitos humanos? Como se deu a evolução dos parasitos brasileiros?

Compreender a história evolutiva dos plasmódios e seus hospedeiros é de grande relevância biológica para o entendimento da relação parasito/hospedeiro, estabelecimento da infecção e patogenia da doença (Martinsen *et al.*, 2008; Rich *et al.*, 2009). Estudos de filogenia molecular têm se concentrado, principalmente, na determinação da origem do *P. falciparum* sugerindo que esta espécie tenha se originado dos parasitos de grandes macacos africanos, como o *Plasmodium reichenowi*, um parasito comum de chimpanzés (Duval *et al.*, 2010; Krief *et al.*, 2010; Prugnolle *et al.*, 2010). Poucos dados se encontram disponíveis sobre a história evolutiva do *P. vivax*, no entanto, estudos filogenéticos têm demonstrado uma proximidade entre esta espécie e as espécies que infectam primatas asiáticos (Cornejo & Escalante, 2006; Escalante *et al.*, 2005; Krief *et al.*, 2010; Mu *et al.*, 2005). A descoberta da alta similaridade genética entre o *P. vivax* e o *P. simium*, um parasito de macacos do Novo Mundo, levantou a possibilidade de que a transferência de hospedeiro tenha ocorrido entre humanos e macacos do Novo Mundo num tempo evolutivo recente (Escalante *et al.*, 2005). Outro estudo sugeriu que pelo menos duas transferências de hospedeiro ocorreram entre humanos e

macacos do Novo Mundo, com razões alternativas para as duas possíveis direções da transferência de hospedeiro (Lim *et al.*, 2005). Recentemente, Liu e colaboradores (2014), demonstraram que gorilas e chimpanzés da África Central naturalmente infectados por parasitos geneticamente relacionados como o *P. vivax* que infecta humanos. A partir das análises do sequenciamento de DNA foi possível observar que as amostras dos primatas africanos apresentavam uma diversidade genética maior que o *P. vivax* humano, indicando que o *P. vivax* tem uma origem africana e todos os isolados deste parasito foram originados de um ancestral comum que saiu da África (Liu *et al.*, 2014). Assim, grande parte da história evolutiva dos plasmódios ainda permanece não resolvida, o que se deve também à escassez de informação sobre as espécies de plasmódios de primatas não humanos como o *P. simium*, principalmente informações genômicas (Tazi & Ayala, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a infecção malárica pelo *Plasmodium vivax*/*Plasmodium simium* em primatas não humanos da Mata Atlântica brasileira.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever a infecção malárica natural e sintomática por *P. simium*/*P. vivax* em *Alouatta clamitans* de cativeiro (Indaial, SC), do ponto de vista clínico e molecular.

Determinar a prevalência da infecção por *Plasmodium* em primatas não humanos de Indaial (SC), Porto Rico (PR) e Taquarassu (MS) utilizando a Reação em Cadeia da Polimeirase (PCR).

Estudar a variabilidade de genes codificadores de antígenos e microssatélites em isolados de *P. vivax*/*P. simium* da Mata Atlântica brasileira.

Identificar potenciais marcadores moleculares capazes de distinguir os parasitos humanos dos não humanos.

Avaliar a reatividade humoral contra os antígenos PvDBP, PvAMA e PvMSP em primatas neotropicais da Mata Atlântica brasileira.

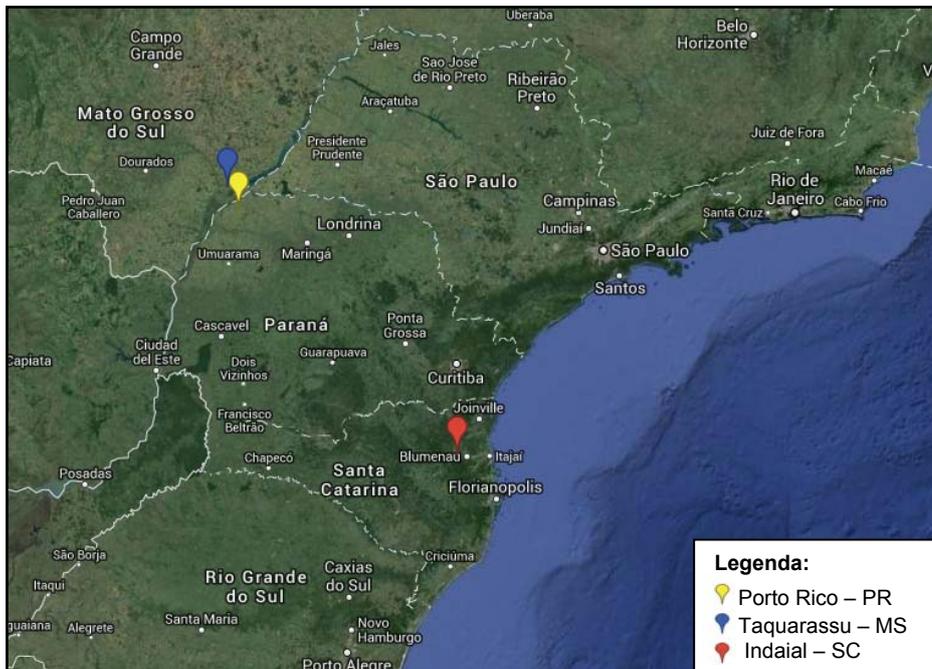
Estudar aspectos do processo de invasão dos eritrócitos pelo *P. vivax*/*P. simium* via DBP-DARC.

Avaliar a variabilidade das moléculas envolvidas no processo de interação do *P. vivax*/*P. simium* com os eritrócitos via DBP-DARC.

Estabelecer as relações fenéticas entre *P. vivax*/*P. simium* e as diferentes espécies de *Plasmodium* a partir de diferentes alvos moleculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue e soro de primatas não humanos (PNHs) no estado de Santa Catarina (SC), no município de Indaial, em colaboração com o veterinário Msc. Júlio César Souza Junior e nos estados do Paraná (PR), município de Porto Rico e Mato Grosso do Sul (MS), município de Taquarassu em colaboração com o veterinário Dr. Walfrido Kühl Svoboda. Em Santa Catarina, foi coletado sangue total e sangue em papel de filtro dos animais desta região. No Paraná e no Mato Grosso do Sul foram obtidas apenas amostras de sangue total e soro. Na figura 9 estão representados os municípios onde foram realizadas as colheitas biológicas nos primatas neotropicais incluídos no estudo.

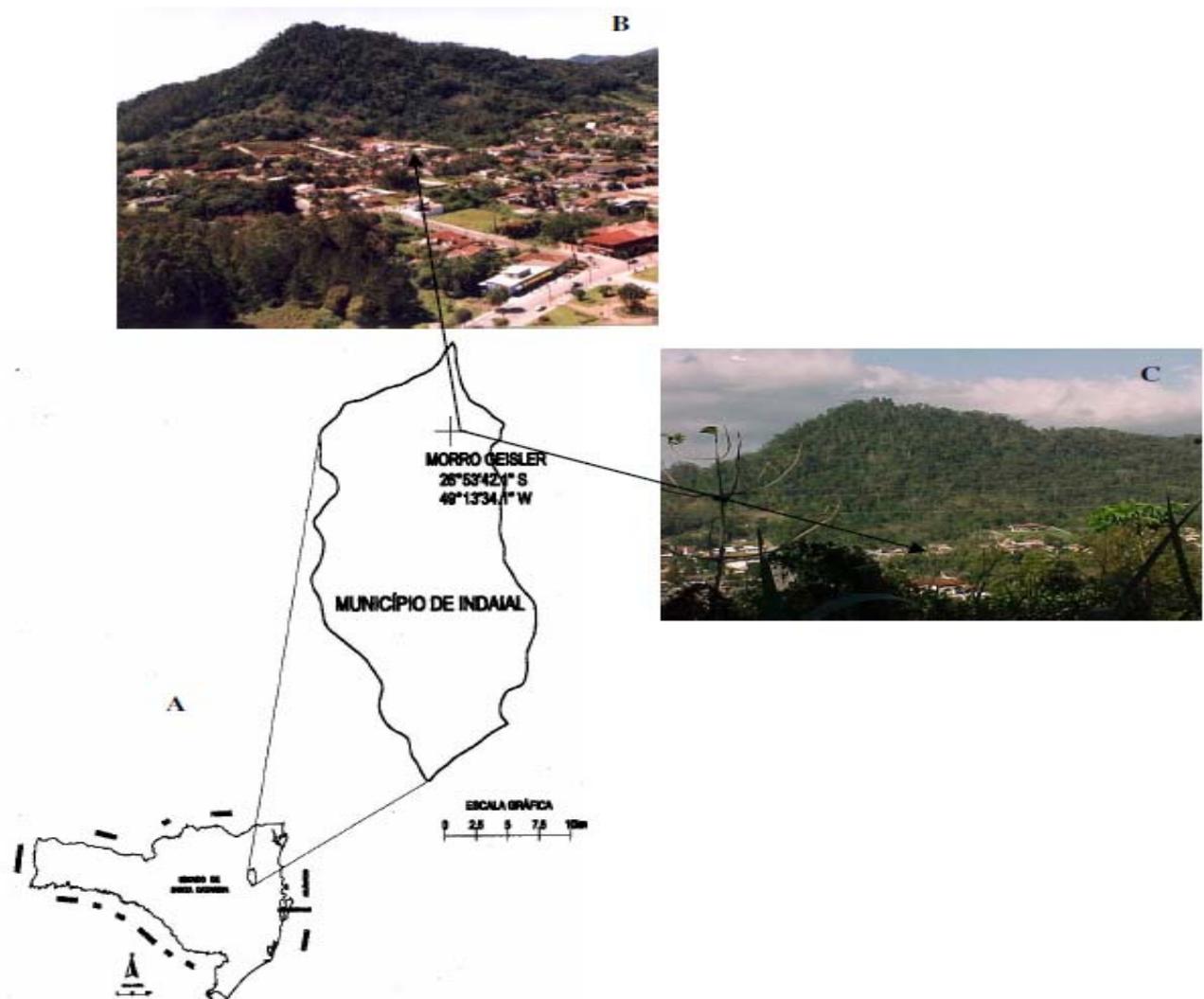


**Figura 9.** Municípios onde foram capturados os primatas neotropicais do estudo. (Fonte: Google Earth, acesso em 22/01/2014).

### 4.1 Descrição da área de colheita em Santa Catarina

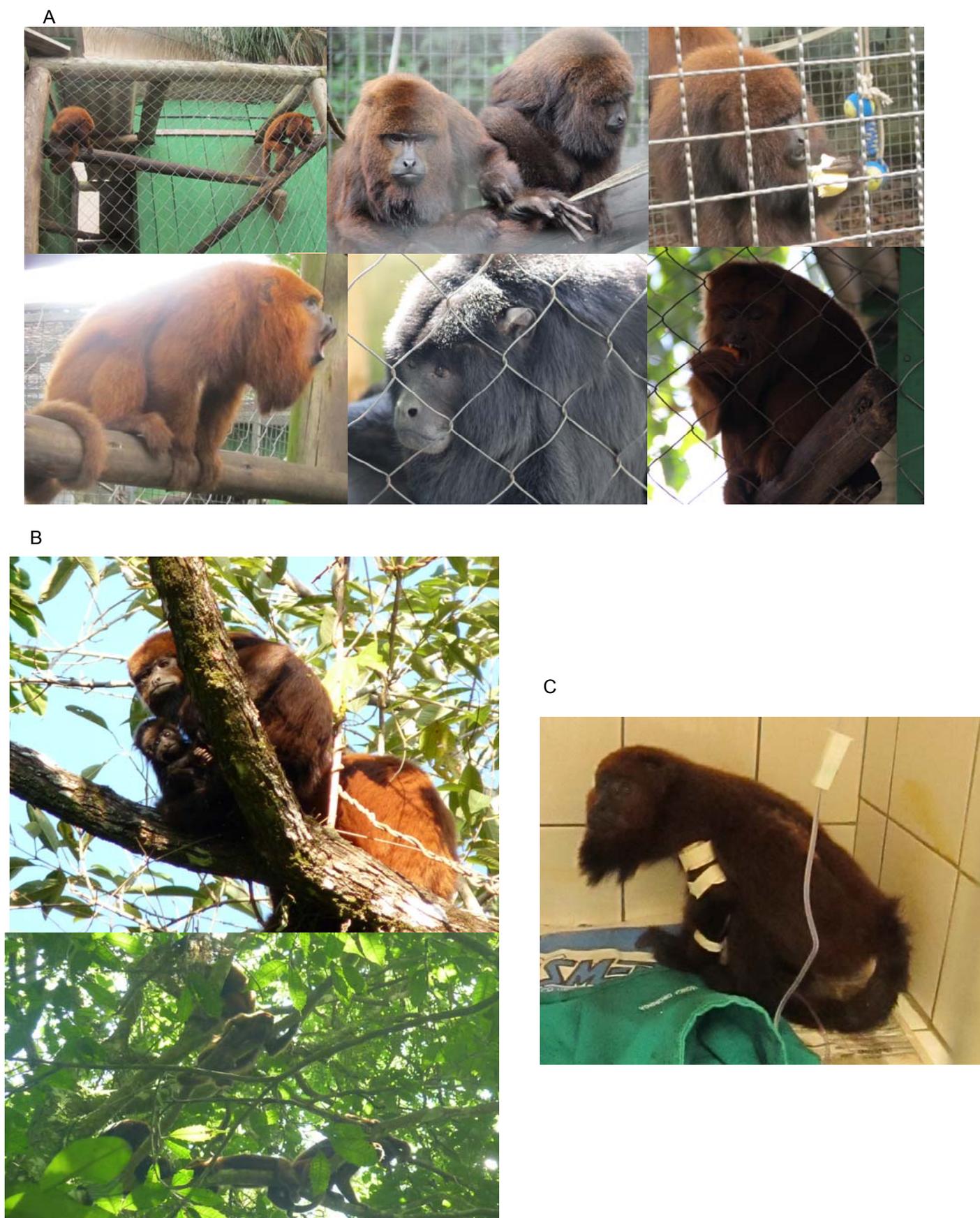
A área de colheita no estado de Santa Catarina compreende o município de Indaial, que faz parte do Vale do Itajaí-Açú. Este município é atravessado pelo Rio Itajaí-Açú, apresentando o bioma Mata Atlântica. Localiza-se a uma latitude 26° 53' 52" sul e a uma longitude 49° 13' 54" oeste, estando a uma altitude de 64 metros. Sua população, segundo dados do IBGE, estimada em

2011 era de 60.433 pessoas e apresenta área equivalente a 431km<sup>2</sup>. As amostras de *Alouatta guariba clamitans* foram obtidas de animais que residem no Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial – CEPESBI, de capturas realizadas na mata ao redor deste cativeiro em animais de vida livre e também de animais resgatados pela equipe do CEPESBI (Figura 10). O CEPESBI foi criado por meio da Lei Municipal n. 2099, de 20 de março de 1992, sendo mantido por um convênio entre a Prefeitura Municipal de Indaial e a Fundação Universidade Regional de Blumenau – FURB. O objeto de estudo do CEPESBI é a subespécie *Alouatta guariba clamitans* e as pesquisas realizadas visam tanto à conservação *in situ* quanto *ex situ*. Com relação aos estudos *in situ*, são realizadas pesquisas de ecologia e comportamento de populações em fragmentos de Mata Atlântica na região do Vale do Rio Itajaí-Açu, principalmente no Morro Geisler, região de mata atrás do CEPESBI (Figura 10 B e C). Já as pesquisas *ex situ*, envolvem a recepção, reabilitação e manutenção de espécimes em cativeiro. Além das pesquisas descritas, o CEPESBI recebe com frequência animais atropelados, mordidos por cães ou eletrocutados de Indaial e região, devido à grande proximidade dos centros urbanos a regiões de mata e conseqüentemente dos animais que nela habitam. Os animais recebidos são tratados e posteriormente devolvidos para a área onde foram capturados, de forma a serem reintroduzidos em seu habitat natural. O criadouro científico de animais silvestres do CEPESBI (registro IBAMA nº. 1/42/98/000708-90) é o único no Brasil especializado na subespécie e ao longo de 20 anos de atividade já recepcionou mais de 100 exemplares de bugios.



**Figura 10.** Área de colheita biológica em Santa Catarina. Em A, mapa do Estado de Santa Catarina, com a projeção do município de Indaial e as coordenadas do CEPESBI. Em B e C, foto do município de Indaial, mostrando a localização do CEPESBI (setas) e o Morro Geisler atrás (Fonte: Hirano, 2004).

Os animais mantidos no Criadouro Conservacionista CEPESBI vivem em recintos de aproximadamente 30 m<sup>2</sup> sozinhos, em casais ou em grupos, de acordo com o comportamento dos indivíduos. Eles recebem alimentação seis vezes ao dia, composta por frutas e verduras diversas, ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1®) e folhas de *Cecropia* sp. (embaúba) e *Sechium edule* (chuchu), além de serem acompanhados periodicamente por médico veterinário. Neste estudo, foram realizadas colheitas biológicas nos animais que residem no CEPESBI, animais coletados no Morro Geisler, bem como em animais recepcionados no Hospital Verinário da FURB que foram resgatados em Indaial e região (Figura 11). As Tabelas 4 e 5 apresentam as características dos animais de Santa Catarina incluídos no estudo.



**Figura 11.** *Alouatta clamitans* de cativeiro e de vida livre do município de Indaial, SC. **A.** Animais do cativeiro CEPESBI. **B.** Animais de vida livre do Morro Geisler. **C.** Animal resgatado vítima de atropelamento. **Fonte:** Junglos, 2010; Camargos-Costa, 2012; Michels, 2013.

Tabela 4. Descrição das amostras obtidas dos animais de cativeiro do CEPESBI-Indaial (SC).

	Nº de identificação	Apelido	FSE <sup>a</sup>	Data da colheita das amostras	Origem/ Procedência do animal	Tempo de cativeiro <sup>b</sup>
1	BL01	Gaspar	MA	26.10.10	Gaspar/vida livre	1
2	BL02*	Maitai	MA	26.10.10/09.05.12	Indaial/vida livre	4
3	BL09	Teka	FA	31.03.11	Blumenau/vida livre	2
4	BL10*	Coquinho	MA	04 e 07.04.11; 10/07/13	Blumenau/vida livre	8
5	BL11*	Cris	FA	04.04.11/18.10.12	Lages/vida livre	4
6	BL12*	Pingo	MA	09.04.11/18.10.12	Indaial/desconhecida	12
7	BL13	Joana	FA	09.04.11	São Bento do Sul/vida livre	2
8	BL14	Sharon	MA	09.04.11	Brusque/vida livre	8
9	BL15	Ozzy	MJ	09.04.11	Timbó/vida livre	3
10	BL16	Madu	MA	09.04.11	Laguna/vida livre	9
11	BL17	Ibirama	FA	09.04.11	Ibirama/cativeiro ilegal	5
12	BL18	Gucki	MA	09.04.11	São Bonifácio/vida livre	10
13	BL22	Bambino	MAS	09.04.11	Rodeio/cativeiro ilegal	4
14	BL25	Lion	MA	11.04.11	Blumenau/vida livre	8
15	BL26 <sup>d</sup>	Sorriso	FJ	12.04.11	Blumenau/vida livre	3
16	BL27 <sup>d</sup>	Anita	I	12.04.11	Blumenau/vida livre	3
17	BL28 <sup>d</sup>	Roni	I	12.04.11	Blumenau/vida livre	3
18	BL30	Panduva	FA	12.04.11	Panduva/cativeiro ilegal	9
19	BL31*	Laguna	FA	12.04.11/18.10.12	Laguna/desconhecida	10
20	BL32	Vitoria	FA	12.04.11	Rodeio/vida livre	7
21	BL33	Rodi	FA	12.04.11	Pomerode/zoológico	11
22	BL34	Bimbo	MA	12.04.11	Ascurra/cativeiro ilegal	10
23	BL35	Kalvin	MA	12.04.11	Lages/desconhecida	8
24	BL36	Ibirama	FA	12.04.11	Ibirama/cativeiro ilegal	7
25	BL37	Hit	MA	06.07.11	Blumenau/vida livre	2
26	BL38	Kali	MA	06.07.11	Massaranduba/cativeiro ilegal	11
27	BL39	Nino	MA	06.07.11	Desconhecida/desconhecida	12
28	BL40	Maçon	MA	06.07.11	Indaial/vida livre	3
29	BL41	Frida	FA	06.07.11	Blumenau/desconhecida	7
30	BL42*	Tedy	MA	06.07.11/18.10.12	Indaial/vida livre	8
31	BL43	Jack	MA	06.07.11	Campo Alegre/desconhecida	11
32	BL44	Sol	FA	06.07.11	Blumenau/vida livre	7
33	BL45	Scoby	MA	06.07.11	Indaial/desconhecida	8
34	BL46	Pepe	MA	07.07.11	Garuva/desconhecida	8
35	BL47	Michael	MJ	07.07.11	Indaial/nasceu em cativeiro	3†
36	BL48*	Menina	FA	07.07.11/18.10.12	Lages/desconhecida	9
37	BL49	Cacau	FA	07.07.11	Blumenau/desconhecida	12
38	BL50	Nicki	MA	07.07.11	Joinville/desconhecida	11
39	BL51*	Lili	FA	07.07.11/04.12.12	Joinville/desconhecida	5†
40	BL62*	Quity	FJ	26.06.12	Blumenau/vida livre	3
41	BL71 <sup>d</sup>	Karu	MJ	26.06.12	Indaial/nasceu em cativeiro	3
42	BL74 <sup>d</sup>	Zinha	FJ	17.08.12	Blumenau/vida livre	1
43	BL85	Raissa	FA	07.03.10	Pomerode/cativeiro	6†
44	BL88 <sup>d</sup>	Autona	FA	12.04.13	ND	ND
45	BL89 <sup>e, d</sup>	Toby	MA	2013	São Joaquim/cativeiro	10
46	BL90 <sup>c</sup>	João	MAS	24.08.08	Jaraguá do Sul/cativeiro	2,5†

<sup>a</sup>Faixa Sexo Etária. MA: macho adulto; MSA: macho subadulto; MJ: macho juvenil; MI:macho infante; FA: fêmea adulta; FSA: fêmea subadulta; FJ: fêmea juvenil; FI: fêmea infante.

<sup>b</sup> Tempo em anos

†Óbito.

ND: não declarado - sem informação.

\*duas coletas \*seis coletas

<sup>c</sup> somente soro, sem DNA

<sup>d</sup> somente DNA, sem soro

<sup>e</sup> *Alouatta caraya* (bugio preto), os outros animais são *Alouatta clamitans* (bugio ruivo)

**Tabela 5.** Descrição das amostras obtidas dos bugios de vida livre capturados no estado de Santa Catarina.

	Nº de identificação	Número de controle	FSE <sup>a</sup>	Data da colheita das amostras	Origem	Tipo de busca/ocorrência
1	BL03 <sup>c</sup>	Animal 001	FA	05.03.11	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
2	BL04 <sup>c</sup>	Animal 002	FJ	05.03.11	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
3	BL05 <sup>c</sup>	Animal 003	FA	06.03.11	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
4	BL06 <sup>c</sup>	Animal 004	FA	06.03.11	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
5	BL07 <sup>c</sup>	Animal 005	FA	08.03.11	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
6	BL08 <sup>c</sup>	Itoupava rega	FA	18.03.11	Testo Rega/ Blumenau	Busca passiva/
7	BL29	Animal 006	ND	12.04.12	Massaranduba	Busca passiva
8	BL58 <sup>c</sup>	ND	ND	03.02.12	Morro Geisler/Indaial	Busca ativa
9	BL59 <sup>c</sup>	230	ND	ND	km43 SC474 BNV	Busca passiva
10	BL 60 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND	Busca passiva
11	BL61 <sup>c</sup>	231	ND	10.03.12	Pomerode	Busca passiva/atropelamento
12	BL63 <sup>c</sup>	232	FA	11.04.12	Indaial	Busca passiva
13	BL64	233 (Deane)	MA	18.04.12	Pomerode	Busca passiva/atropelamento
14	BL68	234	FA	12.05.12	Blumenau	Busca passiva
15	BL69	235	FS	18.05.12	Blumenau	Busca passiva/atropelamento†
16	BL75 <sup>c</sup>	Fa	FA	17.08.12	ND	Busca passiva
17	BL82 <sup>c</sup>	236	ND	04.12.12	ND	Busca passiva
18	BL83	Grupo 13	FA	ND	Morro Geisler/Indaial	Busca Ativa
19	BL84 <sup>b</sup>	247	MA	15/07/13	Pomerode	Busca passiva
20	BL86 <sup>c</sup>	200	FA	06.04.11	Blumenau	Busca passiva/†
21	BL87 <sup>b</sup>	ND	FA	ND	Massaranduba	Busca passiva/eletrocução
22	BL91	239	FA	15.01.13	Blumenau	Busca passiva
23	BL92	238	FA	15.08.12	Blumenau	Busca passiva

<sup>a</sup>Faixa Sexo Etária. MA: macho adulto; MAS: macho subadulto; MJ: macho juvenil; MI:macho infante; FA: fêmea adulta; FSA: fêmea subadulta; FJ: fêmea juvenil; FI: fêmea infante.

†Óbito.

ND: não declarado - sem informação.

<sup>b</sup> somente soro, sem DNA.

<sup>c</sup> somente DNA, sem soro.

#### 4.2 Descrição da área de colheita no Paraná e no Mato Grosso do Sul

A área de colheita do estado do Paraná compreende o município de Porto Rico. Porto Rico está localizado no noroeste do estado, divisa com os municípios de Taquarussu e Bataiporã, Estado do Mato Grosso do Sul, a 230m de altitude, no Terceiro Planalto Paranaense, formação Arenito Caiuá. Esta região compreende o segmento entre a foz do Rio Paranapanema e a primeira ligação do Rio Ivinhema com o Rio Paraná. Apresenta população de 2.530 habitantes, área de 218 km<sup>2</sup> e o bioma caracterizado como de Mata Atlântica. A região possui importante população de primatas e as florestas encontradas na região são classificadas como Floresta Estacional Semidecidual com formação submontana ocorrendo principalmente ao lado esquerdo do rio Paraná e formação aluvial (florestas de inundação) principalmente nos diques marginais

da margem direita e nas ilhas. A tabela 6 apresenta as características dos animais incluídos no estudo desta região.

No Mato Grosso do Sul, foram coletadas amostras de PNHs do município de Taquarassu, próximo à região da colheita principal, Porto Rico (Figura 9). A cidade apresenta população estimada em 2013 de 3.570 indivíduos e área de 1.041,121km<sup>2</sup> (IBGE, 2013). As características biogeográficas e de ecossistema do município são similares as já descritas para Porto Rico. A Tabela 6 apresenta as características dos animais coletados nesta área.

**Tabela 6.** Número da amostra, espécie, faixa sexo etária e data da colheita dos primatas de vida livre capturados nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul.

	Amostra	Espécie <sup>a</sup>	FSE <sup>b</sup>	UF da Colheita	Data da colheita
1	19	CN	MA	PR	30/08/2004
2	21	CN	FA	PR	30/08/2004
3	23 <sup>c</sup>	CN	MJ	PR	01/09/2004
4	24 <sup>c</sup>	CN	MA	PR	01/09/2004
5	26	CN	FSA	PR	01/09/2004
6	27 <sup>c</sup>	CN	MJ	PR	01/09/2004
7	29	CN	FA	PR	02/09/2004
8	30	CN	FJ	PR	02/09/2004
9	31	CN	FA	PR	02/09/2004
10	62 <sup>c</sup>	CN	MA	PR	12/03/2005
11	63 <sup>c</sup>	CN	MAS	PR	12/03/2005
12	64 <sup>c</sup>	CN	MJ	PR	12/03/2005
13	65	CN	FA (IDOSA)	PR	13/03/2005
14	66	CN	MI	PR	13/03/2005
15	97	AC	MA	PR	14/08/2005
16	110	CN	MA	PR	18/09/2005
17	111	CN	MA	PR	18/09/2005
18	112	CN	FA	PR	18/09/2005
19	113	CN	MAS	PR	18/09/2005
20	114	CN	M	PR	18/09/2005
21	115	CN	MA	PR	18/09/2005
22	118	CN	FA(PRENHE)	PR	15/10/2005
23	119	CN	FA	PR	15/10/2005
24	120	CN	MA	PR	15/10/2005
25	122	AC	FA	PR	18/10/2005
26	125	AC	MAS	PR	19/11/2005
27	126	CN	MA	PR	20/11/2005
28	128	CN	MA	PR	20/11/2005
29	131	CN	MAS	PR	22/11/2005
30	132	CN	FSA	PR	22/11/2005
31	133	CN	MA	PR	22/11/2005
32	3	CC	FSA	MS	18/06/2004
33	4	CC	MA	MS	18/06/2004
34	71	CC	MA	MS	14/05/2005
35	73	CC	MA	MS	15/05/2005
36	74 <sup>c</sup>	CC	MA	MS	15/05/2005
37	75	CC	FA	MS	15/05/2005
38	76 <sup>c</sup>	CC	FJ	MS	16/05/2005
39	77 <sup>c</sup>	CC	FJ	MS	16/05/2005
40	78 <sup>c</sup>	CC	ND	MS	17/05/2005
41	79	CC	MA	MS	17/05/2005

<sup>a</sup>Espécies: AC: *Alouatta caraya*; CN: *Cebus nigritus*; CC: *Cebus cay*.

<sup>b</sup>Faixa Sexo Etária. MA: macho adulto; MAS: macho subadulto; MJ: macho juvenil; MI: macho infante; FA: fêmea adulta; FSA: fêmea subadulta; FJ: fêmea juvenil; FI: fêmea infante.

<sup>c</sup> sangue e soro (sendo as demais apenas de sangue)

### **4.3 Colheita de material biológico nos estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul**

As capturas realizadas nos animais de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul foram aprovadas pelo SISBIO (licenças n° 28953-1 e n° 28953-2 – Anexos I e II), IBAMA (licença 104/04) e pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB, SC - registro n° 003/12 – Anexo III) e da Universidade Estadual de Londrina (registro n° 34/05 – Anexo IV).

As colheitas de sangue e plasma em Indaial foram realizadas pelo veterinário colaborador Msc. Júlio César de Souza Junior. Os animais foram contidos fisicamente com auxílio de puçás para posterior administração intramuscular de 3,9 mg/kg da associação de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil®). Parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca e respiratória, reflexos oculares e temperatura foram monitorados até o retorno da anestesia. As amostras foram obtidas após desinfecção local e punção da veia femoral ou braquial. O sangue foi coletado com auxílio de seringas e agulhas compatíveis com o porte do animal e calibre do vaso. Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue de cada animal em tubos estéreis com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e sem EDTA, submetidos à refrigeração (4°C) até serem encaminhados para Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Bioquímica da Fundação Universidade Regional de Blumenau – FURB. No laboratório, do material coletado de cada um dos animais, foram separados 1 mL de sangue em tubos individuais para a extração a partir de sangue total, duas gotas de sangue foram adicionadas em papel de filtro comum, do tipo xaroposo (previamente embrulhados em papel alumínio e autoclavados individualmente) e o soro foi obtido por centrifugação (5 minutos, 3000 rpm). Em cada coleta, o material era enviado para o Laboratório de Malária (FIOCRUZ MINAS) segundo especificações legais.

Os animais provenientes do Paraná e Mato Grosso do Sul foram coletados pelo veterinário Dr. Walfrido Kühn Svoboda e equipe. Foram utilizadas armadilhas especialmente projetadas para cada espécie. Os animais foram contidos e as amostras coletadas segundo os mesmos critérios acima descritos para os animais de Santa Catarina. Alíquotas das amostras de sangue (1mL) e

soro foram enviadas ao laboratório de Malária (FOCRUZ MINAS) para posterior extração do DNA.

#### **4.3.1 Colheita de material e exames realizados em um dos animais do CEPESBI sintomático com suspeita para malária**

Em um dos animais do CEPESBI, foram coletadas duas amostras (05 e 07 de abril de 2011) de sangue com intervalos de 72 horas cada com e sem anticoagulante (EDTA) a partir da punção da veia femoral. No mesmo momento da primeira coleta de sangue, coletou-se urina em frascos plásticos apropriados. O sangue coletado foi utilizado para confecção dos esfregaços sanguíneos e extrações de DNA, e para os exames hematológicos e bioquímicos. Os valores hematológicos foram determinados utilizando-se o contador eletrônico Celldyn 1400®, onde foi possível obter o número de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), linfócitos e neutrófilos. O soro foi obtido por centrifugação (5 minutos a 3000 r.p.m.). As dosagens bioquímicas foram realizadas com kits comerciais BIOSYSTEMS® (Barcelona, ES) e submetidas ao analisador BTS 310 (BIOSYSTEMS®). Os testes incluíram a pesquisa de albumina, proteínas totais, uréia, creatinina, alanina amino transferase (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e amilase. O exame rápido de urina foi realizado com as tiras de teste Combur-Test® da Roche Diagnostics em uma única amostra.

### **4.4 Extrações de DNA**

#### **4.4.1 Extração a partir de sangue total**

A extração do DNA genômico dos indivíduos foi realizada utilizando-se o kit QIAGEN (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, para cada 1 mL de sangue total foram acrescentados 3 mL de solução de lise para eritrócitos. Após lise visível ( $\pm$  10 minutos), a mistura foi centrifugada a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi então removido e o material

ressuspendido em 1mL de solução de lise celular. Em seguida, foram adicionados 300µL de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido por 30s em agitador de tubos (vórtex), e centrifugado a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol P.A. (Merck) a 4°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 2000 x g, por 3 minutos, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1mL de etanol 70% para a lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000 x g, por 1 minuto, a 25°C. O sobrenadante foi novamente descartado e após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 15 min, o DNA foi hidratado com 330µL de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e incubado por 1 hora, a 65°C e o DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso. As composições das soluções utilizadas em cada um dos kits não são disponibilizadas pelo fabricante.

#### **4.4.2 Extração de DNA mediante sangue total em papel de filtro**

Para a extração do DNA genômico mediante sangue em papel de filtro foi utilizado o kit QIAGEN QIAamp® DNA mini kit (PUREGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA), que apresenta grande eficiência na extração para esse tipo de amostra. A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, os círculos de sangue em papel de filtro (dois círculos: ±60µL de sangue/papel) foram cortados e colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5mL. Foram adicionados 180µL de tampão de lise celular ao tubo, que foi incubado a 85°C, por 10 minutos. Foram acrescentados 20µL da solução de proteinase K e a mistura homogeneizada por 30s em agitador de tubos (vórtex) e incubadas a 56°C, por uma hora. Em seguida, foram adicionados 200µL de tampão de lise, os tubos homogeneizados novamente por 30s em agitador de tubos e incubados a 70°C, por 10 minutos. Foram adicionados 200µL de etanol P.A. (gelado) e o material homogeneizado. Posteriormente, todo o material (± 500µL de eluato) foi colocado em uma coluna QIAamp spin (agregada ao tubo de coleta de 2mL). Os tubos foram centrifugados a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C, em seguida, os tubos contendo o

filtrado foram descartados e as colunas colocadas em um novo tubo de 2 mL. Adicionou-se 500µL de tampão para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C. Em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo de 2mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µL de tampão para uma segunda lavagem do material e cada tubo foi centrifugado a 1500 x g, por 3 minutos, a 25°C. Cada coluna foi colocada em novos tubos de 1,5 mL. Foram acrescentados 150µL de água destilada para eluir o DNA, em seguida o material foi incubado a temperatura ambiente, por 1 minuto e centrifugado a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C. Finalmente as colunas foram descartadas e o DNA armazenado a -20°C até seu uso.

#### 4.4.3 PCR de citocromo B de mamíferos

A fim de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso e se os DNAs obtidos eram de qualidade satisfatória para a PCR, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR pra amplificar o gene citocromo B de mamíferos (iniciadores apresentados na Tabela 1). As amostras de DNA dos primatas não humanos deste estudo foram amplificadas através da PCR baseando-se na metodologia descrita por Kocher *et al.* 1993, com modificações. Este protocolo amplifica o gene citocromo B de mamíferos gerando um fragmento de 350 pb para primatas neotropicais. A reação foi realizada em volume de 20µL utilizando-se: 50-100 ng de DNA, 0,625µM de cada um dos iniciadores, 0,125µM de cada um dos dNTPs, 1,875mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da Taq DNA polimerase 10 X. As amplificações foram realizadas no termociclador **Mastercycler® personal** – Eppendorf, sendo as condições da PCR para a reação: 95°C por cinco minutos, 35 ciclos com 95°C por trinta segundos, 58°C por trinta segundos, 72°C por um minuto, após estes ciclos um passo de extensão a 72° C por seis minutos e 4°C por tempo ilimitado.

## **4.5 Diagnóstico específico de plasmódios**

### **4.5.1 Microscopia óptica**

O diagnóstico microscópico para malária foi realizado utilizando-se a técnica de esfregaço sanguíneo, corado com Panótico. O corante Panótico rápido (LABORCLIN) é utilizado na rotina do CESPESBI devido à sua praticidade no preparo de esfregaços sanguíneos. Após confecção dos esfregaços a lâmina seca foi rapidamente colocada por cinco vezes em cada um dos frascos de coloração do kit comercial. Em cada uma das etapas, a lâmina foi devidamente colocada em papel absorvente para retirar o excesso de corante no verso da lâmina. Finalmente, o verso da lâmina foi colocado sobre um filete de água corrente, para retirar o excesso de corante. Após este processo, a lâmina foi lida em microscópio óptico.

### **4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

#### **4.5.2.1 Nested-PCR**

Amostras de DNA obtidas dos primatas neotropicais foram amplificadas através da Nested-PCR baseando-se na metodologia descrita por Snounou *et al.* 1993, com modificações. A Nested-PCR amplifica na primeira reação um fragmento de 1200 pb (sequência gênero-específica) e na segunda reação sequências espécie-específicas são amplificadas. As reações foram realizadas em volumes de 20µL utilizando-se: 100-200 ng de DNA, 0,25 µM de cada um dos iniciadores, 10µL de Master Mix (PROMEGA-0,3 U Taq DNA Polimerase, 200µM de cada um dos dNTPs e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ Version7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: um ciclo de 95°C por cinco minutos, 58°C por dois minutos, 72°C por dois minutos, 24 ciclos de 94°C por um minuto, 58°C por dois minutos, 72°C por cinco minutos, 4°C por tempo ilimitado. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém com

29 ciclos, utilizando-se 0,8 µL do produto amplificado da primeira reação como DNA molde.

#### 4.5.2.2 PCR em Tempo Real

O Protocolo de PCR em Tempo Real utilizado neste trabalho foi baseado no descrito por Mangold *et al.*, 2005, com modificações. As reações foram realizadas em volumes de 20µL, utilizando-se de 100 - 200 ng de amostra de DNA, 0,5 µM de cada iniciador (BioSynthesis), 2,5mM de MgSO<sub>4</sub> e 10µL de SYBR Green PCR *master mix* 1x (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As amplificações e a detecção da fluorescência foram conduzidas no ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As condições da PCR foram um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos em 90°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos. Os tamanhos de fragmentos para cada espécie são: 205 bp, para *P. falciparum*, 120 bp, para *P. vivax* e 144 bp para *P. malariae*. Uma pequena variação entre as amplificações determinam que o intervalo das temperaturas de “*melting*” para cada espécie seja: 74 a 76°C para *P. vivax*, 71 a 73°C para *P. falciparum* e 70 a 72°C para *P. malariae*.

#### 4.5.2.3 Amplificação de outros alvos moleculares

As amostras de DNA foram também amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase utilizando-se outros alvos moleculares com o intuito de confirmar os macacos positivos pelo 18SSU rRNA (dois protocolos anteriores). Foram utilizados como alvo a região II da proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP - Duffy Binding Protein), os blocos 2 e 10 da proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1 blocos 02 e 10), a citocromo oxidase I (Cox1) e a proteína CSP (circunsporozoíta). Os alvos DBP, MSPs e Cox1 foram desenhados e padronizados por nosso grupo. Os demais iniciadores foram obtidos na literatura científica (Tabela 7).

**Tabela 7.** Variantes da PCR, alvos, sequências dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e referências das reações de PCR utilizadas no estudo para amplificação do DNA do parasito e dos primatas.

PCR	Alvo	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Referência
Nested 1ª Reação	Gene 18S de <i>Plasmodium sp</i>	rPLU5 rPLU6	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3' 5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG3'	1200pb	Snounou <i>et al.</i> 1993
Nested 2ª Reação	Gene 18S de <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	rVIV1	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3'	120 pb	Snounou <i>et al.</i> 1993
		rVIV2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'	205 pb	
		rFAL1	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3		
		rFAL2	5'ACACAATGAACCTTCAATCATGACTACCCGTC3'		
		rMAL1	5'ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCGC 3'	144 pb	
		rMAL2	5'AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA3'		
PCR em Tempo Real	gene 18S de <i>Plasmodium sp</i>	P1 P2	5' TAA CGA ACG AGA TCT TAA 3' 5' GTT CCT CTA AGA AGC TTT 3'		Mangold <i>et al.</i> 2005
PCR Convencional	dbpII <i>P. vivax</i>	NDBP2F NDBP2R	5' ATGTATGAAGGAACCTTACGAAT 3' 5' ACCTGCCGTCTGAACCTTTT 3'	650 pb	Sousa <i>et al.</i> 2010
PCR Convencional	Gene CSP de <i>P. vivax</i>	CSF CFR	5' GCAGAACCMAAAAATCCACGTGAAAATAAG3' 5' CCAACGGTAGCTCTAACTTTATCTAGGTAT 3'	500 pb	Patil <i>et al.</i> 2010
PCR Convencional	Gene MSP-1BL10 de <i>P. vivax</i>	MSP1b10F MSP1b10R	5' CAAGCCTACCAAGAATTGATCCCAA 3' 5'ATTACTTTGTCGTAGTCCTCGGCGTAGTCC 3'	260 pb	de Araujo <i>et al.</i> 2012
PCR Convencional	Gene MSP-1BL 2 de <i>P. vivax</i>	MSP1b12F MSP1b12R	5' GACGATATTGGAAAATTGGA 3' 5'CTCCTTCAGCACTTTCACGCGCTT 3'	444 pb	de Araujo <i>et al.</i> 2012
PCR Convencional	Citocromo B de mamíferos	cyBF cyBR	5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3' 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'	350 pb	Kocher <i>et al.</i> 1989
PCR Convencional	Citocromo Oxidase I de <i>P. vivax</i>	COI1 COI2	5' CGCTGGGACTGTATGGAT 3' 5'ACCAAATAAAAATGAAAACCATA 3'	143 pb	Este estudo
PCR Convencional	gene DARC de primatas neotropicais	KAT035R	5'GGAAGTGAAGTCAAAGGCAAAGG 3'	500pb	Demogines <i>et al.</i> 2011 Oliveira <i>et al.</i> 2011
		KAT031F	5'CTTCGGTAAAATGCCCACTTTCTGG 3'		
		AD501R	5' CATACCAGACGCAGTAGCC 3'	231pb	
		DARCP5F	5' ACTGCCCTTCTTCATCCTC 3'		

*dbp<sub>II</sub>*: a PCR utilizada para amplificar a região II do gene que codifica o antígeno Duffy (DBP- Duffy Binding Protein) amplifica um fragmento de 675 pares de bases e foi realizada de acordo com o protocolo de Souza *et al.* 2010, com modificações. Para cada reação foi utilizado um volume de 10 µL contendo 100-200 ng de DNA, 0,5µM de cada iniciador, 1,25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,75mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U da enzima *Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA)* e o tampão da enzima. As amplificações foram conduzidas no termociclador automático PTC-100™ Version7.0 - *Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Massachusetts, USA)*. As condições da PCR foram um ciclo 94°C por três minutos, 35 ciclos com 94°C por trinta segundos, 61°C por trinta segundos e 72°C por 2 minutos. Após estes ciclos um passo de extensão a 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

*msp-1 (blocos 02 e 10)*: as PCRs utilizadas para amplificação dos blocos mais polimórficos da MSP-1 (BL2 e BL10) foram baseadas nos protocolos de Araujo 2012, com modificações. Para cada reação foram utilizados dois pares de iniciadores, um mais externo e outro interno. A primeira reação foi realizada em um volume de 10µL utilizando-se de 100-200 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador (um par de iniciadores para a MSP-1 BL02 e outra para o BL10), 0,125 mM de dNTPs, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de *Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA)* e o tampão da enzima. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e as condições da PCR foram, para a reação do MSP-1 BL02 externo: 94°C por quatro minutos, 30 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por trinta segundos, após estes ciclos um passo de extensão a 72° C por cinco minutos e 4°C por tempo ilimitado. As condições para a reação da MSP-1 BL10 externo foram as mesma descitas para o bloco 02, sendo apenas a temperatura de anelamento alterada para 63°C. A segunda reação de PCR para os dois blocos foi realiza em um volume final de 20µL utilizando-se 1µL de DNA da primeira reação diluído 1:100 para a MSP-1 BL10 e 1:50 para a MSP-1 BL02, 0,5 µM de cada iniciador 0,125 mM de dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de *Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA)* e o tampão da enzima. As amplificações foram realizadas no mesmo temociclador da primeira reação e as

condições da PCR foram, para a reação do MSP-1 BL02 interno: 94°C por quatro minutos, 25 ciclos com 94°C por quarenta segundos, 63°C por um minuto, 72°C por quarente segundos, após estes ciclos um passo de extensão a 72° C por dez minutos e 4°C por tempo ilimitado. Já para a MSP-1 BL10 interno, as condições foram idênticas ao BL02 interno, exceto para a temperatura de anelamento que foi de 60°C.

*cox1*: para amplificação de um fragmento da citocromo oxidase 1 foi realizado um protocolo PCR convencional que amplifica um fragmento de 143 pb. Os iniciadores foram desenhados através do programa *Oligo 6.4* (*Molecular Biology Insights*, Colorado, USA). A reação foi padronizada em volume de 20µL utilizando-se: 100-200 ng de DNA, 1 µM de cada um dos iniciadores, 0,125µM de cada um dos dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da enzima. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA) e as condições da PCR foram: 94°C por cinco minutos, 40 ciclos com 94°C por trinta segundos, 60°C por trinta segundos, 72°C por trinta segundos, após estes ciclos um passo de extensão a 72° C por cinco minutos e 4°C por tempo ilimitado.

*csp*: a amplificação do gene CSP (circunsporozoíta) foi baseada no protocolo de Patil e colaboradores (2010) que amplifica um fragmento de 500 pb. A reação foi realizada em volume de 20 µL utilizando-se: 100-200 ng de DNA, 0,5 µM de cada um dos iniciadores, 0,125 µM de cada um dos dNTPs, 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da enzima. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA) e as condições da reação foram um ciclo de 95°C por cinco minutos, 40 ciclos com 94°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por dois minutos, após estes ciclos um passo de extensão a 72° C por cinco minutos e 4°C por tempo ilimitado.

#### 4.5.2.4 Amplificação do gene DARC de primatas neotropicais

Para amplificar duas regiões do receptor para quimiocinas DARC de primatas foram utilizados dois pares de iniciadores a partir dos protocolos descritos por Demogines e colaboradores (2011) e Oliveira e colaboradores (2012), com modificações. Todas as reações foram padronizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). O primeiro par de iniciadores (KAT031 e KAT035) descrito por Demogines *et al.* (2011) amplifica um fragmento de 500 pb que compreende a região do primeiro exon e o promotor do gene. A reação foi realizada em um volume final de 20 µL utilizando-se: 100-200 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 0,125 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da enzima. As condições da PCR foram: 94°C por três minutos, 35 ciclos com 94°C por quarenta segundos, 64°C por quarenta segundos, 72°C por um minuto, após estes ciclos um passo de extensão a 72°C por cinco minutos e 4°C por tempo ilimitado. O segundo par de iniciadores foi utilizado para amplificar uma região do éxon 2, gerando um produto de 231 pares de bases. O iniciador senso, denominado DARCP5 foi descrito por Oliveira *et al.* (2012) e o iniciador anti-senso AD501 foi descrito por Demogines *et al.* (2011). A última base deste último iniciador foi retirada para melhorar a estabilidade do mesmo. A reação foi realizada em um volume final de 20 µL utilizando-se de 100-200 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 0,125 mM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da enzima a 10 X. As condições da reação foram: 94°C por três minutos, 35 ciclos com 94°C por quarenta segundos, 56°C por quarenta segundos, 72°C por um minuto, após estes ciclos um passo de extensão a 72°C por cinco minutos e 4°C por tempo ilimitado.

#### 4.5.2.5 Visualização dos fragmentos por gel de agarose

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em eletroforese em gel contendo 2% de agarose (*Invitrogen*) dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), sendo adicionados 5 µg/mL de brometo de etídio (*Invitrogen*). As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra

Orange 5X (Alaranjado G da VETEC e Ficol da Sigma) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V, por cerca de 30 minutos em TAE 1X. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e arquivado em sistema digital.

#### 4.5.2.6 Controles das reações de PCR e iniciadores utilizados

Em todos os ensaios de PCR foram utilizados controles positivos e negativos nas reações. Como controles negativos foram utilizados DNAs de humanos não expostos a malária de região não endêmica, bem como de espécies de primatas neotropicais refratários ao *P. simium*/*P. vivax*. Como controles positivos foram utilizados: (i) DNA de *P. falciparum*, cepa 3D7 mantida no Laboratório de Malária (CPqRR-FIOCRUZ MINAS); (ii) DNA de paciente com alta parasitemia para *P. vivax* e DNA de *P. vivax*/*P. simium* obtido de símio com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica; (iii) DNA de *P. brasilianum* do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA). Os iniciadores utilizados neste estudo estão demonstrados na Tabela 7.

#### 4.6 Amplificação e Genotipagem dos marcadores moleculares

Os parasitos foram genotipados utilizando-se os marcadores polimórficos da MSP-1 (blocos 02 e 10) e 11 loci de microssatélites identificados pelo nosso grupo (Rezende *et al.* 2010). Os loci encontram-se amplamente distribuídos ao longo do genoma do *P. vivax* em diferentes cromossomos (cromossomos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 13 e 14) e com baixo desequilíbrio de ligação entre eles (Rezende *et al.* 2010). Os microssatélites PvMS1, PvMS2, PvMS3 e PvMS4 possuem repetições de dinucleotídeos, os microssatélites PvMS5, PvMS6 e PvMS7 possuem repetições de trinucleotídeos e os microssatélites PvMS8, PvMS9, PvMS10 e PvMS11 possuem repetições de tetranucleotídeos.

Com estes marcadores moleculares buscou-se uma possível diferenciação entre os parasitos humanos e simianos. As análises de genotipagem se

baseiam na eletroforese capilar em sequenciador automático dos fragmentos amplificados por PCR dos loci de microssatélites e regiões polimórficas da proteína MSP1 para a determinação exata dos tamanhos dos alelos. A Tabela 8 representa os marcadores testados no presente estudo e suas características.

**Tabela 8.** Características dos marcadores moleculares de *P. vivax*.

<b>Marcador Molecular</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Unidade Repetitiva*</b>
PvMS1	12	GT <sub>9</sub>
PvMS2	3	CA <sub>12</sub>
PvMS3	8	TA <sub>18</sub>
PvMS4	6	TA <sub>21</sub>
PvMS5	3	CAT <sub>10</sub>
PvMS6	14	TGA <sub>19</sub>
PvMS7	2	TAA <sub>22</sub>
PvMS8	13	TGTA <sub>7</sub>
PvMS9	6	CATA <sub>11</sub>
PvMS10	5	TATG <sub>14</sub>
PvMS11	8	CATA <sub>49</sub>
MSP1b12	7	-
MSP1b10	7	-

\* os números representam quantas vezes aquela unidade está repetida. PvMS: microssatélites de *P. vivax*. MSP-1b1: Merozoite surface antigen 1 blocos 2 e 10. Marcadores descritos por Rezende e colaboradores (2010) e de Araujo e colaboradores (2012).

Para cada reação de amplificação dos marcadores foi utilizado um volume de reação de 20 µL contendo 1µM de cada iniciador (senso e antisenso descritos na Tabela 5), 0,125 mM de dNTP (desoxiribonucleotídeos), 1 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da enzima a 10 X. A ciclagem para as reações de amplificação foram padronizados do seguinte modo: 94°C por 2 minutos, 35 ou 40 ciclos com 94°C por 30 segundos, 50°C a 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. Após estes ciclos um passo de extensão final foi realizado a 72°C por 2 minutos. Todas as especificações citadas foram utilizadas de acordo com os protocolos descritos por Rezende *et al.* 2010, com modificações. Para a amplificação de todos os marcadores foi utilizado o termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). As especificações da amplificação da MSP1 blocos 2 e 10 já foram especificadas

anteriormente. Os iniciadores utilizados na genotipagem dos microssatélites estão especificados na Tabela 9 e dos blocos polimórficos da MSP-1 foram representados na Tabela 7.

**Tabela 9.** Descrição dos iniciadores e condições de amplificação dos microssatélites.

Microssatélite	Senso (5' - 3')	Anti-senso (5' - 3')	Tm	[Mg <sup>+2</sup> ]
PvMS1	CTATCTGAGGAATGGGA	ATTTACTATGACGAAGGTGA	53,4°C	1,50mM
PvMS2	CATCATTGGGTAAGTCGGG	GCAGCCACAAAATCAACACC	60,0°C	1,50mM
PvMS3	GGGAAGCACAAAATCGTA	TCAGCAGGGACAAAACG	60,0°C	1,50mM
PvMS4	TTATTTCCCCCTTTGCC	AAATGGATGTTCTTGTCAA	55,7°C	1mM
PvMS5	TGCTATTTGCTCGTCTGT	GAGCGTTATCATCATTAG	56,0°C	1,50mM
PvMS6	ACACATTTGACACAGTTCC	ATGCCCTGGTCCCTACAA	58,6°C	1,50mM
PvMS7	GTATTTCCCGTCTTGTCC	CTTTGTCCGTTCTTATTTCT	56,0°C	1,50mM
PvMS8	TCCGTTGTTTGTGCCC	CACTTGTTGTTCCGCTC	60,0°C	1,50mM
PvMS9	TGTGGATAAGGGGAAAAA	TTTTTTTCTTGAGTTTACG	50,0°C	0,75mM
PvMS10	AAGTGTATTTCCCGACG	CTTTTGCTTGTCCGTTT	54,7°C	1,50mM
PvMS11	CGATGCGTTCACTTGGAT	TATTCTTCTCCCCTCGTG	54,0°C	0,75mM

A genotipagem dos marcadores foi realizada no sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems, Califórnia, USA). Para cada reação foram utilizados os produtos de PCR com iniciadores senso marcados com fluoresceína ET-ROX em placas de 96 poços do modelo “Ultraamp™ Skirted 96 PCR Plate” (marca Sorenson BioScience TNC). Em cada poço da placa foram adicionados 7,75 µL de Formamida HI-DI™ 20 a 0,1%, 0,25 µL do padrão de peso molecular MegaBACE™ ET550-R Size Standard (GE Healthcare) e 2 µL do produto amplificado. As amostras foram homogeneizadas na placa, logo em seguida a placa foi centrifugada por um tempo suficiente para que as gotas na parede de cada poço baixassem. A placa foi então armazenada a 4°C até que fosse analisada. Antes das amostras serem lidas no aparelho, elas foram desnaturadas a 94°C por 1 minuto. Após a leitura das amostras, os resultados da eletroforese capilar foram analisados utilizando o programa GeneMapper® Software versão 4.1 (Applied Biosystems, Califórnia, USA), o qual possibilita a verificação dos picos na corrida e posterior identificação dos tamanhos dos fragmentos amplificados.

Para cada um dos marcadores moleculares, foi considerado apenas o pico com maior altura correspondente ao alelo predominante.

## **4.7 Sequenciamento de DNA**

### **4.7.1 Purificação dos produtos de PCR**

Para o sequenciamento de DNA, cada amostra foi purificada a partir do produto de PCR em reações de 50  $\mu$ L, utilizando-se o kit de purificação Qiagen (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA). Inicialmente, foram adicionados 5 X do volume do tampão PB para cada do volume da reação de PCR, homogeneizando completamente. Em seguida, a mistura foi colocada na coluna QIAquick acoplada a um tubo de coleta de 2mL fornecido no kit e centrifugada a 12000 rpm por 60 segundos. Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no mesmo tubo. Foram acrescentados 0,75 mL de tampão PE à coluna QIAquick, centrifugando por 60 segundos a 12000 rpm, Em seguida o filtrado foi descartado e a coluna recolocada para mais um passo de centrifugação por um minuto, em rotação máxima. Finalmente, a coluna QIAquick foi acoplada a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, onde foram adicionados 30  $\mu$ L do tampão EB (Tris 10 mM, pH 8,5) ou água (pH 8,5) no centro da membrana para eluir o DNA. O material foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm e armazenado a 4°C até o uso. Cada um dos produtos foram analisados em gel de agarose corado com brometo de etídio e dosados em espectrofotômetro Nanodrop®.

### **4.7.2 Reação de Sequenciamento**

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As reações foram conduzidas com um volume final de 10  $\mu$ L utilizando-se em torno de 100 ng de DNA, 3,3  $\mu$ M de iniciador (senso ou anti-senso), 1  $\mu$ L do mix Big Dye® Terminator e seu tampão. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), sendo as condições da amplificação: 96°C por um minuto, 35 ciclos a 96°C por quinze segundos, 60° C

(variando de acordo com a temperatura do iniciador) por quinze segundos e após estes ciclos, um passo de extensão final a 60° C por quatro minutos.

#### 4.7.3 Reação de precipitação

Para precipitação do DNA, em cada poço da placa MicroAmp 96-well Reaction plate (Applied Biosystems, Califórnia, USA) foram adicionados 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetado de amônio 7,5 M e 50 µL de etanol absoluto P.A. gelado. Em seguida, a placa foi selada e vortexada brevemente. Logo após, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 45 minutos a 3700 r.p.m. também em temperatura ambiente. A placa foi vertida e o sobrenadante foi descartado. Em cada poço foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700 r.p.m. em temperatura ambiente e foi vertida de forma que o sobrenadante fosse descartado. Em seguida a placa foi centrifugada em posição invertida a 3700 rpm por dois minutos. Finalmente, o DNA foi ressuspenso com formamida HI-DI™ (Applied Biosystems, Califórnia, USA). A placa foi novamente selada e vedada em papel alumínio e analisada pela plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ MINAS, conforme procedimentos de rotina.

#### 4.8 Análise *in silico* das sequências de DNA

Os dados brutos obtidos do sequenciador automático ABI foram inicialmente analisados no programa BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), a fim de se confirmar o gene sequenciado e a espécie. Cada sequência foi também analisada individualmente pelo Chromas Lite versão 2.1.1 (Technelysium 1998 – 2012), que fornece o “*base-calling*”, onde é possível avaliar a qualidade dos cromatogramas gerados pelo sequenciador automático, sendo considerado apenas um valor de Phred acima de 30. Os alinhamentos das sequências e a obtenção da sequência consenso foram realizados com o software de alinhamento múltiplo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (Huang, 1992), dentro do pacote de programas

*BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (Hall, 1999). No *BioEdit*, quando necessário, foi realizada a edição manual do alinhamento dos genes sequenciados. O alinhamento também foi realizado utilizando o software *Muscle*, implementado no *MEGA* e as sequências de referência, como as obtidas da cepa Sal-1 de *P. vivax* retiradas do NCBI no formato FASTA, foram utilizadas para orientar os alinhamentos das sequências de *Plasmodium*. Cada amostra foi sequenciada pelo menos três vezes para confirmação dos polimorfismos do DNA. O mesmo procedimento foi feito para as duas regiões do gene DARC de primatas sequenciadas neste estudo.

#### 4.8.1 Análise da diversidade genética

Para as análises de diversidade genética, o número de sítios segregantes (S), haplótipos (H), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e os desvios padrões correspondentes foram determinados utilizando o software *DnaSP* versão 5.10 (Librado & Rozas, 2009). A diversidade nucleotídica, ou seja, o número médio de diferenças nucleotídicas entre quaisquer duas sequências amostradas de maneira aleatória foi calculada de acordo com Nei (1987):

$$\pi = n/(n-1) \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

onde  $n$  é o número de sequências analisadas,  $p_i$  e  $p_j$  são as frequências das sequências  $i$  e  $j$ , respectivamente, na amostra e  $\pi_{ij}$  é a proporção de diferenças nucleotídicas entre as sequências  $i$  e  $j$ . A diversidade haplotípica, definida como a probabilidade de amostrar aleatoriamente dois haplótipos distintos em uma população, foi calculada de acordo com Nei (1987):

$$H_d = [n/(n-1)] [1 - \sum_{i=1}^k p_i^2]$$

onde  $n$  é o número de isolados do parasito analisados e  $p_i$  é a frequência do haplótipo  $i$  na amostra (Nei, 1987).

#### 4.8.2 Visualização das estruturas proteicas 3-D

Foi utilizado o software *PyMol* v1.0 (Wijeyesakere *et al.*, 2007) para a visualização dos polimorfismos na estrutura tridimensional do dímero formado entre os domínios de ligação de duas proteínas PvDBP de *P. vivax* (3RRC-<http://www.rcsb.org/>).

#### 4.8.3 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas no software MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Saitou & Nei, 1987) implementado no programa. A consistência dos padrões de agrupamento na árvore foi avaliada através do método de bootstrap com 5000 repetições. O modelo evolutivo para cada conjunto de dados foi selecionado pelo MEGA, que elege entre as matrizes de substituição candidadas, o modelo evolutivo que melhor se adequa para cada conjunto de dados para posterior construção da filogenia. O modelo evolutivo mais apropriado para cada conjunto de dados foi definido por análise de máxima verossimilhança realizada no software MEGA, que calcula a qualidade relativa de um modelo de substituição para um conjunto de dados estabelecido. Para as análises dos genes DBP, DARC e MSP-1 Bloco 2 (I) foi utilizado o modelo de substituição Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85). Este modelo combina as diferenças nas taxas de transição e transversão com a frequência desigual das bases. Para as análises dos genes 18S RNA e MSP-1 bloco 10 utilizou-se o modelo de substituição nucleotídica TN93 descrito por Tamura e Nei (1993). Esse modelo assume que a diferença na composição das bases reflete as diferenças nas taxas de transições e transversões e também nas taxas de transição entre as purinas e entre as pirimidinas.

Todas as figuras das árvores filogenéticas foram geradas no software MEGA 5.0 a partir dos arquivos de saída no formato gráfico PNG. As sequências de genes ortólogos das espécies *P. cynomolgi* e *P. knowlesi* foram utilizadas como grupo externo na análise filogenética da DBP. Para as análises

do 18S, foram utilizados ortólogos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Já para o gene MSP-1 foram utilizadas apenas sequências de *P. vivax*.

#### 4.8.4 Sequências de DNA utilizadas

Todos os alvos gênicos utilizados no presente estudo, bem como as informações das sequências obtidas estão listados abaixo.

**DBP<sub>II</sub>**: para a região II da DBP, foram utilizadas as sequências de diferentes espécies, com seus respectivos números de acesso: *P. cynomolgi* 1 (XM004221494), *P. cynomolgi* 2 (XM004220981), *P. knowlesi* alpha (M90466), *P. knowlesi* beta (M90694), *P. knowlesi* gamma (M90695). Para o *P. vivax*, foi utilizada uma sequência representativa de cada haplótipo (frequência igual ou superior a 1%) gerado a partir de 511 sequências do mundo a partir de um trabalho anterior realizado por nosso grupo (ANEXO V).

**DARC**: Para as análises de DARC, foram utilizadas sequências de diferentes espécies de PNHs, descritas com seus respectivos números de acesso nos ANEXOS VI e VII.

**MSP-1 blocos 02 e 10**: Para as análises dos blocos polimórficos da MSP-1, foram utilizadas as sequências completas do gene da MSP-1 de *P. vivax* representadas no ANEXO VIII.

**18S**: Para as análises do gene 18S, foram utilizadas sequências de espécies distintas representados no ANEXO IX.

#### 4.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra antígenos de *P. vivax* em soros de primatas de Mata Atlântica

A detecção de anticorpos IgG anti-PvDBP<sub>II</sub>, anti-MSP1 e anti-AMA1 em soros de primatas não humanos foi realizada pela técnica de ELISA, modificado a partir de Cerávolo e colaboradores (2008). Resumidamente, as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> recombinantes foram gentilmente cedidas pela colaboradora Irene Soares do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo - USP. A proteína PvDBP<sub>II</sub> foi produzida pelo nosso grupo segundo protocolo publicado previamente (Ceravolo *et al.*, 2008). As proteínas foram utilizadas para sensibilizar placas de 96 orifícios nas concentrações de 3µg/mL (DBP<sub>II</sub>), 1µg/mL (MSP1<sub>19</sub>), 1µg/mL (AMA-1) e mantidas a 4°C por 12 - 16 horas em PBS 1 X. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1 x pH7,2 + 0,05% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) por 1 hora. Em seguida, soros diluídos 1:100 foram adicionados nas placas e incubados durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas e acrescentou-se 100µL do conjugado anti-IgG de *Macaca mulata* ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:80.000. A revelação foi realizada com uma solução contendo 10 mg de OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride substrate - Sigma-Aldrich, USA) diluído em 50 mL de tampão citrato de sódio (0,1M pH 5,0) na presença de 40 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30% (Sigma-Aldrich). Paralelamente a PvDBP, a Glutathione S-Transferase de *Schistosoma japonicum* (GST - Sigma-aldrich) também foi utilizada nos ensaios de ELISA, uma vez que a PvDBP foi produzida fusionada à GST. Os valores de densidade óptica (DO<sub>492nm</sub>) de cada soro testado contra a PvDBP foram corrigidos do valor obtido para a proteína controle, GST. A PvMSP-1<sub>19</sub> e a Pv AMA-1 foram produzidas fusionadas à cauda de histidina (6xHis). O ponto de corte de positividade (*cut off*) para cada uma das proteínas foi determinado pela DO<sub>490nm</sub> dos soros de seis macacos bugios sabiamente negativos e não expostos à malária do cativeiro de São Paulo, gentilmente cedidos pela Dra. Rosely Malafronte (USP) acrescidos de 3 desvios padrões. Os resultados foram expressos pelo índice de reatividade (OD<sub>492</sub> dividida pelos valores do cut-off).

#### 4.10 Ensaio funcional da interação ligante-receptor

##### 4.10.1 Ensaio de adesão entre a PvDBP e DARC de *Alouatta clamitans*

As células COS-7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) foram transfectadas com a região II do gene que codifica a DBP da cepa Sal-1 de *P. vivax*. A transfecção foi realizada utilizando-se lipofectamina e reagente *Plus* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), nas concentrações e protocolos indicados pelo fabricante. Resumidamente, as células COS-7 foram adicionadas às placas de cultura de seis poços (Nunc, Denmark) ( $1,5 \times 10^5$  células/poço) e então transfectadas com 0,5µg/poço de DNA plasmidial (cepa Sal-1/*P. vivax*) e complexos de lipossomos (5% de reagente *Plus* e 3% de lipofectamina) em meio de cultura DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD) sem soro bovino fetal (SBF) (meio DMEM incompleto). Este meio incompleto contém 25 mM de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25 mM de HEPES (Sigma). Após 6h de incubação do complexo lipossoma-DNA (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade), o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM contendo 10% SBF (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 25 mM de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), sendo as placas incubadas a 37°C. Após 24 h, o meio de cultura foi novamente substituído por meio DMEM completo, e a eficiência da transfecção verificada por meio da visualização das células em um microscópio invertido de fluorescência, uma vez que as células transfectadas expressam fluorescência verde. Quarenta e oito horas após a transfecção, as placas foram lavadas com meio DMEM incompleto, e as células incubadas com os eritrócitos de dois dos primatas não humanos do cativeiro CEPESBI (37°C, 1h, 5% de CO<sub>2</sub>) diluídos em meio DMEM incompleto. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2h. Ao final da incubação as placas foram lavadas, três vezes com meio DMEM incompleto, para que os eritrócitos não aderentes fossem retirados. Logo após, cada placa foi analisada sob microscópio invertido de fluorescência para a contagem de rosetas. As rosetas formadas a partir da interação ligante-receptor foram quantificadas (20 campos/poço) em um microscópio estereoscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase

(200x) (Nikon, Melville, NY, USA). As rosetas só foram quantificadas quando eritrócitos aderentes cobriram mais que 50% de sua superfície celular (Michon *et al.*, 2000).

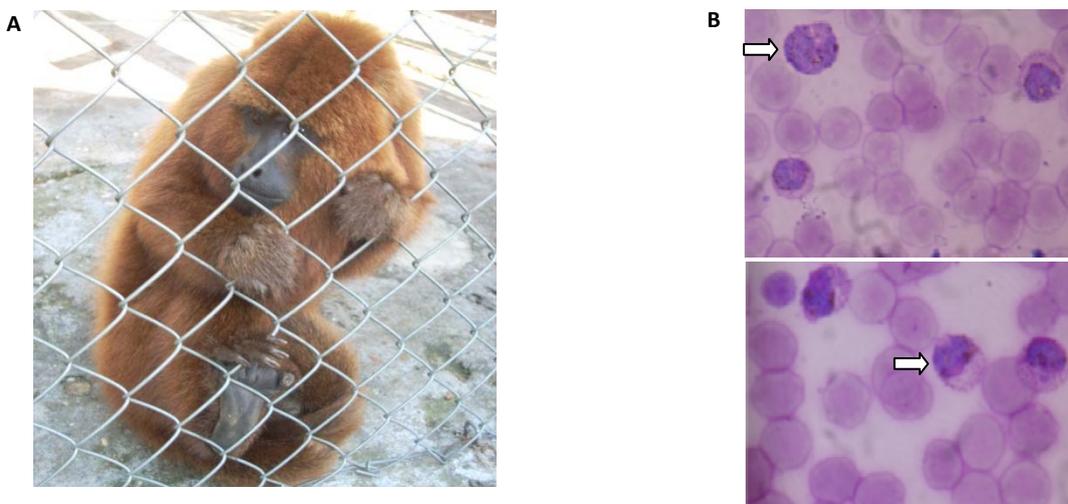
#### **4.10.2 Ensaio de inibição da interação entre a PvDBP e DARC de *Alouatta clamitans***

Para o ensaio de inibição, foi utilizado mesmo protocolo de transfecção descrito acima. Porém, 48 horas após a transfecção, as placas foram lavadas com meio DMEM incompleto, e as células incubadas com soros de oito primatas não-humanos (37°C, 1h, 5% de CO<sub>2</sub>) diluídos em meio DMEM incompleto. Posteriormente, foram adicionados 200 µL/poço de uma solução a 10% de eritrócitos humanos O<sup>+</sup>/DARC positivos (Fy<sup>a</sup>Fy<sup>b</sup>) em meio DMEM completo e as placas incubadas à temperatura ambiente por 2h. Separadamente, foram feitos dois controles, um na ausência de soro e outro na ausência de soro e adicionando 200 µL/poço de uma solução a 10% de eritrócitos humanos O<sup>+</sup>/DARC negativo (Fy<sup>a-</sup> b<sup>-</sup>) em meio DMEM completo e as placas incubadas a temperatura ambiente por 2h. Ao final da incubação as placas foram lavadas por três vezes com meio DMEM incompleto, para que os eritrócitos não aderentes fossem retirados. Finalmente, cada placa foi lida no microscópio de fluorescência para o cálculo da porcentagem de inibição da interação. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula  $100 \times (Rc - Rt)/Rc$ , onde *Rc* é a média do número de rosetas presente no controle sem anticorpo e *Rt* a média do número de rosetas presentes nos soros-testes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização de infecção malárica em bugio sintomático

No Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, SC, foi identificado, em abril de 2011, um bugio apresentando hiporexia, fraqueza, apatia e tremores musculares intermitentes no acompanhamento realizado pelos tratadores (Figura 12A). No exame clínico detalhado realizado pelo veterinário responsável, o bugio apresentou as mucosas oral, ocular e prepucial pálidas, leve desidratação, perda de massa muscular e peso corporal, taquicardia e taquipneia e temperatura corporal de 38,8° C. Foram realizadas duas colheitas de sangue com intervalo de 72 horas, com e sem anticoagulante (EDTA) por punção da veia femoral, e coleta de urina com o uso de frasco plástico apenas no momento da primeira colheita sanguínea. Com o sangue coletado, foram confeccionados esfregaços sanguíneos, onde foi possível identificar formas sugestivas do parasito causador da malária. Imediatamente, o veterinário responsável entrou em contato com nossa equipe de trabalho e através da análise das lâminas em arquivos digitais foi possível confirmar a infecção por plasmódio, porém apenas em nível de gênero por meio da microscopia óptica (Figura 12B).



**Figura 12.** Bugio ruivo com suspeita de infecção malárica (BL10 - Coquinho). **A:** foto do animal infectado. **B:** esfregaços sanguíneos a partir do sangue deste animal, com formas sugestivas de *Plasmodium* spp..

A partir do sangue coletado deste animal foram realizados exames hematológicos e bioquímicos que foram comparados com valores de referência calculados a partir dos animais do cativeiro, como demonstrado na Tabela 10. A contagem de células sanguíneas evidenciou uma anemia através do nível baixo de hemácias e do hematócrito. VCM – HMC e CHCM indicam anemia normocítica e hiperocrômica. Além disso, o animal apresentou leucopenia com neutropenia e trombocitopenia grave ( $18.000 \text{ mm}^3$ ). As análises bioquímicas permitiram concluir um aumento da uréia, TGO e TGP, hipoalbuminemia e hipoproteinemia. Nenhum achado significativo foi observado no teste rápido de urina que mostrou traços de proteína, ácido ascórbico, pH de 7 e densidade de 1.005.

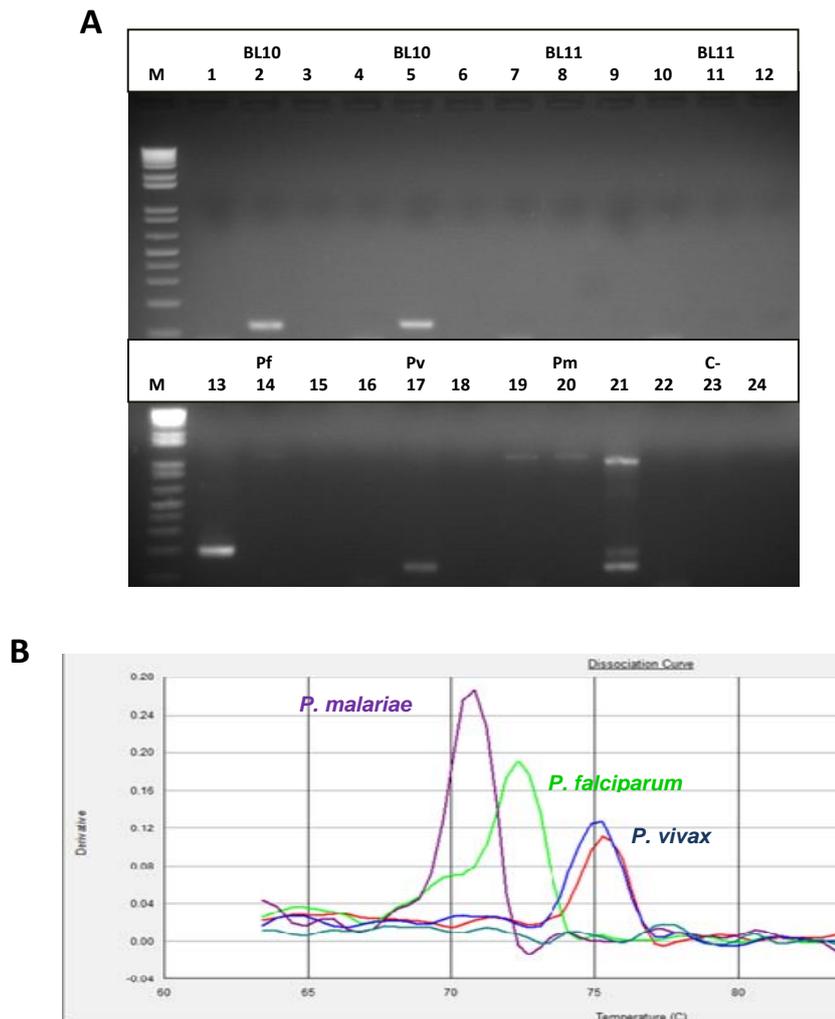
**Tabela 10.** Valores hematológicos e bioquímicos referentes à amostra do bugio ruivo (*A. clamitans*) do cativeiro CEPESBI com suspeita de infecção malárica.

<b>Hemograma</b>	<b>Amostra</b>	<b>Valores de referência (IC 95%)*</b>
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	<b>7,9</b>	8,75 - 11,03
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	4	3,58 - 4,49
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	<b>3,9</b>	4,93 - 6,88
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	<b>3,36</b>	4,26 - 4,63
Hemoglobina (g/dL)	<b>9,2</b>	10,82 - 11,65
Hematócrito (%)	<b>26,9</b>	35,06 - 38,41
VCM (fL)	80	80,73 - 84,45
HCM (pg/cel)	27,4	24,77 - 25,68
CHCM (g/dL)	34,2	30,02 - 31,28
PLT ( $10^3/\mu\text{L}$ )	<b>18/125<sup>a</sup></b>	198,62 - 267,58
<b>Bioquímica</b>		
Uréia (mg/dL)	<i>300/48,39</i>	35,03 - 43,70
Creatinina (UI/L)	4,6	1,16 - 1,33
TGO (UI/L)	<i>197,7</i>	53,99 - 70,63
TGP (UI/L)	<i>248,3</i>	28,26 - 42,27
Albumina (g/dL)	<b>2,0</b>	3,17 - 3,72
Proteínas totais (g/dL)	<b>7,4</b>	9,05 - 10,37
Amilase (UI/L)	243,41	-

\*Valores de referência de acordo com Souza Jr. (2007). Valores abaixo dos níveis de referência estão em negrito e os valores acima da referência estão em itálico. VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PLT: plaquetas, TGO: alanina amino transferase, TGP: transaminase glutâmico pirúvica. <sup>a</sup> teste realizado 72 horas após o primeiro exame.

O animal BL10 foi tratado com sulfametoxazol/trimetoprim (23mg/kg), devido ao seu amplo espectro de atuação, uma vez que o diagnóstico ainda não havia sido concluído. A dieta foi suplementada com ferro e vitaminas do complexo B. Diante das alterações hematológicas e bioquímicas identificadas, as análises foram repetidas 72 horas depois. Os valores de plaquetas aumentaram para 125.000/mm<sup>3</sup> e a uréia diminuiu para 48,39 mg/dL. Após duas semanas o animal estava completamente recuperado e não apresentava nenhum dos sintomas outrora descritos.

As lâminas, o sangue e o soro do animal foram encaminhados para a nossa equipe no Laboratório de malária do CPqRR – FIOCRUZ MINAS. As lâminas foram reanalisadas por quatro especialistas, que confirmaram a infecção por *Plasmodium*. No entanto, o diagnóstico específico permaneceu inconclusivo. Diante disso, foram utilizadas ferramentas moleculares já padronizadas no laboratório de malária para os parasitos humanos, devido à alta similaridade genética entre os plasmódios de primatas não humanos e humanos, descrita anteriormente. Inicialmente, foram utilizados os protocolos de Nested-PCR e PCR em Tempo Real que utilizam como alvo o gene 18S. Através destes dois protocolos moleculares foi possível confirmar a espécie envolvida na infecção do animal de cativeiro como *P. simum*/*P. vivax* (Figura 13).



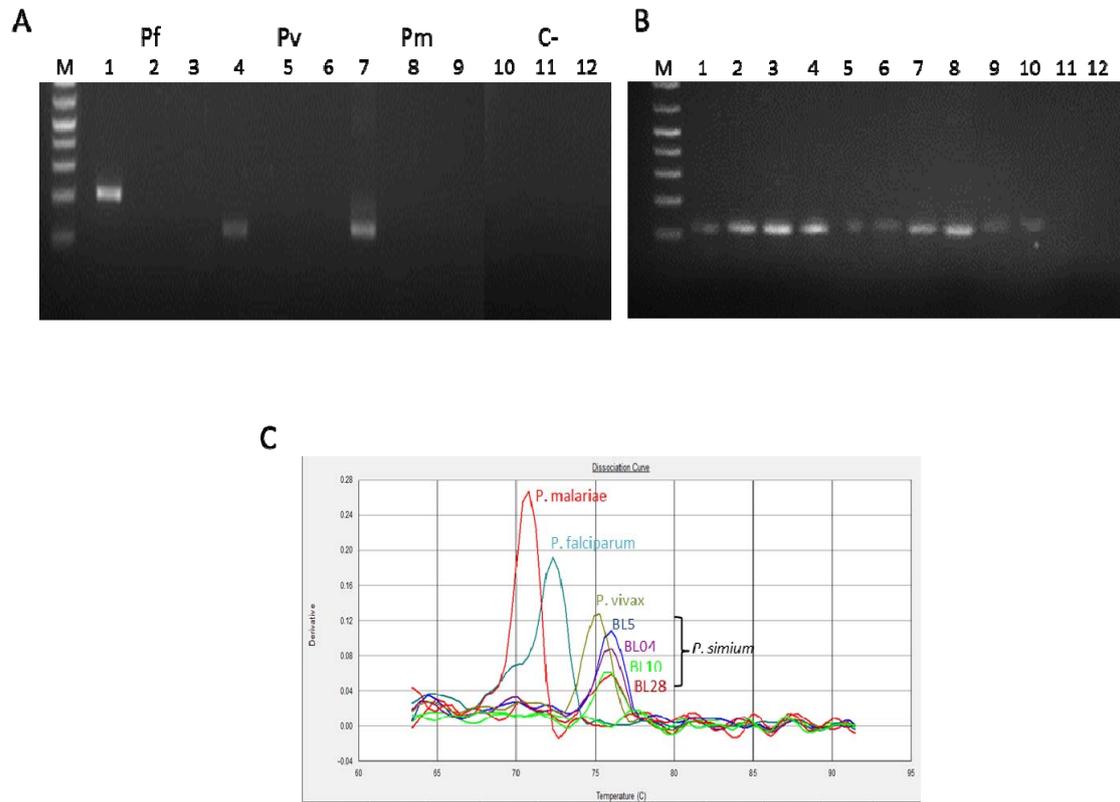
**Figura 13.** Diagnóstico molecular de *Alouatta clamitans* (BL10) infectado por *P. simium*/*P. vivax*. **A:** Nested-PCR para diagnóstico de plasmódio (alvo 18SSU rRNA). Gel de agarose corado com 2% de brometo de etídio. **M**, marcador molecular 1kb plus. Caneleta 1, 4, 13, 16, 19 e 22: iniciadores para *P. falciparum* (banda de 205 pb) Caneletas 2, 5, 14, 17 e 23: iniciadores para *P. vivax* (banda de 120 pb). Caneletas 3, 6, 15, 18, 21 e 24: iniciadores para *P. malariae* (banda de 144 pb). Caneletas de **1 a 6**, DNA de *A. clamitans* sintomático (BL10), Caneletas 7 a 9 e 10 a 12, DNA de *A. clamitans* assintomático (BL11) aplicado em duplicata, na mesma sequência de mix para a amostra BL10. Caneletas 13 a 24: controles positivos e negativos. Caneletas 13 - 15: DNA de *P. falciparum*, canaletas 16 – 18: DNA de *P. vivax*, canaletas 19 – 21: DNA de *P. malariae*, canaletas 22 – 24: controle negativo, sem DNA. **B:** Resultado da PCR em Tempo Real, demonstrando as curvas de temperatura de dissociação do animal infectado BL10 (linha vermelha), controle negativo (linha azul clara) e controles positivos: *P. vivax* (linha azul escura), *P. falciparum* (linha verde) e *P. malariae* (linha roxa).

A malária em *A. clamitans* sintomático do cativeiro CEPESBI em Indaial (SC) foi confirmada pela Nested-PCR e PCR em Tempo Real, tendo como alvo o gene 18S (SSUrRNA). Além da amplificação através do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal, 18S, foi possível confirmar a infecção por plasmódio por outros cinco alvos gênicos, quatro loci de microssatélites e indels nos blocos 02 e 10 da MSP-1. Todos os iniciadores utilizados foram

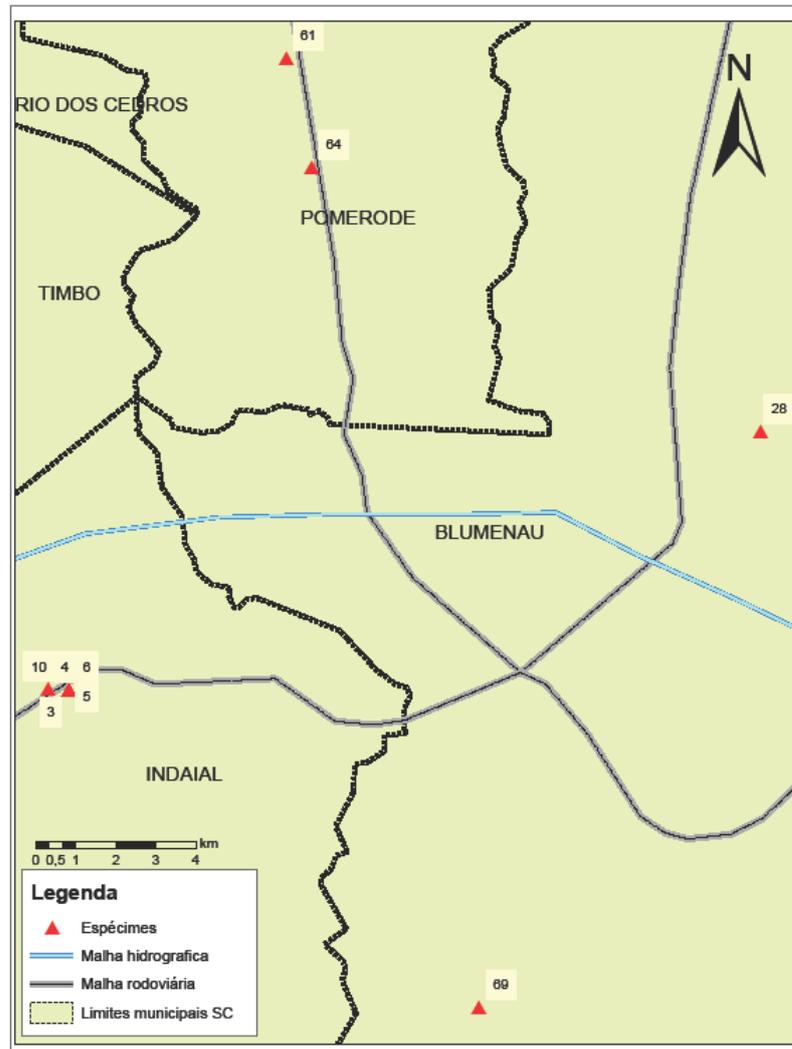
desenhados a partir do genoma de *P. vivax*, o que indica a presença de infecção por *P. simium*/*P. vivax* neste primata (ver resultados nos itens 5.3 e 5.4). Os alvos moleculares utilizados além do SSUrRNA, foram: a citocromo oxidase I (COI), a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1 blocos 2 e 10), a *Duffy binding protein* (DBP<sub>II</sub>) e a proteína circunsporozoíta (CSP), além dos marcadores moleculares genotipados que serão apresentados posteriormente.

## **5.2 Levantamento de infecção malárica em primatas neotropicais da Mata Atlântica**

Através do diagnóstico molecular foi possível observar uma taxa de infecção natural por *P. simium*/*P. vivax* em Santa Catarina equivalente a 35% em animais de vida livre e 4%, em animais de cativeiro (Tabela 10). Todas as 9 amostras positivas foram confirmadas pela Nested-PCR e PCR em Tempo Real (Figura 14). A Figura 15 ilustra os pontos do GPS para os animais positivos capturados em Santa Catarina. No resultado da PCR em Tempo Real (Figura 14B), é possível observar uma pequena alteração na temperatura da curva de dissociação do parasito simiano. A faixa de temperatura para o *P. vivax* (humano) é de 74 a 76°C e para o *P. simium* (simiano), de 75°C a 77°C. A infecção nos animais positivos foi confirmada por diversos alvos moleculares (dados não mostrados). Apesar de todos os alvos moleculares utilizados neste estudo terem sido desenhados para o *P. vivax* e por isso, as infecções nos primatas serem consideradas como *P. vivax*/*P. simium*, para maior praticidade, adotaremos *P. vivax*, para os parasitos de humanos e *P. simium*, para os parasitos de primatas nos itens subsequentes.



**Figura 14.** Diagnóstico molecular de *Alouatta clamitans* (BL10) infectado por *P. simium*/*P. vivax*. **A:** Nested-PCR para diagnóstico de plasmódio (alvo 18SSU rRNA). Gel de agarose corado com 2% de brometo de etídio. **M**, marcador molecular 1kb plus. Canaletas 1 a 12: controles positivos e negativos. Canaletas 1 - 3: DNA de *P. falciparum*, canaletas 4 - 5: DNA de *P. vivax*, canaletas 7 - 9: DNA de *P. malariae*, canaletas 10 - 12: controle negativo, sem DNA. **B.** Canaletas de **1 a 9**, BL 03, BL04, BL05, BL06, BL10, BL 28, BL61, BL64, BL69. Canaleta 10 Controle positivo para *P. vivax*. Canaleta 11 e 12: controles negativos. **C:** Resultado da PCR em Tempo Real, demonstrando as curvas de temperatura de dissociação de alguns dos animais infectados: BL04, BL05, BL10 E BL28. Controle negativo (linha verde clara), controles positivos: *P. vivax* (linha verde musgo), *P. falciparum* (linha azul clara) e *P. malariae* (linha vermelha).



**Figura 15.** Local onde cada um dos *Alouatta clamitans* positivos para *P. simium* foram capturados no estado de Santa Catarina (dados de GPS – programa Arcgis). Empresa: [www.pcmmineral.com](http://www.pcmmineral.com).

Nos estados do Paraná (n=31) e Mato Grosso do Sul (n=10), foram obtidas amostras de sangue coletadas na rotina de levantamento de epizootias silvestres pelo grupo do Dr. Walfrido Svoboda. Amostras de sangue de 41 primatas não humanos de vida livre dos gêneros *Alouatta* e *Cebus* foram analisadas nos protocolos de diagnóstico molecular Nested PCR e PCR em Tempo Real. Porém, não foi possível detectar infecção malárica por nenhum dos protocolos moleculares nas amostras dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (Tabela 11). O DNA foi utilizado em diferentes concentrações na tentativa de aumentar a sensibilidade para detecção de possíveis infecções

subpatentes, mas ainda assim, não foi possível caracterizar infecção malárica nestes animais, embora casos humanos da doença tenham sido relatados próximos a esta região.

**Tabela 11.** Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. em primatas não humanos de três regiões da Mata Atlântica brasileira.

Estado	Procedência das amostras	n amostral	n (% de positivos para <i>Plasmodium</i> spp.)
Paraná	Campo	31	0
Mato Grosso do Sul	Campo	10	0
Santa Catarina	Campo	20	7 (35%)
	Cativeiro	45	2 (4%)

### 5.3 Análise de marcadores moleculares em plasmódios simianos

Foram testados 11 loci de microssatélites (MS) e as regiões polimórficas da MSP-1, os blocos 2 e 10, padronizados por nosso grupo de pesquisa em populações humanas infectadas com *P. vivax* (Rezende *et al.*, 2010; de Araújo *et al.*, 2012). Estes marcadores foram utilizados para a genotipagem das amostras de plasmódios obtidas de nove *Alouatta clamitans* infectados de Santa Catarina. Dos 11 loci testados, apenas quatro amplificaram (MS1, MS5, MS6 e MS7). O fato de sete microssatélites desenhados para *P. vivax* não terem amplificado nas amostras de símios sugere que as regiões onde os iniciadores se ligam sejam polimórficas entre as duas espécies. A tabela 12 apresenta os resultados obtidos para os quatro microssatélites e os blocos 02 e 10 da MSP-1 das nove amostras de *P. simium* caracterizadas neste estudo. A partir da genotipagem dos microssatélites 5 e 6, foram encontrados os mesmos alelos identificados anteriormente em populações humanas infectadas por *P. vivax* (Resende *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2012). Em contrapartida, análises realizadas a partir dos microssatélites 1 e 7, bem como das regiões polimórficas da proteína MSP-1 de *P. vivax*, blocos 2 e 10, permitiram a identificação de alelos novos, exclusivos da população de parasitos de

primatas neotropicais (Tabela 12). Os alelos sublinhados foram descritos em amostras de humanos e macacos infectados por *P. simium* de um estudo paralelo realizado em regiões de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro (comunicação pessoal, Patrícia Brasil), o que reforça a exclusividade de alguns alelos de *P. simium*.

**Tabela 12.** Alelos predominantes encontrados nas nove amostras positivas para *P. simium* através da genotipagem de seis marcadores moleculares

Amostra	PvMS1	PvMS5	PvMS6	PvMS7	MSP1B2	MSP1B10
BL3	234	176	<u>209</u>	324	<u>397</u>	346
BL4	234	<u>185</u>	<u>197</u>	373	<u>397</u>	248
BL5	234	188	<u>197</u>	<u>352</u>	338	352
BL6	234	<u>179</u>	<u>197</u>	<u>352</u>	400	374
BL10	238	-	<u>197</u>	<u>352</u>	338	374
BL28	234	<u>185</u>	209	324	374	374
BL61	238	191	<u>197</u>	<u>352</u>	358	358
BL64	238	<u>185</u>	<u>197</u>	<u>352</u>	<u>364</u>	366
BL69	238	<u>182</u>	<u>209</u>	<u>352</u>	374	374

- Amplificação não funcionou, PvMS – microssatélites de *P. vivax* (Rezende et al. 2010) e MSP1B2 e MSP1B10 – blocos 2 e 10 da proteína de superfície de merozoito – 1 (Merozoite Surface Antigen – 1) (De araujo et al. 2012). Em vermelho os alelos não descritos previamente por Rezende *et al.* 2010 ou de Araujo *et al.* 2012. Alelos descritos em humanos e macacos de regiões de Mata Atlântica do Rio de Janeiro: Alelos sublinhados- descritos em humanos. Alelos pontilhados- descritos em macacos. Alelos com dois traços- descritos em humanos e macacos (comunicação pessoal Patrícia Brasil).

## 5.4 Sequenciamento das amostras positivas e análises *in silico*

### 5.4.1 *dbpII*

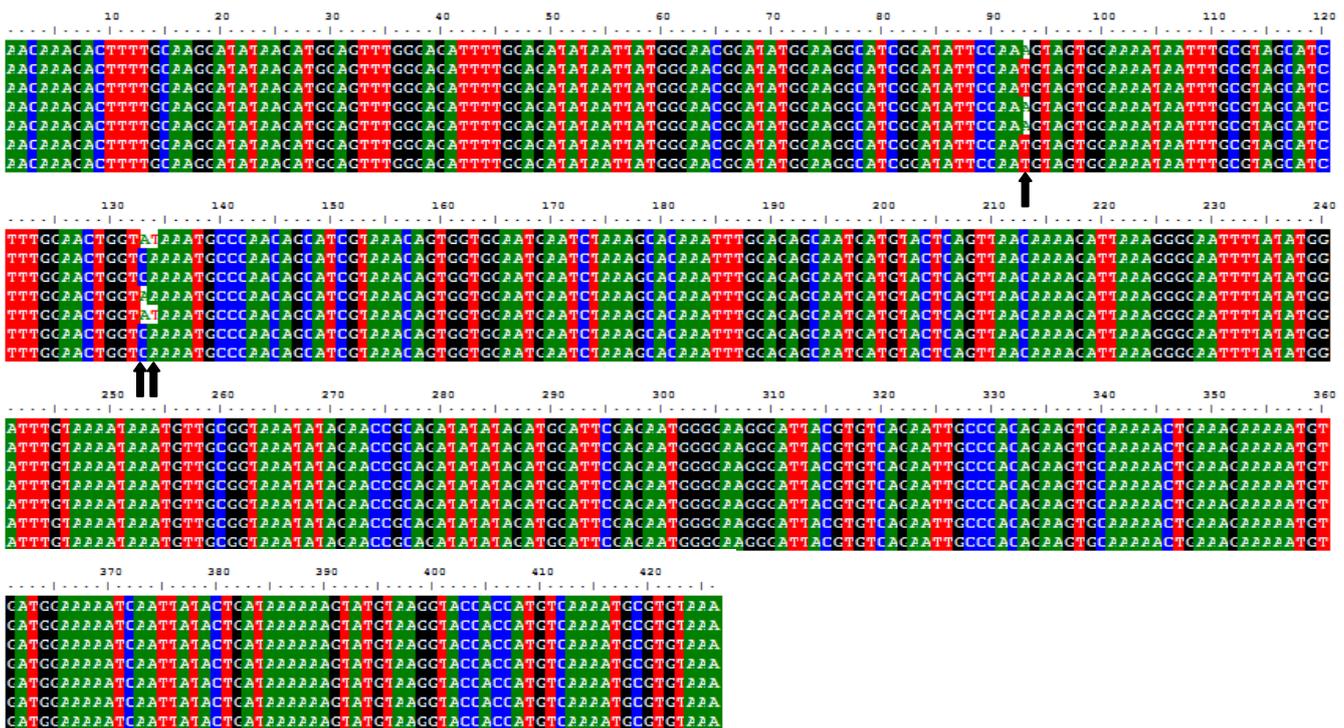
Foram obtidas sete sequências de qualidade a partir do sequenciamento de uma região do domínio II da proteína DBP (posição 1011 a 1464 de Sal-1 de *P. vivax*) dos nove macacos infectados, para identificação de SNPs. As sequências provenientes de dois macacos infectados foram excluídas das análises devido à baixa qualidade das mesmas. Foram identificados três sítios polimórficos entre as sequências de macacos deste estudo (posições 1113, 1153 e 1154 da sequência da PvDBP), todos eles de substituições não-sinônimas (N371K, E/K385I/Q). Nas análises de diversidade haplotípica, estes polimorfismos entre as amostras de *P. simium* provenientes dos sete primatas neotropicais de Indaial (SC), foram capazes de gerar três diferentes haplótipos (Tabela 13, Figura 16).

As análises *in silico* da proteína DBP de *P. vivax* e *P. simium*, foram realizadas a partir de 511 sequências de *P. vivax* provenientes de diferentes partes do mundo de um trabalho recente publicado por nosso grupo (Nobrega *et al.*, 2011). Para as análises, foram considerados apenas os haplótipos mais representativos, ou seja, que continham quatro ou mais sequências da *dbpII* de *P. vivax* de diferentes regiões do globo (frequência equivalente ou maior que 1%). Do universo de 511 sequências de *P. vivax* foi possível identificar 19 haplótipos representativos. Em seguida, estes 19 haplótipos da PvDBP foram alinhados com as sete sequências obtidas a partir do sequenciamento dos macacos infectados por *P. simium* geradas neste trabalho (Figura 17). No total dos 453 pares de base sequenciados foi possível identificar 13 sítios polimórficos (2,9%) entre as sequências de *P. vivax* e de *P. simium*. Dos 13 SNPs caracterizados no alinhamento, cinco deles nunca foram descritos nas sequências de *P. vivax*, sendo, portanto, identificados apenas entre os parasitos de macacos, nas posições: 1016 G>A, 1113 A>T, 1153 GA>C, 1154 A>T e 1233 A>C. Este último polimorfismo foi identificado em todas as amostras de primatas neotropicais, sendo deste modo, uma substituição espécie específica, indicando também que é fixado em *P. simium*. Este alvo poderá contribuir para a diferenciação entre as duas espécies geneticamente

similares. Todas as substituições caracterizadas foram não sinônimas: Asp-371Lys, Gln385Ile/Lys e Asn411Lys, sendo os primeiros aminoácidos referentes às sequências dos parasitos de primatas.

**Tabela 13.** Diversidade do gene codificador da DBP de isolados de *P. simium*.

Polimorfismos	1113		1153/1154	
	Nucleotídeo	AA	Nucleotídeo	AA
	AA <u>T</u>	371	<u>CA</u> A	385
	AA <u>A</u>	N/K	<u>AT</u> A	Q/I/K
			<u>AA</u> A	
Amostra	Haplótipo			
BL3, BL10	1	..A	AT.	
BL4, BL5, BL61, BL64	2	...	...	
BL6	3	..A	A..	



**Figura 16.** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de sete sequências de *P. simium* entre as posições 1021 a 1300 de Sal-1 (número de acesso : PVX\_110810). As setas pretas representam SNPs identificados entre as sequências, posições: 1113, 1153 e 1154.

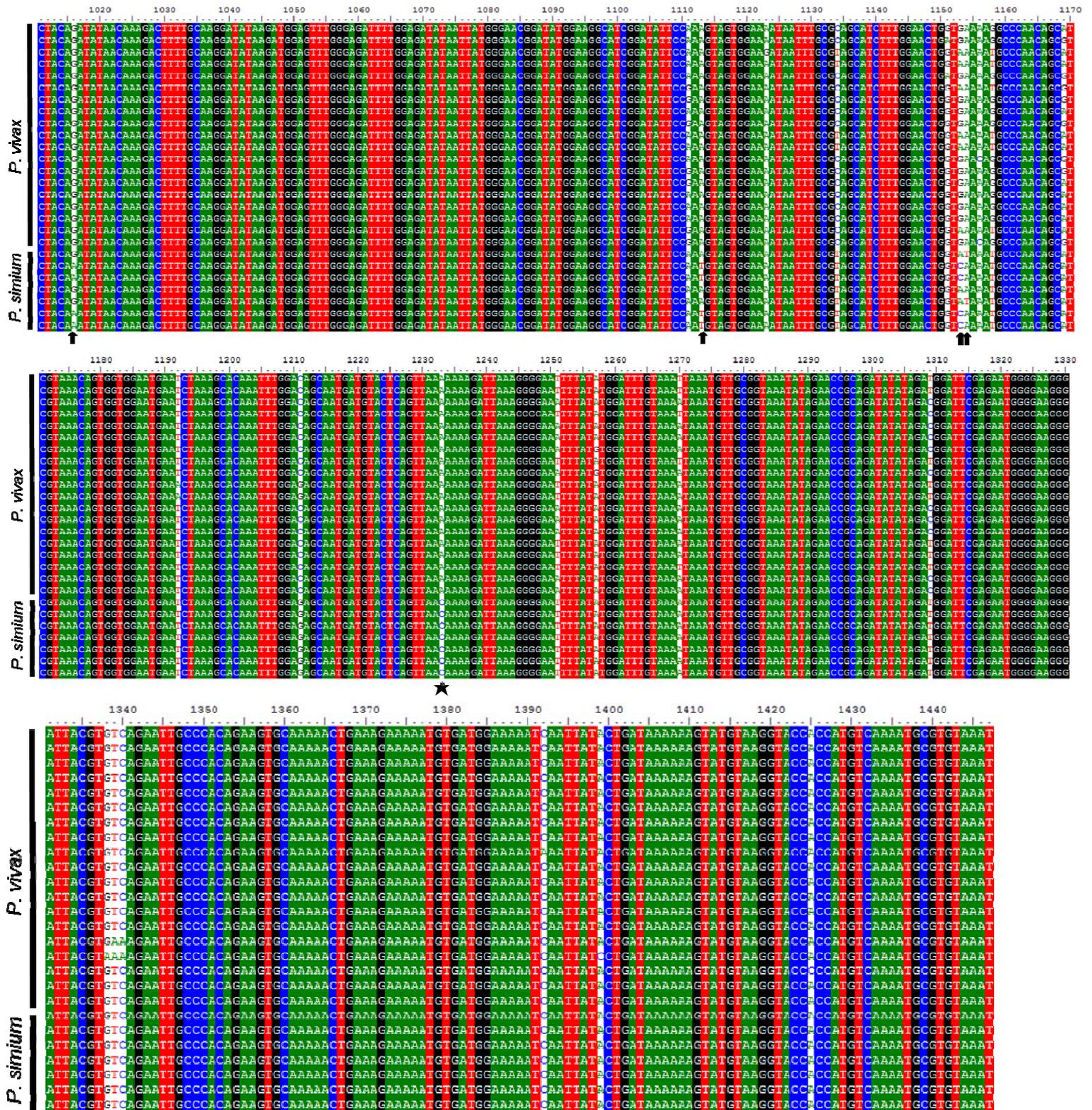


Figura 17. Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de 19 haplótipos representativos da PvDBP e de sete amostras de *P. simium* sequenciadas neste estudo entre as posições 1021 a 1300 de Sal-1 (número de acesso : PVX\_110810 ). As setas pretas representam SNPs nunca identificados entre haplótipos de *P. vivax* no mundo, posições: 1016 A>G, 1113 A>T, 1153 GA>C e 1154 A>T. A estrela representa o polimorfismo exclusivo de *P. simium*, na posição 1233 A>C.

A diversidade genética entre os parasitos simianos foi comparada com os dados obtidos a partir das sequências de *P. vivax*, bem como da DBP de *P. knowlesi* e *P. cynomolgi*. As sequências foram analisadas em três grupos distintos representados na Tabela 14 por diferentes tons de cinza. Primeiramente, foram comparadas as 7 sequências de *P. simium* e as 511 de *P. vivax*. Em seguida, foram comparadas as 7 sequências de *P. simium* com uma sequência de *P. vivax* (Sal-1), uma de *P. cynomolgi* e uma de *P. knowlesi*. E finalmente, foram comparadas as 511 sequências de *P. vivax* com as sete sequências de *P. simium*, uma sequência de *P. cynomolgi* e uma de *P. knowlesi*. No primeiro grupo, foi possível identificar entre as amostras de *P. simium* (n=7) três sítios segregantes. Entre as sequências de PvDBP de regiões diferentes do mundo (n=511), foi possível caracterizar 81 sítios segregantes e destes, 42 singletons. Os sítios parcimoniosos entre as sequências de *P. vivax* é equivalente a 39. Foram encontradas 14 mutações sinônimas e 64 mutações não sinônimas. Não é possível comparar os valores de diversidade nucleotídica entre as espécies, tendo em vista a discrepância entre o número amostral para cada uma delas.

No segundo grupo, a análise de diversidade genética entre as sete sequências do gene codificador da DBP<sub>II</sub> de *P. simium* e a sequência de Sal-1 de *P. vivax* identificou dez sítios segregantes, sendo sete variáveis e três parcimoniosos. Esta análise permitiu a correção do tamanho da amostra ao se comparar as sequências de *P. simium* a apenas uma sequência de referência de *P. vivax*. Dos polimorfismos encontrados, um é sinônimo e sete não sinônimos. Entre *P. simium* e *P. cynomolgi* foram caracterizados 56 sítios polimórficos, sendo 53 variáveis e apenas três parcimoniosos. Dentre os 56 polimorfismos identificados, 17 correspondem a mutações sinônimas e a grande maioria, 39, a mutações não sinônimas. Já na análise da diversidade entre o *P. simium* e o *P. knowlesi* foi possível identificar 86 sítios segregantes, sendo apenas três sítios parcimoniosos e 83 variáveis e finalmente destes últimos, foram caracterizadas 32 mutações sinônimas e 52 mutações não sinônimas. Neste grupo, é interessante observar que os sítios segregantes, os sítios variáveis, a diversidade nucleotídica estimada pelo valor de  $P_i$  e os

polimorfismos (sinônimos e não sinônimos) aumentam de acordo com a distância evolutiva entre as espécies (em ordem crescente na tabela).

Finalmente, no último grupo, na comparação entre *P. simium* e *P. vivax* foi possível identificar 84 polimorfismos, sendo metade deles variáveis e a outra metade parcimoniosos. Destes polimorfismos, 14 correspondem a mutações sinônimas e 65 a mutações não sinônimas. Entre *P. vivax* e *P. cynomolgi* foram caracterizados 122 sítios segregantes, sendo 81 variáveis e 41 semelhantes. Dos polimorfismos caracterizados, 20 são sinônimos e 87 não sinônimos. Na comparação entre *P. vivax* e *P. knowlesi*, foi possível identificar 145 sítios segregantes, sendo 101 variáveis e 44 conservados. Dentre os 145 sítios segregantes, 34 correspondem a mutações sinônimas e 91 não sinônimas. Igualmente, neste grupo, também foi possível observar que os sítios segregantes, os sítios variáveis, a diversidade nucleotídica estimada pelo valor de Pi e os polimorfismos (sinônimos e não sinônimos) aumentam de acordo com a distância evolutiva entre as espécies, em ordem crescente na tabela (números vermelhos).

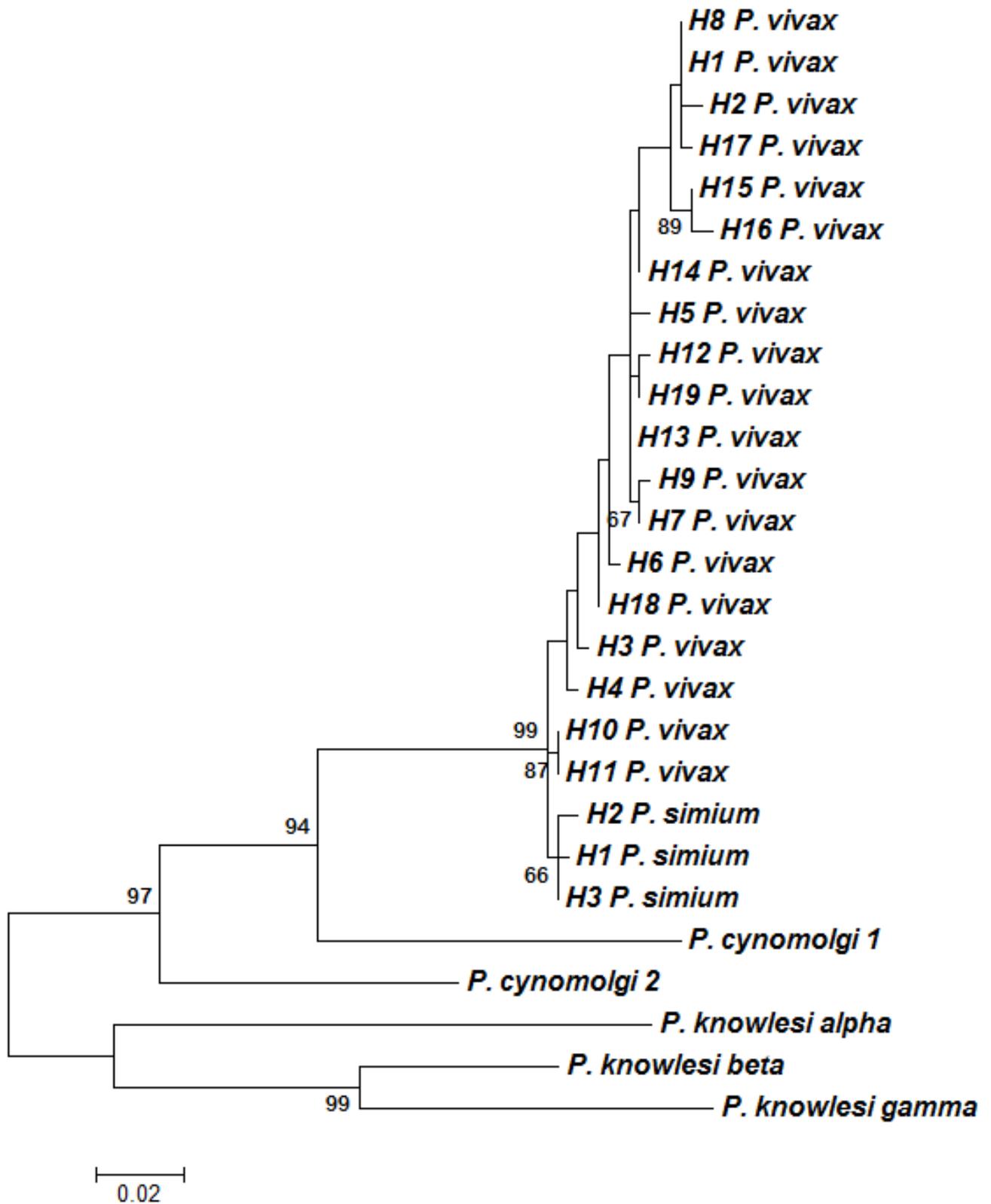
**Tabela 14.** Análise comparativa da diversidade genética da Duffy Binding Protein de *P. simium*, *P. vivax*, *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*.

	S	Singleton sítios variáveis	Sítios parcimoniosos	Pi ± SD	Mutações sinônimas	Mutações não sinônimas	H	Hd ± SD
<i>P. simium</i> (N=7)	3	0	3	0.0038 ± 0.0008	0	3	3	0.6670 ± 0.1600
<i>P. vivax</i> (N=511)	81	42	39	0.0122 ± 0.0003	14	64	118	0.9196 ± 0.0078
<i>P. simium</i> x <i>P. vivax</i> (N=8)	10	7	3	0.0080 ± 0.0031	1	7	4	0.7500 ± 0.1390
<i>P. simium</i> x <i>P. cynomolgi</i> (N=8)	56	53	3	0.0348 ± 0.0224	17	39	4	0.7500 ± 0.1390
<i>P. simium</i> x <i>P. knowlesi</i> (N=8)	86	83	3	0.0526 ± 0.0352	32	52	4	0.7500 ± 0.1390
<i>P. vivax</i> + <i>P. simium</i> (518)	84	42	42	0.0124 ± 0.0003	14	65	121	0.9217 ± 0.0077
<i>P. vivax</i> x <i>P. cynomolgi</i> (N=512)	122	81	41	0.0127 ± 0.0005	20	87	119	0.9199 ± 0.0078
<i>P. vivax</i> x <i>P. knowlesi</i> (N=512)	145	101	44	0.0130 ± 0.0008	34	91	119	0.9199 ± 0.0078

S= sítios segregantes; SD= diversidade nucleotídica; H= haplótipos.

A partir destas sequências, também foi possível estabelecer as relações evolutivas do gene que codifica a Duffy Binding Protein de *P. simium* com as mesmas espécies utilizadas nas análises de diversidade genética. A

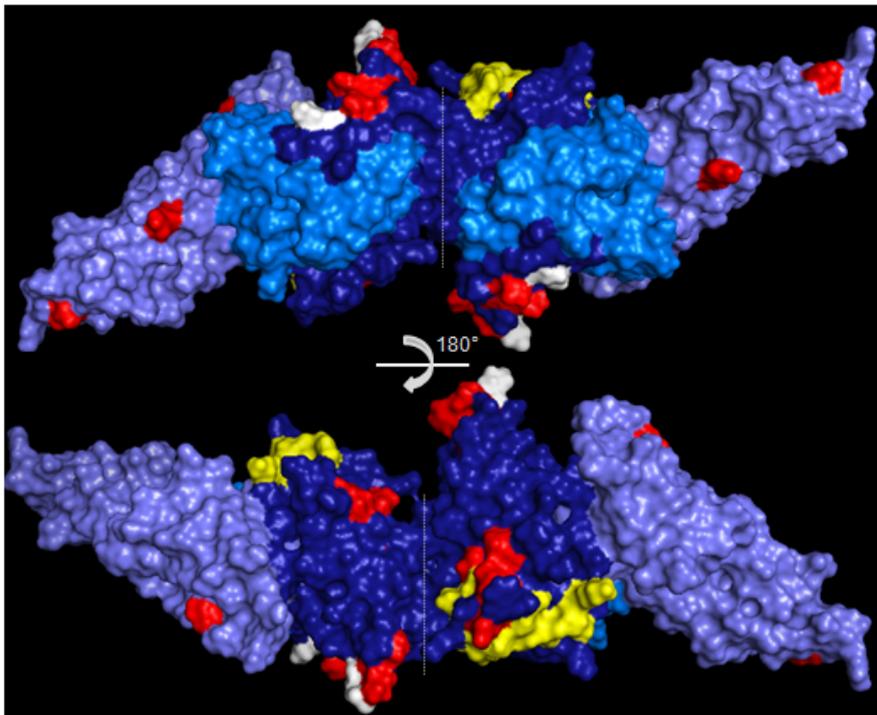
reconstrução filogenética com base na região II da DBP aponta igualmente para uma elevada proximidade entre a PvDBP e a PsDBP. Os três haplótipos de *P. simium* foram agrupados em um ramo único, porém eles encontram-se no mesmo clado que todos os haplótipos de *P. vivax*. Estes resultados reforçam a proximidade entre a DBP do *P. simium* e do *P. vivax*, apesar dos sítios segregantes caracterizados em *P. simium* serem suficientes para agrupá-los separadamente. Os ramos da árvore apresentam um elevado suporte estatístico devido aos valores elevados de *bootstrap* (Figura 18).



**Figura 18.** Topologia da árvore da Duffy Binding Protein dos haplótipos de *P. simium* e *P. vivax* (H1: EU812840.1, H2: EU812841.1, H3: EU812842.1, H4: EU812844.1, H5: EU812845.1, H6: EU812849.1, H7: EU812861.1, H9: e uma sequência das seguintes espécies: *P. cynomolgi* 1 (XM004221494), *P. cynomolgi* 2 (XM004220981), *P. knowlesi* alpha (M90466), *P. knowlesi* beta (M90694), *P. knowlesi* gamma (M90695). A árvore foi gerada por meio do método de Máxima

Verossimilhança, baseada no modelo de substituição nucleotídica HK85. Foram considerados bootstrap acima de 60%, identificados a partir de 5000 réplicas.

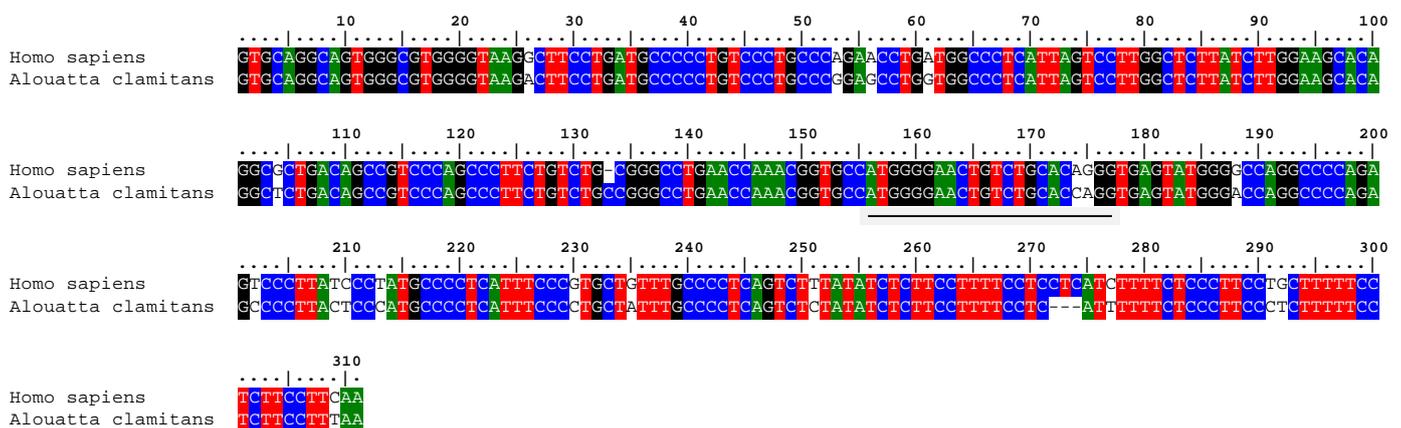
A partir da estrutura tridimensional da PvDBP, foi possível identificar a localização espacial dos polimorfismos de *P. simium* (Figura 19). É interessante ressaltar que os polimorfismos conservados em *P. simium* localizam-se no mesmo sub-domínio da proteína que os polimorfismos já descritos para *P. vivax*, o sub-domínio SD2, caracterizado por conter a região de ligação ao receptor Duffy. No entanto, não foram encontrados polimorfismos de *P. simium* próximos à região de interação ligante-receptor dentro deste domínio, ao contrário do que já foi descrito para *P. vivax* (Figura 19).



**Figura 19.** Estrutura tridimensional do dímero do domínio de interação da Duffy Binding Protein de *P. vivax* (PvDBPII) Em tons de azul estão representados os sub-domínios da proteína. Em amarelo estão caracterizados os principais resíduos de interação com DARC. Em branco estão representados os polimorfismos de *P. simium* e em vermelho os polimorfismos em *P. vivax*.

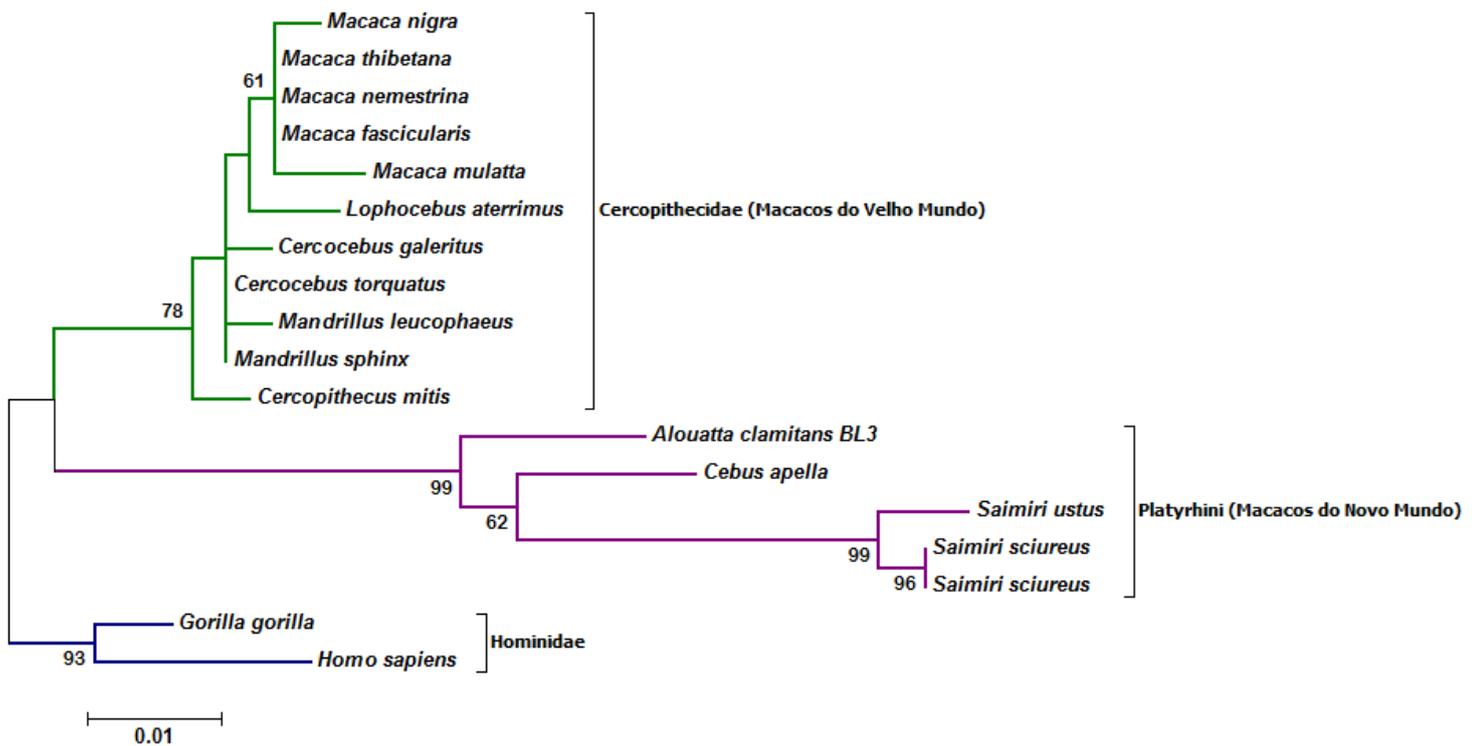
### 5.4.2 DARC

Para as análises *in silico* do receptor para quimiocinas DARC dos primatas naturalmente infectados, foram amplificadas duas regiões do gene. A primeira, correspondente à região do promotor do gene, o éxon 1 e uma parte do íntron, que chamaremos de DARC-1 (nt -154 a +157 da sequência de *Homo sapiens*, número de acesso JN251915). A segunda, correspondente a uma região do éxon 2, que compreende a primeira alça transmembrana e que chamaremos de DARC-2 (nt 235 a 546 do éxon 2 de DARC de *Homo sapiens*). Para DARC-1 foram obtidas 8 sequências de qualidade e para DARC-2, 9 sequências. Não foram identificados polimorfismos entre as sequências dos macacos deste estudo, portanto, foi selecionada apenas uma sequência para as análises filogenéticas (BL 03). A partir do alinhamento de DARC-1 de *A. clamitans* com a sequência de *Homo sapiens*, foi possível identificar entre DARC-1 de bugio e de humano 18 SNPs, uma deleção pontual em *Homo sapiens* (posição 133) e uma trinca de nucleotídeos deletados em *Alouatta* (nt 272 a 274), conforme demonstrado na Figura 20. Apenas os SNPs nas posições 174 e 175 encontram-se em região codificadora (codon 7 do éxon 1), gerando uma substituição não sinônima (Arg7Gln).



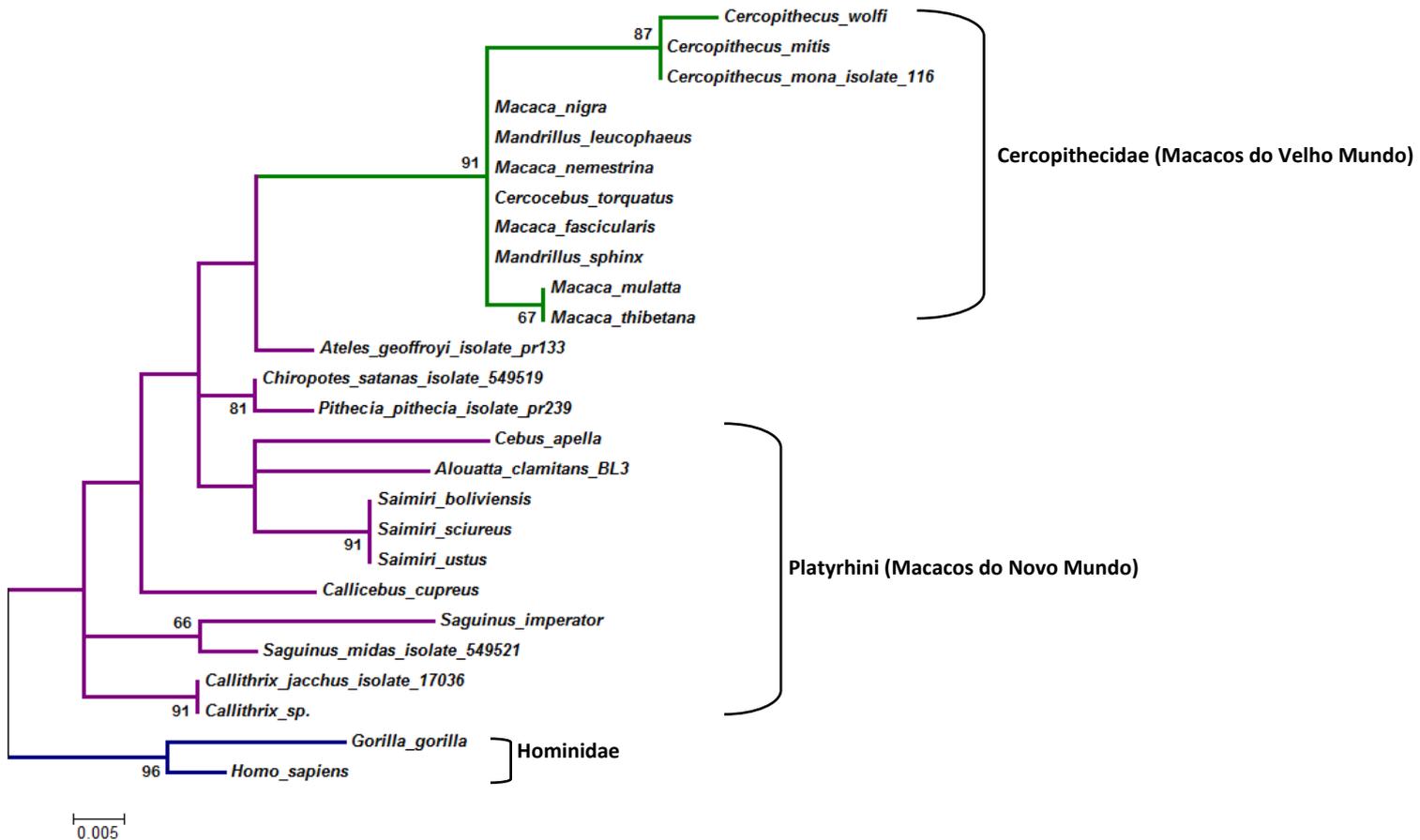
**Figura 20.** Alinhamento múltiplo de uma sequência representativa de um fragmento de DARC-1 de *Alouatta clamitans* e outra de *Homo sapiens*. (posição nt -154 a +157 de *Homo sapiens*, número de acesso JN251915). A barra sob a sequência indica o éxon 1.





**Figura 22.** Topologia da árvore de DARC-1 de diferentes amostras de primatas a partir do método de Máxima Verossimilhança, modelo HKY85. As sequências utilizadas e seus respectivos números de acesso foram: *Homo sapiens*: JN251915, *Gorilla gorilla*: HQ285843, *Saimiri sciureus*: HQ285857, *Saimiri sciureus*: JN544138, *Saimiri ustus*: HQ285856, *Cebus apella*: HQ285855, *Cercopithecus mitis*: HQ285846, *Mandrillus sphinx*: HQ285854, *Mandrillus leucophaeus*: HQ285853, *Cercocebus torquatus*: HQ285845, *Cercocebus galeritus*: HQ285844, *Lophocebus aterrimus*: HQ285847, *Macaca mulatta*: AF311921, *Macaca fascicularis*: HQ285848, *Macaca nemestrina*: HQ285850, *Macaca thibetana*: HQ285852 e *Macaca nigra*: HQ285851. Foram considerados *bootstrap* acima de 60%, obtidos a partir de 5000 réplicas. Em verde, Macacos do Velho Mundo; em roxo, Macacos do Novo Mundo e em azul, Hominidae.

Ao contrário da região de DARC-1, a filogenia de DARC-2 não agrupou adequadamente os primatas nos grupos monofiléticos: Platyrrhini, Cercopithecidae e Hominidae, sendo os macacos do Velho Mundo erroneamente agrupados no clado dos macacos do Novo Mundo. Portanto, esta região do gene não reproduziu a filogenia molecular dos primatas (Figura 23).



**Figura 23.** Topologia da árvore de DARC-2 de *Alouatta clamitans* (BL3) e diferentes amostras de primatas (*Homo sapiens*: JN251915, *Gorilla gorilla*: HQ285843, *Callithrix sp.*: AF311915, *Callithrix jacchus isolate 17036*: GU219520, *Saguinus midas isolate 549521*: GU219523, *Saguinus imperator*: AF311916, *Callicebus cupreus*: JN544139, *Saimiri ustus*: HQ285856, *Saimiri sciureus*: JN544138, *Saimiri boliviensis*: AF311918, *Cebus apella*: AF311919, *Pithecia pithecia isolate pr239*: GU219527, *Chiropotes satanas isolate 549519*: GU219522, *Atelles geoffroyi isolate pr133*: GU219525, *Macaca thibetana*: HQ285852, *Macaca mulatta*: AF311921, *Mandrillus shinx*: HQ285854, *Macaca fascicularis*: HQ285848, *Cercocebus torquatus*: HQ285845, *Macaca nemestrina*: HQ285850, *Mandrillus leucophaeus*: HQ285853, *Macaca nigra*: HQ285851, *Cercopithecus mono isolate 166*: GU219517, *Cercopithecus mitis*: HQ285846, *Cercopithecus wolffi*: JN544124). A árvore foi baseada no método de Máxima Verossimilhança, modelo HKY85. Foram considerados bootstrap acima de 60%, identificados a partir de 5000 réplicas. Em verde, Macacos do Velho Mundo; em roxo, Macacos do Novo Mundo e em azul, Hominidae.

### 5.4.3 MSP1 blocos 2 e 10

Foram sequenciados com alta qualidade as porções dos blocos mais polimórficos do gene da *MSP-1* (2 e 10) de *P. simium* (*MSP-1* bl02: posições nt 670 a 1.048 e para *MSP-1* bl10: posições nt 3.910 a 4.278), ambas de *P. vivax* número de acesso gi|313848965|dbj|AB5) dos primatas neotropicais infectados

pelo plasmódio. Para as análises comparativas entre a MSP-1 (blocos 2 e 10) de *P. simium* e *P. vivax*, foram utilizadas as sequências dos bugios infectados obtidas no presente estudo e 40 sequências completas da MSP-1 de *P. vivax* obtidas no Genbank. Do total de 40 sequências de *P. vivax*, foram utilizados os 15 haplótipos obtidos, definidos no DnaSP.

A partir da MSP-1 bloco 02, foi possível obter sequências de qualidade de sete bugios ruivos infectados. As sequências obtidas de *P. simium* não apresentaram sítios polimórficos, portanto, apenas uma única sequência foi utilizada para as análises juntamente com os 15 haplótipos de *P. vivax*. O alinhamento dos blocos é dificultado pela presença de longas sequências repetitivas na MSP-1, o que justifica os grandes gaps ao longo do alinhamento. Isto pode ser observado tanto entre os haplótipos de *P. vivax* utilizados quanto entre *P. vivax* e *P. simium* (Figura 24).

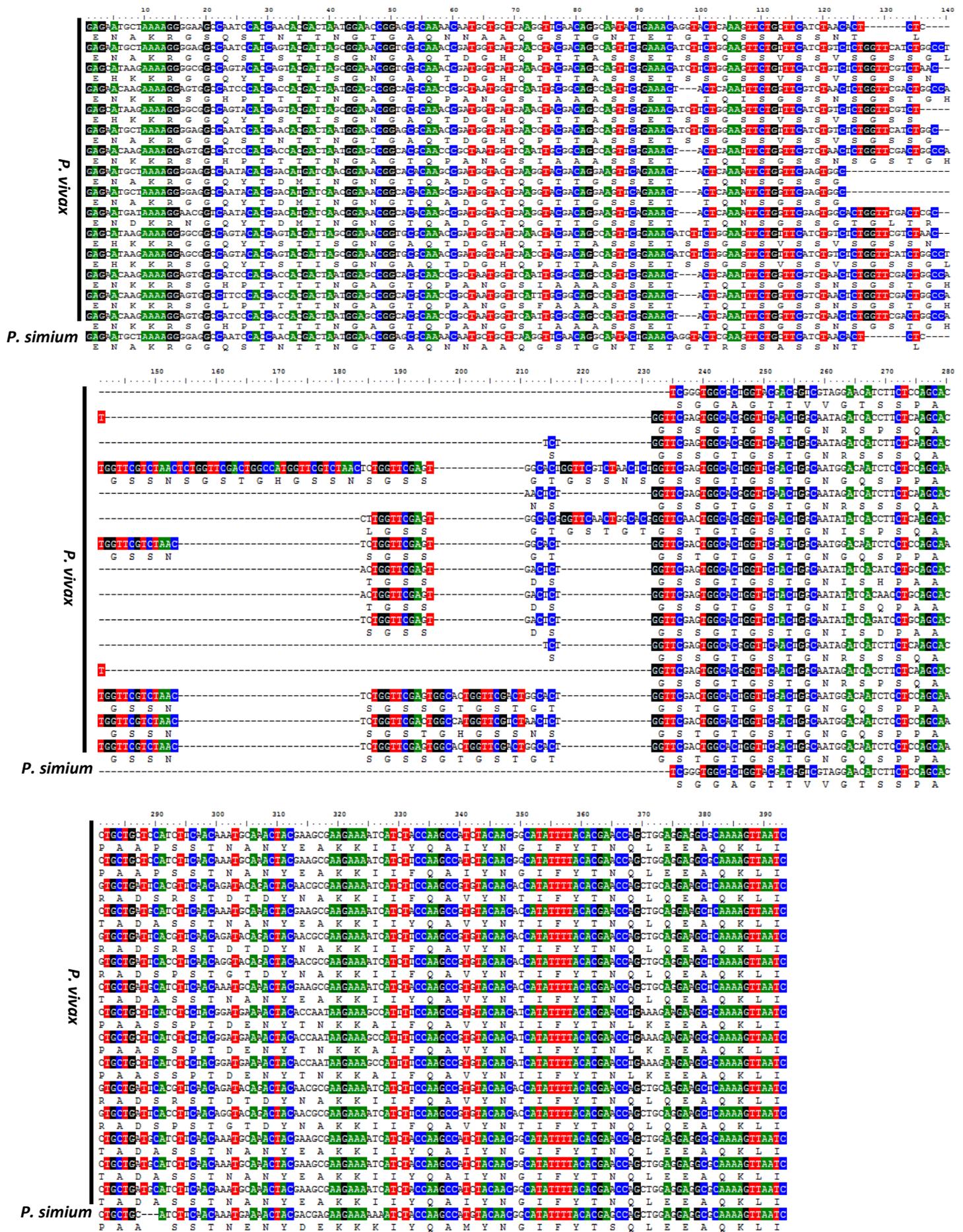
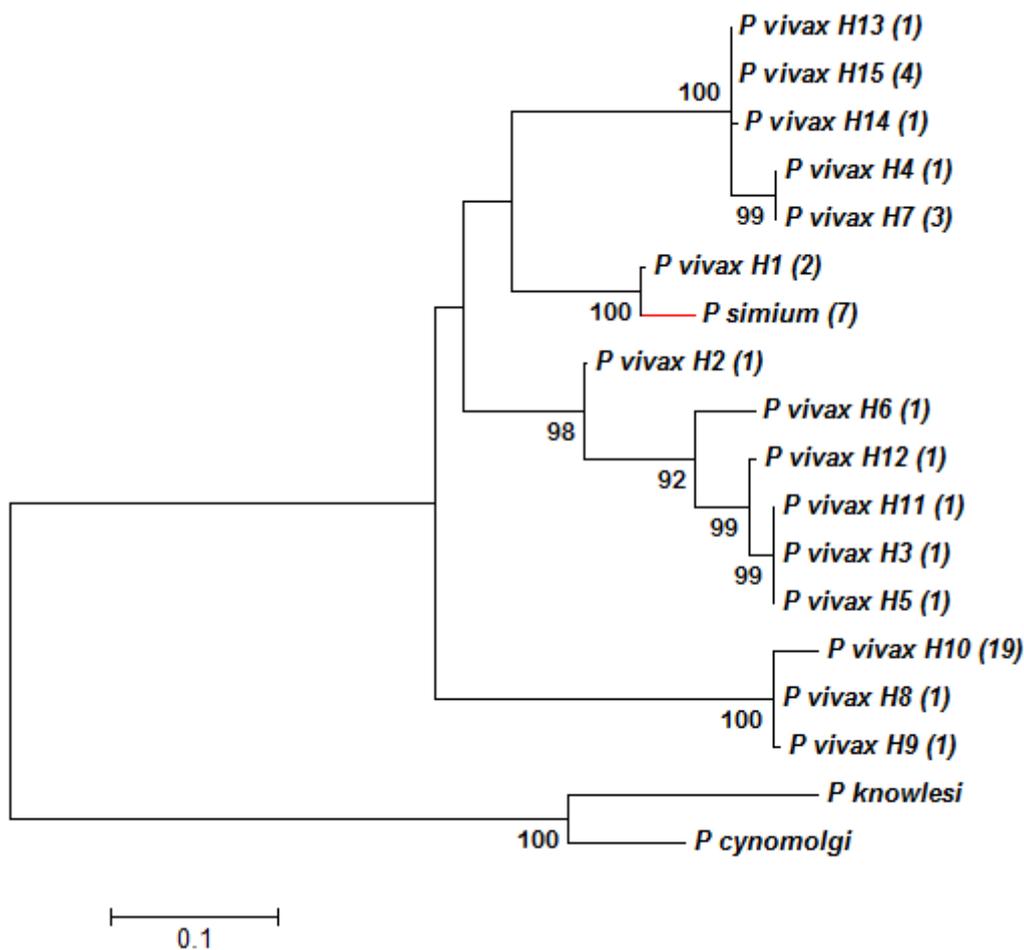


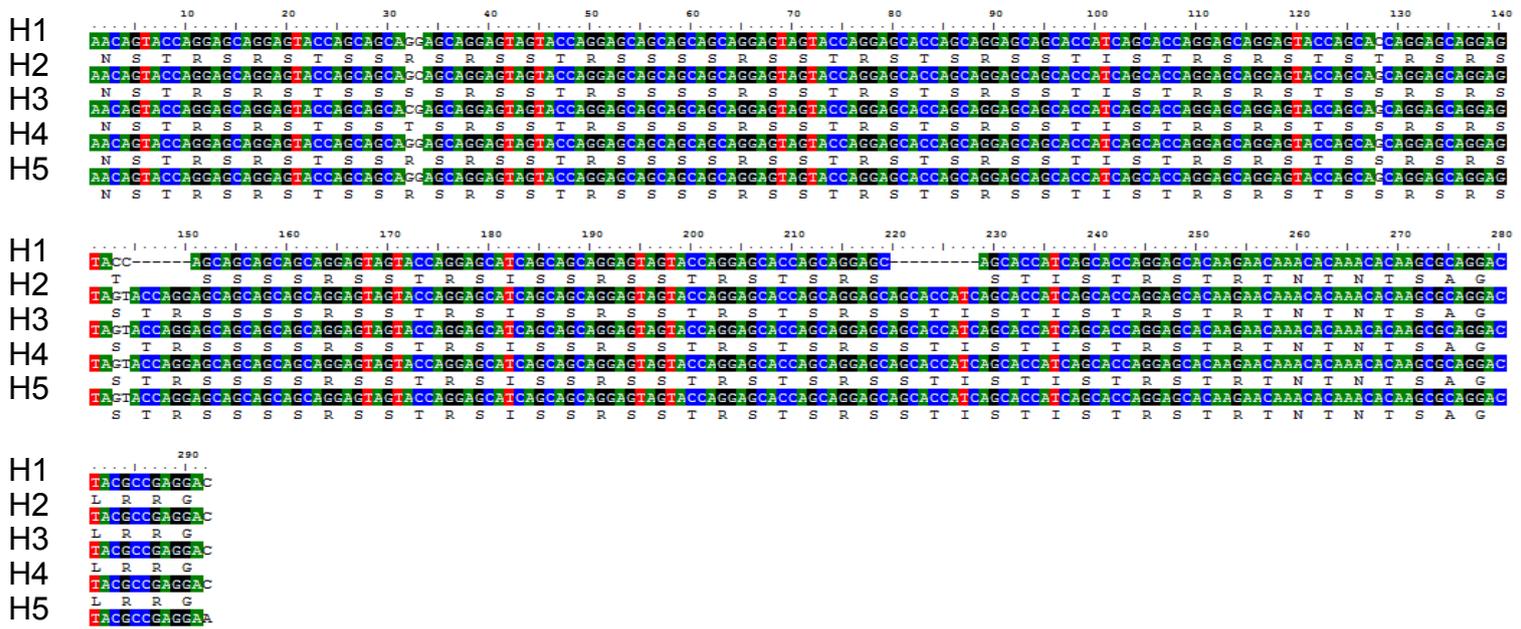
Figura 24. Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit do haplótipo da MSP-1 bloco 02 de *P. simium* e 15 haplótipos da MSP-1 de *P. vivax*.

Foram contruídas árvores filogenéticas a partir da sequência consenso da MSP-1 bloco 02 de *P. simium* (haplótipo único) e os 15 haplótipos da MSP1-bloco 02 de *P. vivax*, segundo metodologia descrita anteriormente. A amostra de *P. simium* foi agrupada no clado de *P. vivax*, em um ramo junto ao haplótipo 1 de *P. vivax* (Figura 25).



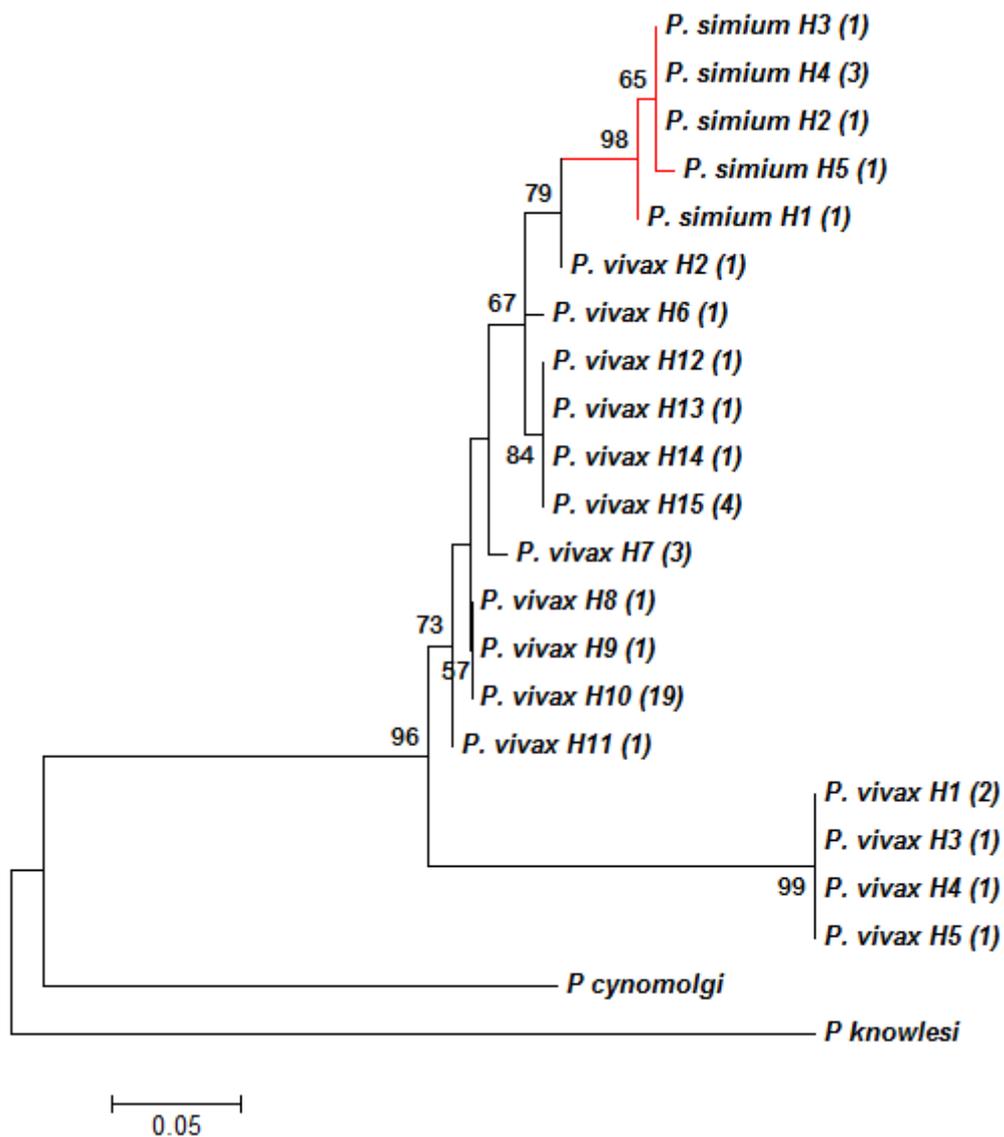
**Figura 25.** Topologia da árvore da MSP-1 bloco 02 com o haplótipo único de *P. simium*, 15 haplótipos de *P. vivax* (H1: gi|26985113, H2: gi|26985105, H3: gi|26985137|gb|AF435, H4: gi|26985159, H5: gi|26985109, H6: gi|26985089, H7: gi|26985129, H8: gi|26985127, H9: gi|26985111, H10: gi|313848965, H11: gi|26985085, H12: gi|307000628, H13: gi|307000626, H14: gi|307000624, H15: gi|307000620), uma sequência de *P. knowlesi* (PKH 072850) e outra de *P. cynomolgi* (PCYB 073770) a partir do método de Máxima Verossimilhança, modelo HKY85. Entre parênteses está representado o número de sequências presente em cada haplótipo. Foram considerados bootstrap acima de 60%, obtidos a partir de 5000 réplicas. Em vermelho está representado o haplótipo de *P. simium*.

Para a MSP-1 bloco 10, foi possível obter sequências de qualidade para sete amostras de bugios ruivos infectados. As sete sequências de *P. simium* foram agrupadas em cinco diferentes haplótipos (H1, H2, H3, H4 e H5, sendo H1: BL69, H2: BL3, H3: BL64, H4: BL4, BL6 e BL61, H5: BL10). Foi possível identificar sítios segregantes entre os haplótipos de *P. simium*, com a presença de três substituições não sinônimas. O haplótipo 1 (H1), apresenta deleções ao longo da sequência (Figura 26).



**Figura 26.** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de cinco haplótipos da MSP-1 bloco 10 de *P. simium*.

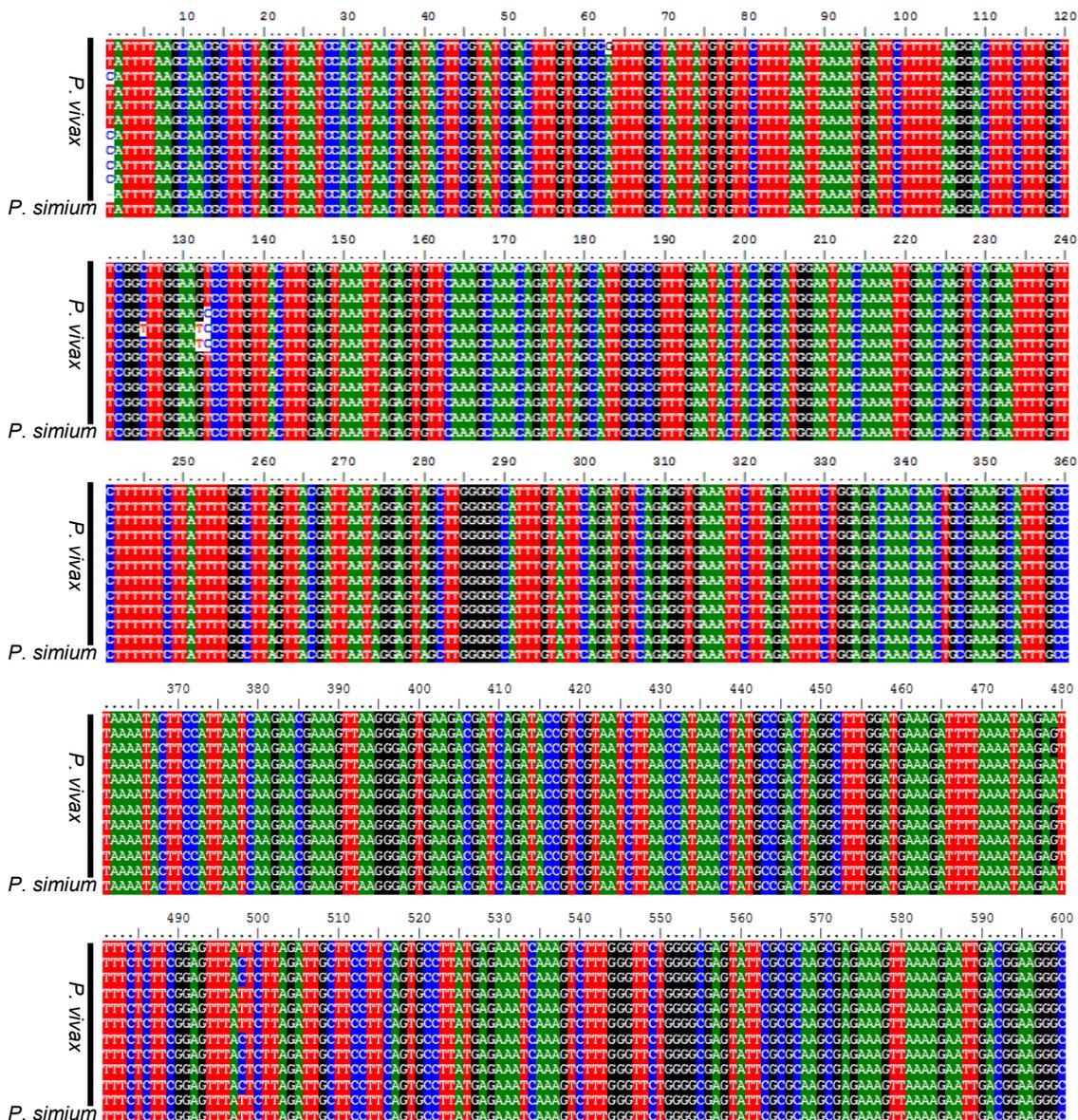
No presente estudo, a partir das sequências da MSP-1 bloco 10 de *P. simium* dos bugios infectados de Indaial, SC, foi possível reconstruir as relações filogenéticas dos plasmódios simianos e humanos. Os haplótipos de *P. simium* agruparam-se em um ramo único. No entanto, todas as amostras de *P. simium* encontram-se no clado de *P. vivax*, o que reforça a proximidade genética entre estes parasitos (Figura 27).

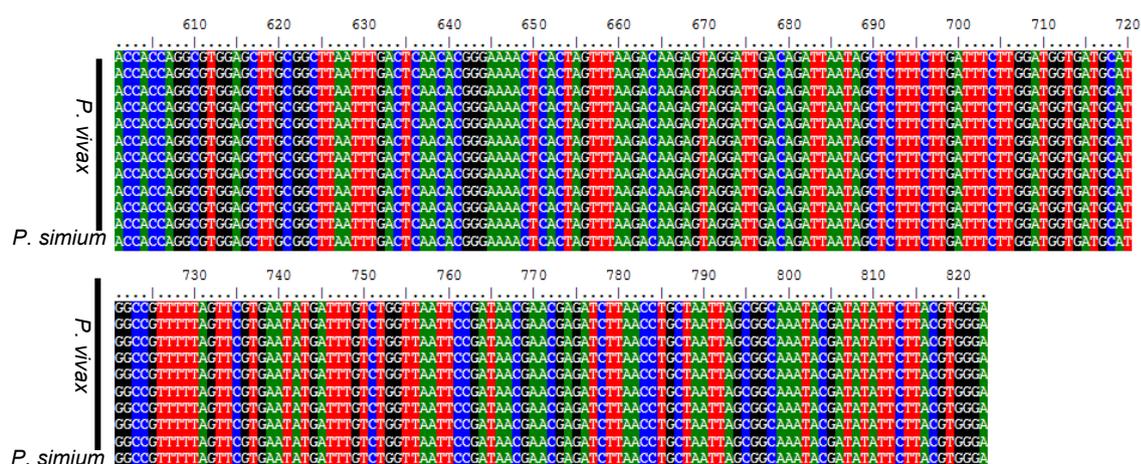


**Figura 27.** Topologia da árvore da MSP-1 bloco 10 com cinco haplótipos de *P. simium*, 15 haplótipos de *P. vivax* (H1: gi|26985113, H2: gi|26985105, H3: gi|26985137|gb|AF435, H4: gi|26985159, H5: gi|26985109, H6: gi|26985089, H7: gi|26985129, H8: gi|26985127, H9: gi|26985111, H10: gi|313848965, H11: gi|26985085, H12: gi|307000628, H13: gi|307000626, H14: gi|307000624, H15: gi|307000620) uma sequência de *P. knowlesi* (PKH 072850) e outra de *P. cynomolgi* (PCYB 073770) a partir do método de Máxima Verossimilhança, modelo TN93. Entre parênteses está representada a quantidade de sequências dentro de cada haplótipo. Foram considerados bootstrap acima de 60%, obtidos a partir de 5000 réplicas. Em vermelho, estão representados os haplótipos de *P. simium*.

### 5.4.4 Subunidade menor 18S do RNA ribossomal

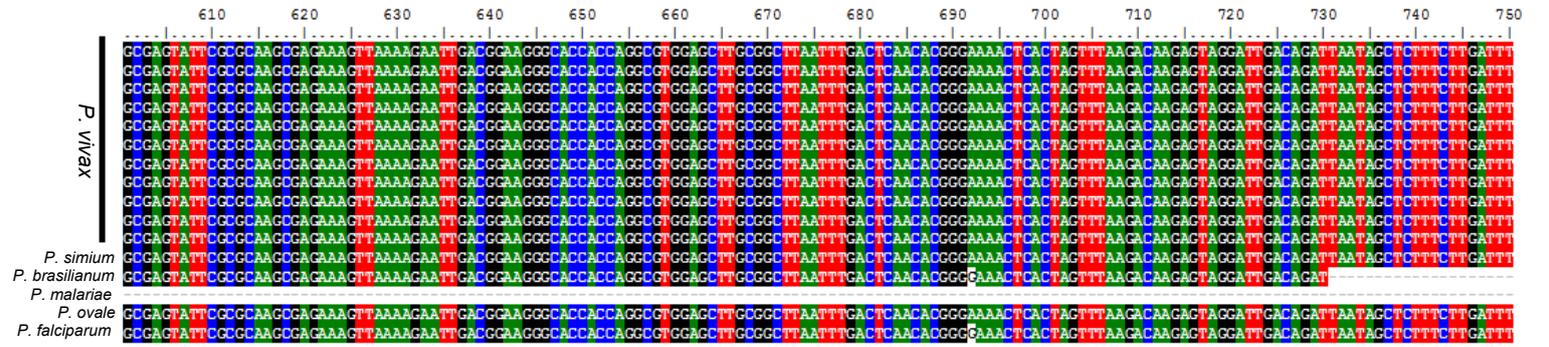
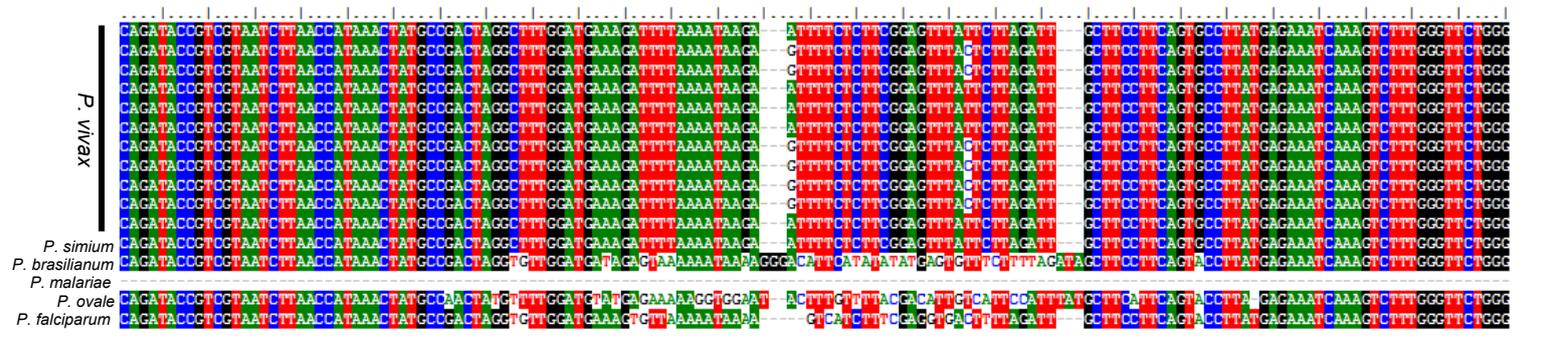
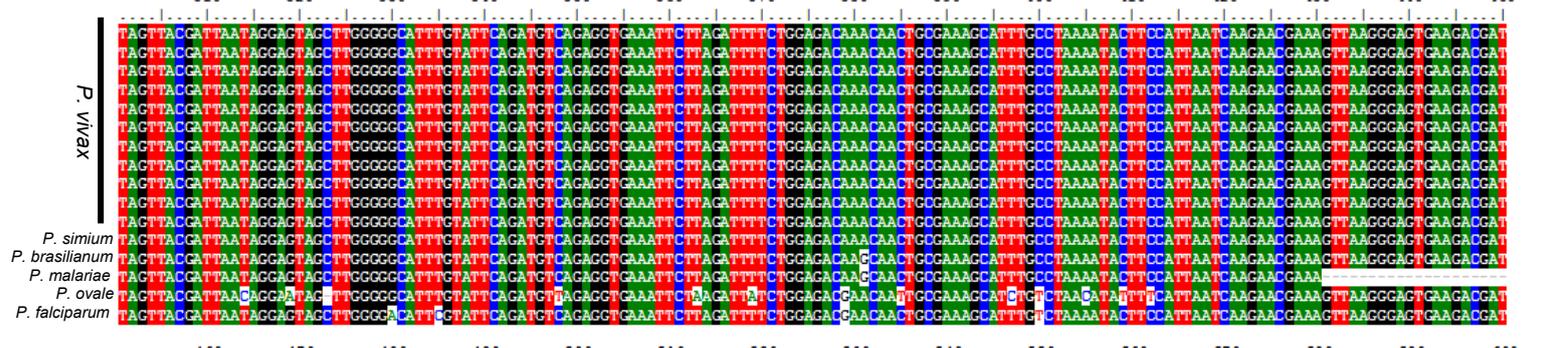
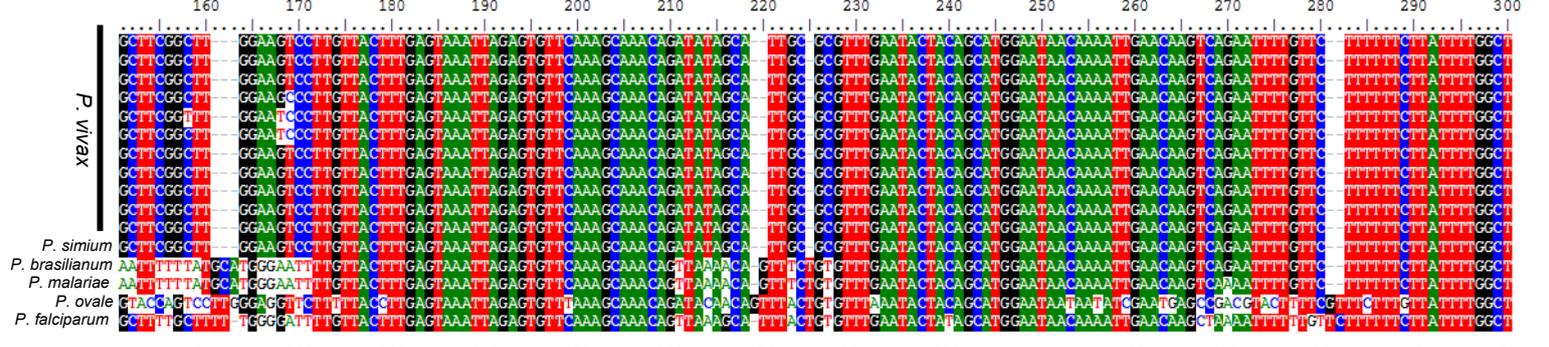
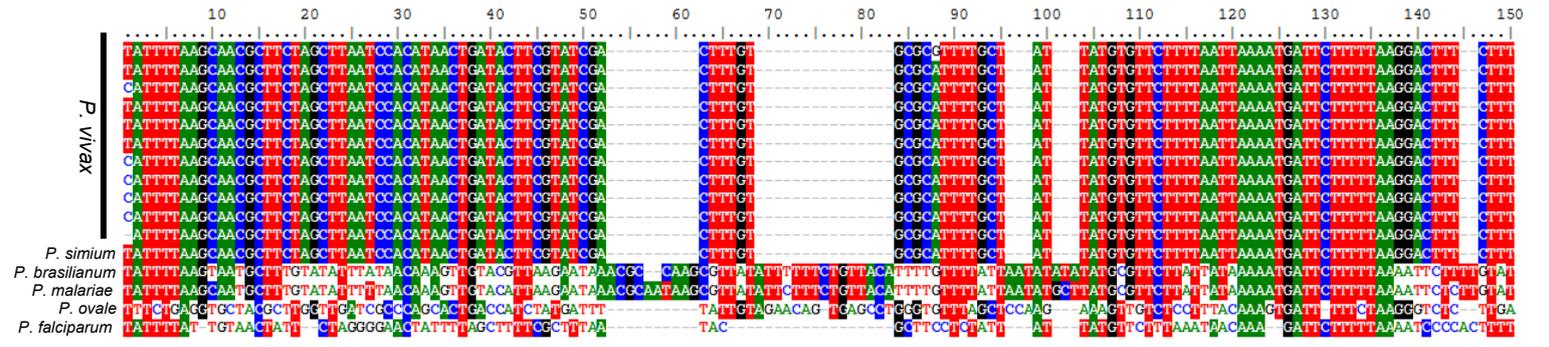
A partir do sequenciamento de DNA foi possível obter sequências de qualidade de uma porção do gene codificador do RNA ribossomal 18S de sete isolados de *P. simium* (posição nt 591 a 1439 de *P. vivax*, número de acesso HQ283223). Não foi possível obter sequências de qualidade a partir das amostras BL03 e BL69. Para as análises, foi selecionada uma das sete amostras, uma vez que foi identificado um haplótipo único para este alvo. Para as análises, foram selecionadas onze sequências do RNA ribossomal 18S de *P. vivax* do GenBank. A Figura 28 apresenta o alinhamento entre as espécies *P. simium* e *P. vivax*, demonstrando a alta similaridade genética entre as espécies. Todos os sítios segregantes apresentam polimorfismos comuns a estas duas espécies.

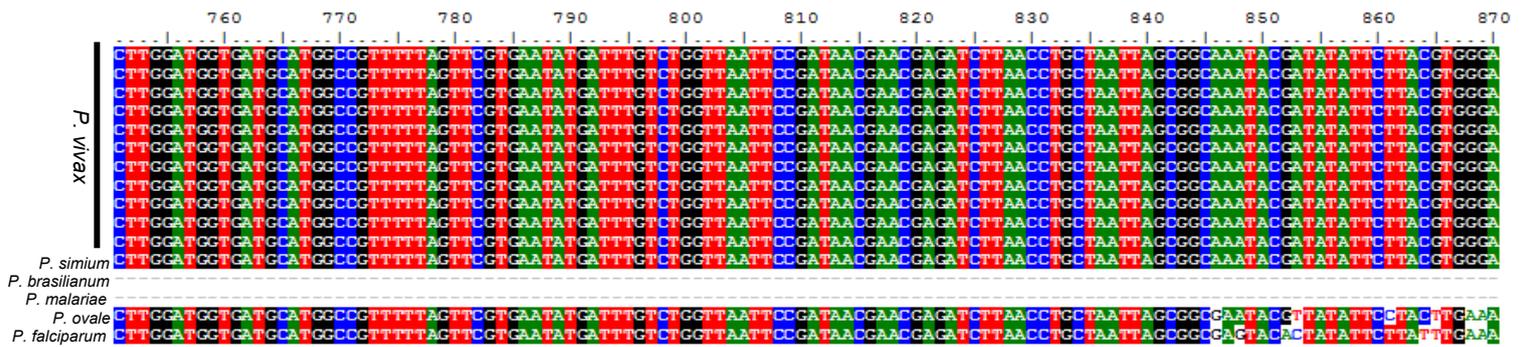




**Figura 28.** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de onze isolados do 18S de *P. vivax* e o haplótipo único de *P. simium*. Posição nt 616 a 1439 de *P. vivax*, número de acesso HQ283223.

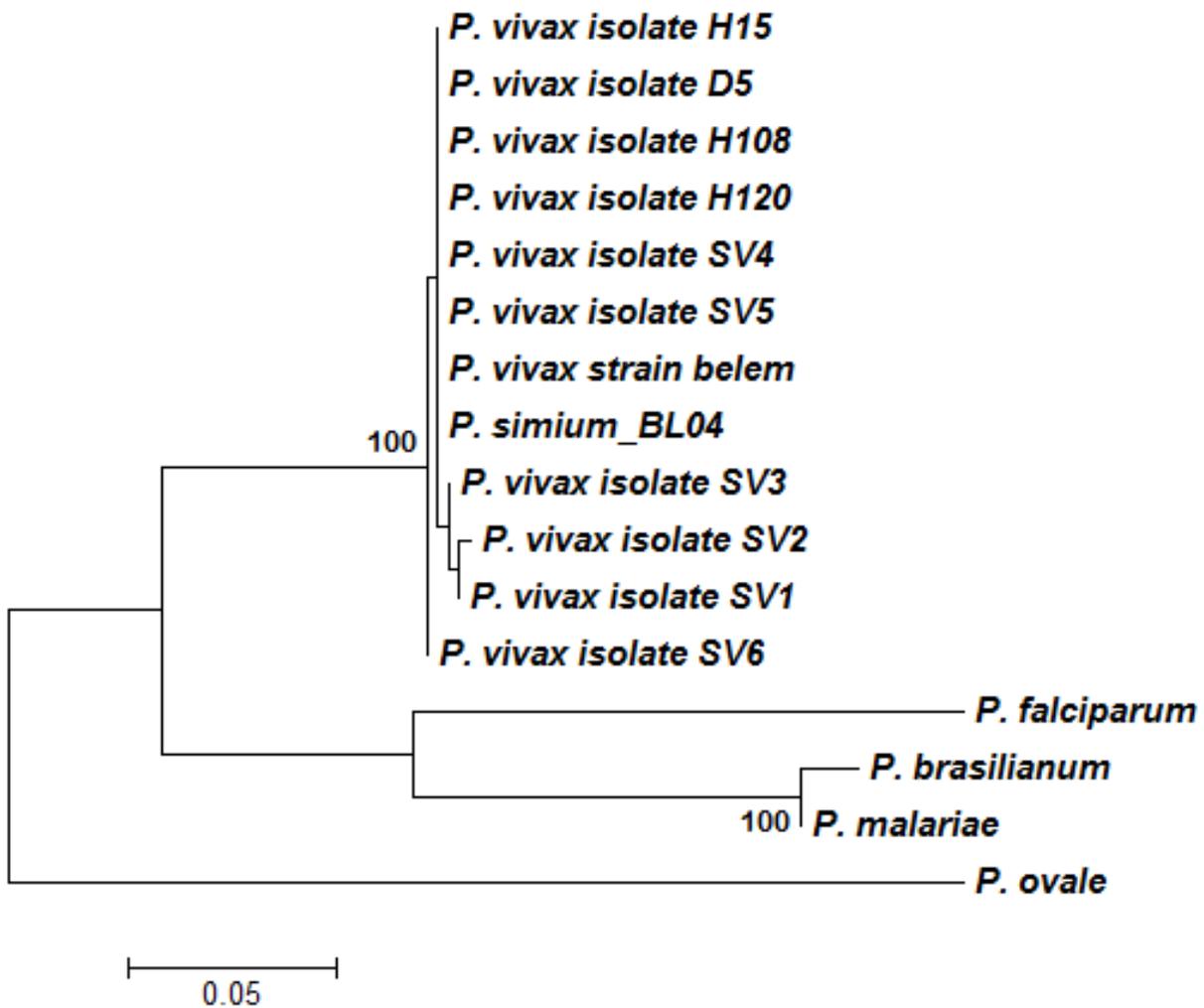
Foi realizado o alinhamento do haplótipo de *P. simium*, das onze sequências de *P. vivax* e as sequências das espécies *P. brasilianum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum*. A presença de regiões polimórficas específicas em cada espécie justificam o uso deste alvo molecular para o diagnóstico específico de malária (Figura 29).





**Figura 29.** Alinhamento múltiplo realizado pelo algoritmo Clustal W no software Bioedit de onze isolados do 18S de *P. vivax*, do haplótipo único de *P. simium* e as espécies *P. brasilianum* (KC906730), *P. malariae* (GU815531), *P. ovale* (KF018663) e *P. falciparum* (JQ627150). Posição nt 616 a 1439 de *P. vivax*, número de acesso HQ283223.

A partir das sequências obtidas do gene 18S, foi possível reconstruir as relações filogenéticas dos plasmódios, amplamente discutida na literatura. Nesse estudo, um resultado importante obtido, mesmo com um número maior de amostras de *P. simium* (na literatura foram utilizadas de uma a três sequências – Tazi & Ayala, 2011), por meio da região analisada, não foi possível distinguir o parasito de primatas neotropicais *P. simium* com os haplótipos de *P. vivax* (Figura 30).



**Figura 30.** Topologia da árvore do 18S com um haplótipo único de *P. simium*, onze isolados de *P. vivax* (D5: HQ283223, H15: HQ283224, H108: HQ283225, H120: HQ283226, SV4: JQ627156, SV5: JQ627157, SV3: JQ627155, SV2: JQ627154, SV1: JQ627153, SV6: JQ627158, Belém: AY579418) e uma sequência das espécies *P. falciparum* (JQ627150), *P. brasilianum* (KC906730), *P. malariae* (GU815531), *P. ovale* (KF018663), *P. knowlesi* (AY579417) e *P. cynomolgi* (JQ794445). A árvore foi gerada a partir do método de Máxima Verossimilhança, modelo TN93. Foram considerados apenas valores de *bootstrap* acima de 60%, obtidos a partir de 5.000 réplicas.

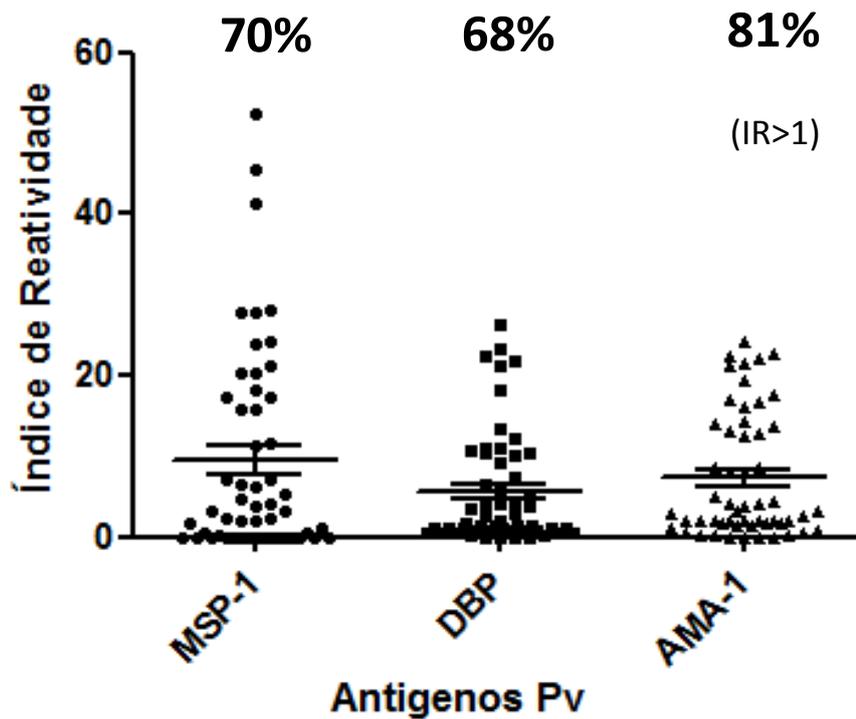
## 5.5 Ensaio Sorológicos

No presente estudo foram testados 55 soros de animais do cativeiro de Santa Catarina, sendo possível determinar uma reatividade no ELISA para a proteína recombinante PvDBP II equivalente a 67% (37/55) e equivalente a 65% (36/55) para a MSP1<sub>19</sub> e 85% (47/55) para AMA1, como demonstrado na Tabela 15 e na Figura 31. Os valores de densidade óptica no ELISA foram baixos em todos eles (médias de OD492nm DBP<sub>II</sub>=0.17, MSP-1<sub>19</sub>=0.11, AMA-1=0.23), no entanto, os *cut-offs* (IR de macacos não expostos para malária + 3 DP) foram igualmente baixos para todos os antígenos estudados sendo: 0.021, 0.027 e 0.0075, respectivamente. Assim, índices de reatividade significativos foram obtidos para os três antígenos (média de IR DBP<sub>II</sub>=6, MSP-1<sub>19</sub>=10, AMA-1=7).

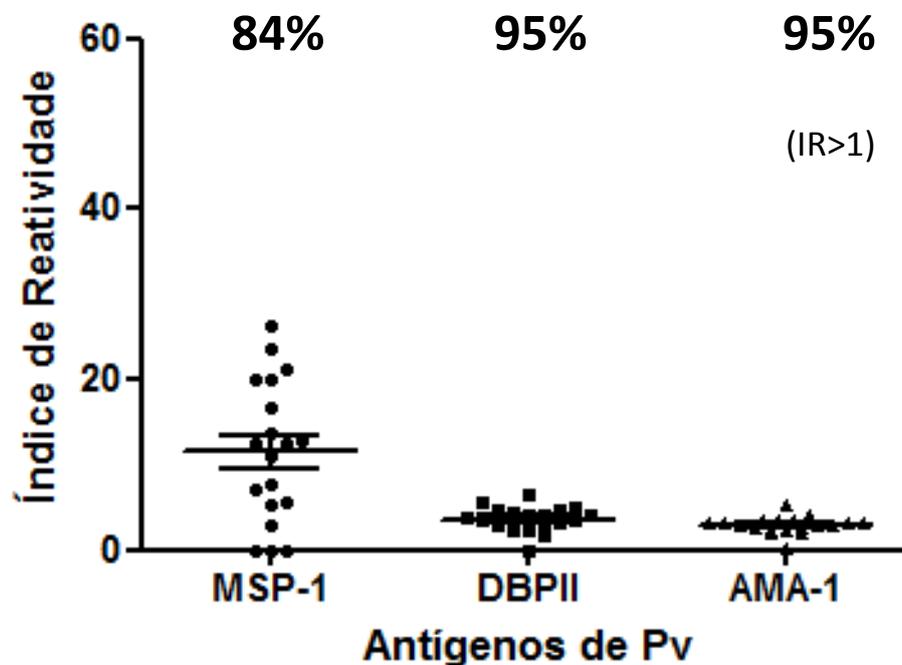
No estado do Paraná, também foram testados os soros de 19 primatas não humanos. Apesar de nenhum dos animais do Paraná apresentar amplificação no momento da coleta de sangue para *Plasmodium* spp. por meio de diferentes alvos moleculares pela PCR, foi possível identificar que alguns desses indivíduos apresentavam anticorpos específicos contra *P. vivax*. Foi possível determinar uma reatividade no ELISA para a proteína recombinante PvDBP<sub>II</sub> equivalente a 53% (10/19), igual a 84% para a MSP-1<sub>19</sub> (16/19) e 58% para AMA-1 (11/19), como demonstrado na Tabela 15 e na Figura 32.

**Tabela 15.** Resultado do ELISA para as proteínas de *P. vivax* MSP1<sub>19</sub>, AMA I e DBPII em soros de primatas não humanos de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul.

Proteínas de <i>P. vivax</i>	Anticorpos específicos	
	Santa Catarina n=55 (%)	Paraná e Mato Grosso do Sul n=19 (%)
MSP1 <sub>19</sub>	36 (70%)	10 (84%)
DBP II	37 (68%)	16 (95%)
AMA I	47 (81%)	11 (95%)



**Figura 31.** Índice de reatividade dos soros de primatas não humanos de Indaial (SC), contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* DBP<sub>II</sub>, MSP-1<sub>19</sub> e AMA-1. Positividade IR > 1. Barra horizontal representa a média e os desvios padrão.

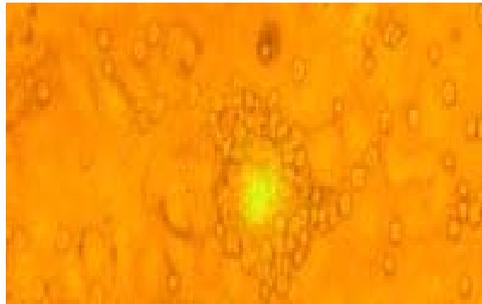


**Figura 32.** Índice de reatividade dos soros de primatas não humanos do Paraná e Mato Grosso do Sul, contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* DBP<sub>II</sub>, MSP-1<sub>19</sub> e AMA-1. Positividade IR > 1 (linha pontilhada). Barra horizontal representa a média e os desvios padrão.

## 5.6 Ensaio de adesão e inibição da interação ligante-receptor

O ensaio funcional foi realizado para verificar a interação entre a proteína DBP<sub>II</sub> (ligante) e DARC (receptor) presente nos eritrócitos de primatas neotropicais, bem como averiguar a capacidade de bloqueio de anticorpos de primatas da interação PvDBP<sub>II</sub>-DARC, particularmente importantes para ensaios vacinais.

Foram realizados ensaios de adesão utilizando-se eritrócitos de dois bugios do CEPESBI para observarmos a interação entre a proteína PvDBP<sub>II</sub> e seu receptor no eritrócito do bugio, a proteína DARC. Em ambos os ensaios de ligação, foi possível observar uma interação específica da PvDBP expressa em células COS7 e o antígeno de superfície do eritrócito dos primatas não humanos, DARC (Figura 33).



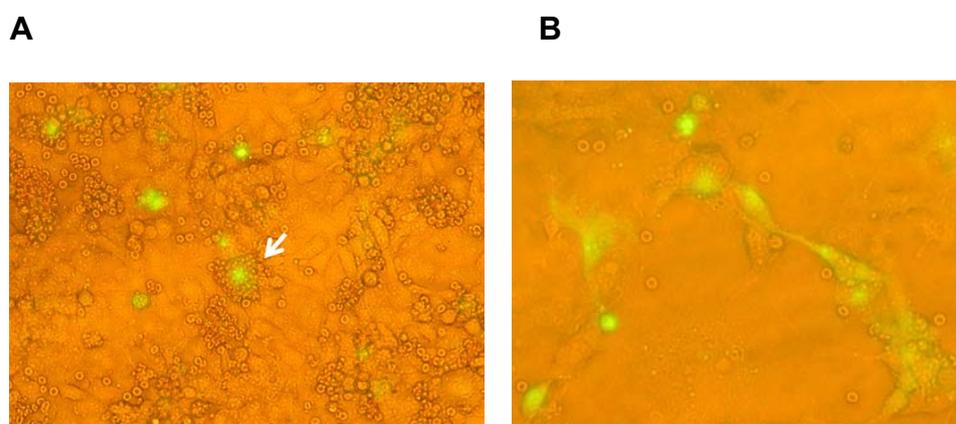
**Figura 33.** Interação específica entre a PvDBP<sub>II</sub> expressa na célula COS7 (fusionada a GFP - fluorescente) e a proteína DARC de eritrócitos de primatas não-humanos aderidos à PvDBP<sub>II</sub> formando uma roseta (amostra BL10).

Em um segundo momento, foi avaliada a capacidade dos anticorpos dos bugios presentes nos soros dos animais bloquearem a interação PvDBP-DARC no ensaio de inibição. Para este ensaio, além dos controles positivos e negativos, foram selecionados oito soros de bugios do cativeiro de Indaial, SC (Tabela 16 e Figura 34).

**Tabela 16.** Caracterização das amostras utilizadas no ensaio de inibição da interação DBP/DARC

Animais	MO	PCR	ELISA*
BL10	+	+	12
BL64	+	+	18
BL69	+	+	22
BL34	-	-	22
BL37	-	-	14
BL40	-	-	7
BL41	-	-	6
BL44	-	-	1

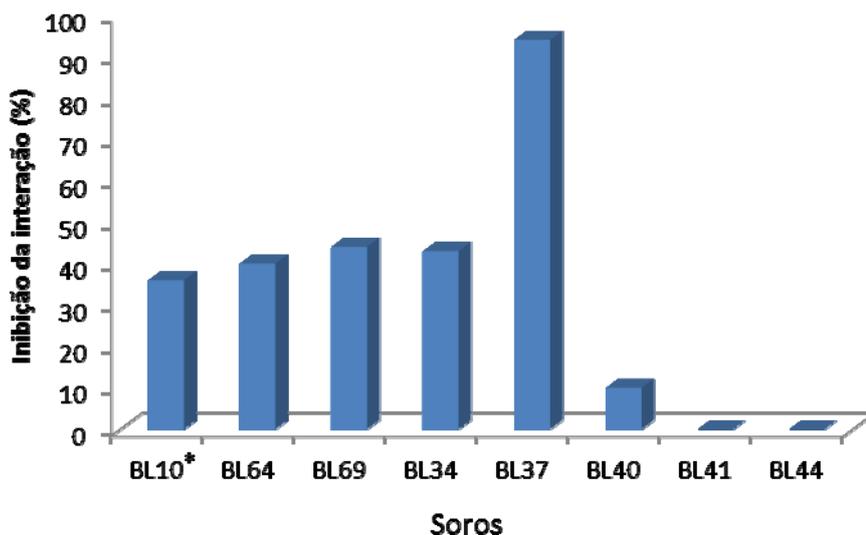
\* Índice de Reatividade para PvDBP<sub>II</sub>.



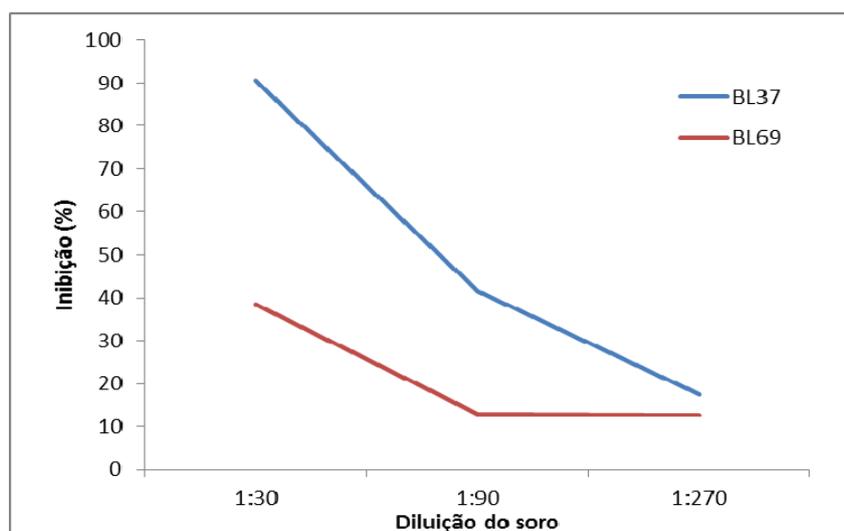
**Figura 34.** Representação dos controles positivos e negativos utilizados em todos os ensaios de ligação. **A:** Controle positivo ( $O^+/DARC^+$ ). A seta branca indica uma roseta formada pela interação entre DARC dos eritrócitos que se ligaram à PvDBP<sub>II</sub> expressa na célula COS7 (fluorescente). **B:** Controle negativo, ( $O^+/DARC^-$ ), onde não há formação de rosetas.

Os dados sugerem uma correlação positiva ( $R=0.843$ ,  $P=0.011$ ) entre o índice de reatividade do ELISA e a inibição da ligação, mas não houve associação com a presença de infecção aguda (detectada pelo PCR) e presença de anticorpos inibitórios (Figura 35). Além disso, os eritrócitos DARC negativos apresentaram níveis quase nulos de ligação às células COS7, como esperado (média de 1% de interação para DARC negativo contra 67% para DARC positivos).

Para duas amostras que apresentaram os mais altos níveis de inibição, BL37 (94%) e BL69 (44%) foi realizado um novo ensaio de inibição com diluição seriada dos soros a fim de se observar o efeito dose-resposta (Figura 36). Foi possível observar que os soros só reagem em baixas diluições (1:30), sendo que a atividade inibitória cai rapidamente nas maiores diluições (1:90 e 1:270) (Figura 36).



**Figura 35.** Porcentagem de inibição da interação entre PvDBP (expressa em células Cos7) e DARC por anticorpos presentes em soros de bugios. \*BL10 - animal que apresentou sintomas clínicos de malária.



**Figura 36.** Percentual de inibição da interação entre PvDBP e DARC em três diferentes diluições dos soros dos animais BL37 e BL69.

## 6 DISCUSSÃO

Os estudos de malária simiana no Brasil se iniciaram a partir da década de 60, logo após o primeiro relato de infecção humana por um parasito natural de macacos, o *P. cynomolgi*, em 1960 (Deane, 1992; Duarte *et al.*, 2006). Dois parasitos das florestas brasileiras, o *P. brasilianum*, na região amazônica e o *P. simium*, nas regiões de Mata Atlântica do sudeste e sul do país, causam infecção malárica em primatas neotropicais, sendo capazes de infectar macacos das famílias Cebidae e Atelidae. Das espécies que circulam no país, *P. simium* é semelhante ao parasito que infecta os humanos *P. vivax*, e o *P. brasilianum* semelhante ao *P. malariae*, tanto em nível morfológico e imunológico, quanto genético (Coatney, 1971; Barnwell *et al.*, 1986; de Arruda *et al.*, 1989; Deane, 1992; Escalante *et al.*, 1995; Duarte *et al.* 2006, Yamasaki *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2013). A taxa de infecção por plasmódios simianos entre os animais varia entre regiões, sendo as taxas mais altas encontradas para a região sudeste (35,6%), seguidas pela região sul (17,9%) e região da Amazônia (10,1%), por meio da microscopia ótica (Deane, 1992).

Recentemente, os casos humanos descritos por *P. knowlesi*, um parasito que infecta macacos do sudeste asiático com curso muitas vezes fatal em humanos, despertaram novamente o interesse pelos estudos dos parasitos simianos no Brasil e no mundo. As circunstâncias ecológicas e as atividades antrópicas que permitem um contato próximo entre humanos e símios promovem a circulação de parasitos simianos na população humana, suportando a hipótese de que, em circunstâncias específicas, os macacos possam atuar como reservatórios da doença em um caráter zoonótico (Coatney, 1971; Singh *et al.*, 2004; Cox-Singh *et al.*, 2008; CDC, 2008). Casos de malária em áreas de Mata Atlântica do país sugerem que os macacos infectados por parasitos simianos sejam responsáveis pela manutenção dos casos autóctones da doença, atuando como reservatório da malária na medida em que o hospedeiro humano estreita o seu contato com áreas de mata (Deane, 1992; Carreri-Bruno *et al.*, 1995, Duarte *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2011). No entanto, a caracterização da circulação do parasito simiano em diferentes hospedeiros (macacos e humanos) é ainda um desafio, tendo em vista a alta similaridade entre o *P. simium* e o *P. vivax*.

Na primeira parte do presente trabalho, foi possível caracterizar a infecção malárica em um bugio ruivo (*Alouatta clamitans*) do cativeiro CEPESBI em Indaial, Santa Catarina, do ponto de vista clínico, imunológico e molecular. Na literatura científica, não há relatos de primatas neotropicais naturalmente infectados pelo plasmódio com sinais clínicos, sendo este trabalho pioneiro. Os trabalhos que caracterizaram a clínica da malária em bugios foram todos induzidos por infecção experimental após esplenectomia dos animais (revisado no capítulo 13 do livro *The Primate Malariae* – Coatney, *et al.*, 1971). A malária por *P. simium* em primatas neotropicais é subpatente, crônica e geralmente assintomática, devido, provavelmente, a uma modulação do sistema imune dos primatas não humanos. Essa provável modulação explicaria porque bugios naturalmente infectados geralmente não apresentam sinais clínicos. No caso específico descrito neste trabalho, o animal havia sido remanejado de seu recinto para outro local, durante a reforma e melhoria de seu ambiente de cativeiro. A mudança de recinto pode ter causado estresse e, conseqüentemente, uma queda na imunidade do animal. Paralelamente, essa condição de baixa imunidade pode estar relacionada com o aumento da parasitemia, e conseqüentemente, com o surgimento dos sinais relacionados à malária.

Os sinais clínicos do *Alouatta clamitans* naturalmente infectado, associados aos achados laboratoriais deste estudo como apatia, inapetência, anemia e trombocitopenia severa concordam com os achados clínicos em infecções por *P. simium*/*P. vivax* em bugios esplenectomizados descritos na literatura (Deane *et al.*, 1969; Deane *et al.*, 1964). Achados similares como anemia moderada, trombocitopenia grave, alterações hepáticas e renais foram descritos em humanos infectados por *P. vivax* (Prasun Bhattacharjee *et al.*, 2013). A presença da inversão das taxas de albumina/globulina sugere uma alta estimulação antigênica que culmina na produção de globulinas. Estas taxas diminuídas reforçam também o dano hepático, o que já foi caracterizado em pacientes infectados por *P. vivax* (Netto *et al.*, 2014). As taxas elevadas de uréia e creatinina já foram identificadas em camundongos Balb/c infectados por *P. berguei* (Elias *et al.*, 2012). O aumento de creatinina define a Insuficiência Renal Aguda, de acordo com o guia de tratamento de malária da Organização

Mundial de Saúde e têm sido utilizado como biomarcador para a necrose tubular aguda em pacientes infectados por *P. vivax* (WHO, 2010; Plewes *et al.*, 2014). A trombocitopenia é uma das primeiras manifestações clínicas em infecções pelo *P. falciparum* em macacos *Saimiri* e *Aotus*, mas retornam rapidamente aos níveis normais após o pico de parasitemia (James *et al.*, 1985, Kakoma *et al.*, 1992), igualmente observado no animal sintomático deste estudo (Tabela 9). Adicionalmente, a trombocitopenia na malária induz a uma série de alterações hematológicas e hematopoiéticas em primatas não humanos (Collins & Campbell, 1983; James *et al.*, 1985; Warrell, 1987).

Durante o período de sintomas, o animal recebeu tratamento a base de sulfametoxazol/trimetoprim, um bactericida de amplo espectro, na tentativa de melhoria dos sinais clínicos, uma vez que o diagnóstico não havia sido concluído (as lâminas apenas sugeriam infecção por *Plasmodium* sp.). Contudo, o composto sulfa é um antimalárico eficiente para as fases sanguíneas do parasito, o que pode justificar a rápida recuperação da sintomatologia clínica do animal.

Na literatura, pesquisadores que se dedicaram ao estudo da malária simiana apontaram na década de 1960 um fator dificultador para compreensão da sintomatologia clínica da malária simiana. A manutenção dos bugios em cativeiro era extremamente difícil, o que impedia o acompanhamento dos animais naturalmente infectados por um período longo (Deane, 1967; Coatney *et al.*, 1971). Atualmente, com as novas metodologias de manutenção e preservação de espécies em cativeiro esse cenário mudou bastante. Porém, ainda com as facilidades atuais, o CEPESBI é um dos poucos locais que consegue manter bugios em cativeiro por um extenso período de tempo (mais de 10 anos).

Diante da infecção sintomática caracterizada neste bugio, nosso grupo se sentiu estimulado em estudar em um segundo momento mais detalhadamente a malária em primatas neotropicais de algumas regiões da Mata Atlântica brasileira. Para tal, foram realizadas coletas em bugios de cativeiro e de vida livre em Santa Catarina e em primatas de vida livre dos gêneros *Alouatta* e *Cebus* do Paraná e Mato Grosso do Sul. Para o diagnóstico

molecular de plasmódios nestes animais, foram utilizados protocolos de PCR bem estabelecidos para os parasitos humanos, por meio da Nested-PCR e PCR em Tempo real. Ambas as técnicas são amplamente utilizadas para a identificação específica dos plasmódios humanos e devido à alta similaridade entre os parasitos de símios foram utilizados no presente estudo. Os protocolos utilizados baseiam na amplificação da região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal, que é amplamente utilizada no diagnóstico de malária por apresentar regiões polimórficas flanqueadas por regiões altamente conservadas. Os polimorfismos encontrados nesta região são úteis para detecção gênero e espécie específica para os parasitos que infectam humanos (Snounou *et al.*, 1993). A Nested-PCR é um protocolo útil para diagnóstico por apresentar dois passos de amplificação, o que aumenta a capacidade de detecção do parasito (Snounou *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998). Os iniciadores utilizados para amplificar este gene foram também utilizados para o sequenciamento de DNA do 18S, no entanto, a sequência de *P. simium* foi exatamente igual à sequência de diferentes isolados de *P. vivax*, reforçando a proximidade genética entre tais espécies, como demonstrado por outros autores (Tazi & Ayala, 2011).

Através dos protocolos moleculares, foi possível observar uma taxa de infecção natural por *P. simium/P. vivax* em Santa Catarina equivalente a 35% em bugios de vida livre e 4%, em bugios de cativeiro (Tabela 11). Já no Paraná e Mato Grosso do Sul, não foram detectados animais positivos (*Alouatta* e *Cebus*) pela PCR. A ausência de infecção no gênero *Cebus* (Paraná e Mato Grosso do Sul) está de acordo com outros estudos que mostraram uma prevalência muito baixa ou nula de malária para este gênero (Arruda *et al.*, 1985; Deane 1992; Fandeur *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2008).

Apesar das infecções serem subpatentes, a taxa de infecção malárica em bugios no sul é geralmente alta, sendo 42,4% por *P. simium*, contra 33,3% por *P. brasilianum* e 18,2% de infecções mistas por estas duas espécies (Deane, 1992), portanto, pode ser que os bugios do Paraná e Mato Grosso do Sul apresentem uma parasitemia abaixo do limite de detecção da PCR ou encontram-se infectados por uma espécie de plasmódio até o momento não caracterizada. Esta hipótese foi recentemente sugerida no trabalho de Liu e

colaboradores (2014), onde espécies de *P. vivax*-like de primatas do Velho Mundo não agruparam com amostras de *P. vivax* de humanos de diferentes regiões do globo, ou sequer com amostras de primatas coletadas na mesma região da África, sugerindo dessa forma que uma nova espécie circula entre os chimpanzés da região.

A presença de nove animais infectados em Santa Catarina, todos confirmados por diversos alvos moleculares e alguns deles também pela microscopia ótica reforçam a possibilidade de um ciclo zoonótico nesta área do estudo. Do total de animais positivos (9/65, 14%), seis deles foram coletados no município de Indaial (BL03, BL04, BL05, BL06, BL10 E BL 28), um em Pomerode (BL61) e dois em Blumenau (BL64 E BL69). A presença de animais positivos nos municípios de Indaial e Blumenau desperta uma preocupação particular, pelo fato de que casos de malária autóctone já foram reportados nestes municípios (Machado *et al.*, 2003; Portes *et al.*, 2010). Além disso, a presença abundante dos vetores somados à proximidade dos bugios com a população humana reforçam a necessidade de uma vigilância epidemiológica mais acurada nestas áreas.

Yamasaki e colaboradores (2011) analisaram 50 bugios ruivos resgatados de áreas de Mata Atlântica da região metropolitana de São Paulo, encontrando uma taxa de infecção de 18% (9/50) para *P. simium*/*P. vivax* e 4%(2/50) de *P. brasilianum*/*P. malariae*. Este grupo encontrou uma taxa de positividade nos animais muito semelhante à descrita por nosso grupo (14% ou 9/65). Além disso, foi identificado em dois animais a circulação de outro parasito simiano, o *P. brasilianum*, não identificado em nossas amostras. Apesar disso, de forma geral, o *P. brasilianum* apresenta uma taxa de infectividade menor quando comparado ao *P. simium* (Deane *et al.*, 1992).

Duarte e colaboradores (2008), realizando uma pesquisa em populações de primatas neotropicais (n=448) em áreas de Mata Atlântica e cerrado do estado de São Paulo, encontraram 13% (9/71) de infecção por *Plasmodium* sp. por PCR em bugios ruivos (*Alouatta clamitans*) e 7% (16/235) de infecção malárica em bugios pretos (*Alouatta caraya*). Entre os animais dos gêneros *Cebus* e *Callitrix* não foram encontrados resultados positivos, assim como o

descrito no presente trabalho (infecção nula para o gênero *Cebus*). Este grupo caracterizou além de infecções por *P. vivax/P. simium* e *P. malariae/P. brasilianum*, uma infecção por *P. falciparum* entre os animais estudados. Através da microscopia, os autores identificaram a presença de plasmódio apenas em sete bugios pretos (3% ou 7/235). Esses resultados concordam com os nossos achados, onde a detecção pela microscopia foi menor em função da parasitemia extremamente baixa, supostamente justificada pela infecção crônica nos primatas neotropicais. Igualmente, o grupo não conseguiu caracterizar em nível de espécie através da microscopia óptica, sendo todas as análises da microscopia caracterizadas como *Plasmodium* sp., assim como no presente trabalho.

Diferentes marcadores moleculares são utilizados em estudos de variabilidade genética e a escolha do marcador influencia diretamente nas conclusões do trabalho. Trabalhos desta natureza envolvendo o *P. vivax* têm possibilitado diferentes conclusões. Através dos genomas mitocondriais, foi possível caracterizar uma variabilidade limitada consistente com a hipótese de que o parasito foi recentemente introduzido no Novo Mundo (Mu *et al.*, 2005; Culleton *et al.*, 2011). Em contrapartida, estudos que utilizaram microssatélites demonstraram uma variabilidade alta entre diferentes regiões geográficas (Van den Eede *et al.*, 2010; Rezende *et al.* 2010; De Brito & Ferreira, 2011; de Araújo *et al.*, 2012). Já os estudos que utilizam genes nucleares que codificam antígenos do parasito, apresentaram menor diversidade local comparado aos microssatélites, porém forte estruturação geográfica (Chenet *et al.*, 2012). Estes diferentes resultados procedem da diferença entre as amostras utilizadas e na própria característica do marcador, como taxas de mutação e seleção.

O uso de marcadores moleculares para trabalhos de diversidade genética e estrutura populacional dos plasmódios tem sido amplamente utilizado para *P. falciparum* e mais recentemente para *P. vivax* (revisado em Brito & Ferreira, 2011). A maioria dos estudos com marcadores genéticos foi descrita para *P. falciparum*, sendo identificados mais de mil loci de microssatélites para esta espécie e centenas de polimorfismos de base única (SNPs). Poucos marcadores foram descritos para *P. vivax*, sendo em sua maioria genes ortólogos de proteínas codificadoras de antígenos já descritas

para *P. falciparum*. De modo geral, o fato de existirem poucos estudos para *P. vivax*, comparado ao *P. falciparum* se deve primeiramente a menor malignidade associada ao *P. vivax*, bem como a dificuldade de manutenção deste parasito em cultura (Golenda *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 2000; Leclerc *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Furuya *et al.*, 2014). Trabalhos desta natureza utilizando-se parasitos simianos geneticamente próximos aos plasmódios humanos são ainda mais restritos. A caracterização dos haplótipos de plasmódio que circulam em primatas neotropicais seria crucial para determinar se os parasitos que circulam entre os humanos são os mesmos que circulam nos primatas, em um ciclo zoonótico. A caracterização de alelos específicos em diferentes hospedeiros traria também importantes perspectivas para a caracterização das infecções, principalmente para o diagnóstico específico do parasito simiano, ainda não disponível.

No presente trabalho, foram utilizados 4 loci de microssatélites e as regiões polimórficas da MSP-1, blocos 02 e 10, descritos para *P. vivax* e padronizados por nosso grupo. Através da análise destes marcadores, foi possível identificar alelos de *P. simium* em bugios de Santa Catarina não identificados para *P. vivax* em humanos da Amazônia, principalmente para as regiões polimórficas da MSP-1 (blocos 02 e 10). Estes resultados foram confirmados pelo sequenciamento, onde foi possível caracterizar sítios segregantes entre as amostras de *P. simium* e *P. vivax* para o bloco 10. Contudo, através do sequenciamento do bloco 02 não foram encontrados polimorfismos entre os isolados de *P. simium*, o que pode ser justificado pela menor cobertura da região sequenciada. A região sequenciada apresentou elevada conservação, porém não significa que todo o bloco 02 da MSP-1 de *P. simium* seja igualmente conservado.

Apesar da caracterização de alelos ainda não descritos para *P. vivax* em humanos, é preciso cautela na utilização destes marcadores para a diferenciação dos parasitos nos hospedeiros humanos e simianos. Isso ocorre, uma vez que não foi possível realizar o levantamento da infecção por *P. vivax* em humanos da mesma região onde os primatas foram coletados, sendo, portanto, precoce assumir a identificação de “novos” alelos. A caracterização dos alelos na população de parasitos que circula em humanos de Santa

Catarina seria crucial para averiguarmos se a diferença encontrada neste estudo não seria apenas devido à distância geográfica entre as populações de parasitos estudadas, simianos do sul e humanos do norte. Além disso, é importante incluir também amostras de macacos de outras regiões deste bioma para confirmar a especificidade dos marcadores para *P. simium*. Somente dessa forma será possível avaliar tais marcadores como ferramenta diagnóstica potencial da malária de bromélia em humanos e macacos do Novo Mundo. Contudo, espera-se que este trabalho pioneiro estimule a caracterização da diversidade genética do *P. simium* na Mata Atlântica, uma vez que trabalhos dessa natureza ainda não foram realizados.

Em um terceiro momento, foi realizada uma análise sorológica nos animais deste estudo, sendo possível determinar uma alta porcentagem de animais com reatividade humoral contra as proteínas recombinantes PvDBP<sub>II</sub>, MSP1<sub>19</sub> e AMA1 (Tabela 15 e Figuras 31 e 32). A mais baixa imunogenicidade encontrada para PvDBP comparada a MSP-1 pode ser atribuída provavelmente à característica da proteína DBP, visto que é liberada somente no momento da invasão (teoria do *just-in-time*) (VanBuskirk *et al.*, 2004). Esse fato possibilita ao parasito minimizar a exposição direta do ligante funcional aos anticorpos inibitórios, sendo, portanto, um mecanismo de escape do *P. vivax* ao sistema imune do hospedeiro. Contudo, a imunogenicidade da DBP com relação à MSP-1<sub>19</sub> no presente trabalho foi semelhante, o que não era esperado, já que a MSP-1, assim como a AMA-1 é mais imunogênica por ser exposta por mais tempo ao sistema imune do hospedeiro. A AMA-1, apesar de localizar-se nos micronemas como a DBP, é utilizada para a reorientação pelo merozoíto durante a invasão, o que faz com esta proteína seja mais exposta ao sistema imune. Além disso, a AMA-1 já foi caracterizada no esporozoíto, sendo necessária para a invasão do parasito também nos hepatócitos (Haghi *et al.*, 2012). A resposta alta para todos os antígenos sugere que a resposta em primatas seja diferente da resposta em humanos. A resposta de anticorpos foi ainda mais elevada nos animais do Mato Grosso do Sul e do Paraná, inclusive em primatas que nunca foram descritos como suscetíveis à malária pelo *P. simium*. Este resultado sugere que estes animais têm sido expostos à infecção malárica, talvez por parasitos molecularmente distintos e por isso, não

identificados pelos protocolos moleculares, como sugerido por Liu e colaboradores (2014). Entretanto, uma das limitações desta parte do estudo foi o fato das proteínas recombinantes utilizadas serem de *P. vivax*, apesar dos genes que codificam proteínas de invasão do *P. simium* apresentarem polimorfismos confirmados pelo sequenciamento de DNA. Além disso, o anticorpo secundário utilizado para os ensaios foi obtido do macaco *Macaca mulata* (um primata do Velho Mundo). No entanto, este anti-IgG é o único comercialmente disponível e é amplamente utilizado nos inquéritos sorológicos para malária simiana no Brasil e em outras partes do Mundo (Volney *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2011).

Duarte e colaboradores (2006) descreveram a ocorrência de anticorpos contra os plasmódios em 777 soros de macacos coletados em três diferentes regiões do Brasil (Cerrado-Brasília, Floresta Atlântica semidecídua-São Paulo e Floresta Atlântica-divisa de São Paulo e Mato Grosso do Sul), onde casos de malária autóctone já foram reportados. O grupo encontrou uma alta prevalência de anticorpos contra a CSP em todas as áreas, sugerindo o contato intenso de esporozoítos do parasito provenientes de anofelinos infectados na população de macacos. Além disso, a resposta contra formas assexuadas do parasito indicam o desenvolvimento da infecção malárica.

Yamasaki e colaboradores (2011) realizaram um levantamento sorológico em bugios ruivos da região metropolitana de São Paulo, onde identificaram uma reatividade para a MSP1 de *P. vivax* equivalente a 42% (21/50), enquanto a encontrada em nossos animais de Indaial, Santa Catarina foi igual a 65% (36/55). O grupo avaliou também a resposta contra a proteína CS, encontrando para a proteína VK210 uma reatividade equivalente a 24% (12/50); para a VK247, 6% (3/50); para "*P. vivax-like*" 8% (4/50); para *P. brasilianum/P. malariae* 24% (12/50) e 28%(14/50) para *P. falciparum*. Todos estes trabalhos apesar da reatividade mais baixa, quando comparado aos nossos resultados, concordam com nossos achados, reforçando a circulação do parasito através da presença de anticorpos específicos na população de primatas não humanos. A presença de possíveis reservatórios silvestres traz importantes implicações para a saúde pública (Liu *et al.*, 2014) e as regiões de

resquício de Mata Atlântica deverim ser incluídas pelos órgãos públicos nos programas de Vigilância e Controle da malária no país.

Nosso grupo demonstrou em um estudo anterior, que diferentes populações da Amazônia brasileira desenvolvem anticorpos anti-PvDBP no ELISA, sendo que a prevalência e os níveis de anticorpos variam em função do nível de exposição à doença, de forma que a frequência de respondedores foi maior entre indivíduos que apresentavam história de longa exposição à malária (>10 anos) (Cerávolo *et al.*, 2008).

Em outro estudo também realizado por nossa equipe, Souza-Silva e colaboradores (2010) analisaram o perfil de anticorpos IgG contra PvDBP e anticorpos inibitórios em 366 indivíduos da Amazônia e destes, 68 (18,6%) apresentaram anticorpos contra a PvDBP no ELISA. Além disso, 16 de 50 indivíduos testados positivos pelo ELISA (36%) apresentaram anticorpos capazes de inibir a ligação DBP-DARC no ensaio de inibição. Além disso, a maioria dos indivíduos que apresentaram na primeira coleta anticorpos capazes de inibir a interação (13 de 16), quando avaliados 12 meses depois do teste, continuaram exibindo o mesmo padrão de inibição.

Em um trabalho mais recente do grupo, Souza-Silva e colaboradores (2014), analisando a resposta de anticorpos em 620 voluntários da Amazônia (Rio Pardo-Amazonas), distribuídos em três coortes, observaram IgG contra a PvDBP<sub>II</sub> em 32% dos indivíduos e em 50% contra a PvDBP<sub>II-IV</sub> através do ELISA. O perfil de anticorpos da PvDBP<sub>II</sub> durante o estudo foi relativamente estável e não foi associado com a presença de infecção malárica. Já o perfil da PvDBP<sub>II-IV</sub> flutuou de acordo com a transmissão da malária na região. Os indivíduos respondedores para PvDBP<sub>II</sub> foram divididos em alto respondedores (RI>4), correspondendo a 50% dos indivíduos e baixo respondedores (RI≤4), 70 a 85% dos indivíduos. Diante de nossos resultados, foi possível observar uma maior resposta contra a PvDBP (a mesma utilizada no trabalho de Souza-Silva), sugerindo que existe uma diferença no padrão de resposta entre humanos e primatas. No entanto, é possível que as proteínas diferentes possam ter influenciado no padrão de resposta.

A proteína DBP tem se mostrado forte candidata a vacina contra a malária causada por *P. vivax*, por ser o principal ligante utilizado na invasão pelo merozoíto. A invasão pelo *P. vivax* no eritrócito humano é um processo complexo, com múltiplos passos e que envolve interações específicas entre ligantes do parasito e receptores no eritrócito (McHenry *et al.*, 2010). O processo de internalização do *P. vivax* no eritrócito, depende principalmente da interação específica entre a proteína Duffy de *P. vivax*, presente nos micronemas, mais especificamente a região II da PvDBP, e o receptor eritrocítico DARC (Ntumngia *et al.*, 2009). Portanto, o bloqueio desta ligação culmina na proteção contra malária por *P. vivax*, reforçando o potencial da proteína como vacina anti-malárica. Ensaio de ligação utilizando-se células COS7 expressando a região II da PvDBP foram primeiramente padronizados por Barnwell e colaboradores (1989) para ensaios de vacinas e mais recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (Souza-Silva *et al.*, 2010). A expressão heteróloga de PvDBP na célula COS7 é de crucial importância, uma vez que a espécie *P. vivax* é de difícil cultivo, existindo apenas poucos laboratórios no mundo capazes de manter a espécie em cultivo contínuo. Além disso, nosso grupo de pesquisa (Cerávolo *et al.*, 2008), demonstrou que anticorpos de indivíduos expostos à malária são capazes de bloquear a interação DARC-DBP nos ensaios *in vitro* utilizando-se células COS7 que expressavam diferentes variantes da PvDBP<sub>II</sub>. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que indivíduos residentes em área endêmica instável, como a Amazônia, desenvolvem anticorpos bloqueadores da interação DBP<sub>II</sub>-DARC. Os resultados obtidos pelo grupo também demonstraram que esta resposta é cepa específica, assim, polimorfismos na proteína podem alterar a especificidade de reconhecimento dos anticorpos anti-PvDBP (Ceravolo *et al.*, 2009).

A interação específica entre a PvDBP<sub>II</sub> e o antígeno DARC presente no eritrócitos testada em dois bugios ruivos deste estudo, nos estimulou a avaliar, pela primeira vez, a capacidade dos anticorpos dos bugios bloquearem a interação PvDBP<sub>II</sub>-DARC. Nossos resultados demonstraram que os anticorpos presentes nos soros de *Alouatta clamitans* foram capazes de bloquear a interação entre PvDBP<sub>II</sub>-DARC, apresentando uma correlação positiva entre o

índice de reatividade no ELISA e a capacidade de inibição da interação. É importante ressaltar que para este ensaio, uma das amostras utilizadas (BL37-Hit) não foi testada nos protocolos de PCR no mesmo momento da coleta do soro. Os dados negativos de PCR são referentes à primeira coleta realizada um ano antes, onde foi coletado apenas o sangue do animal. O animal foi novamente sangrado por ter apresentado sintomas clínicos inespecíficos, como apatia, plaquetopenia e emagrecimento. No entanto, só conseguimos obter o soro deste animal, uma vez que o sangue foi utilizado para a microscopia óptica. No entanto, através da microscopia, não foi possível identificar o parasito da malária, sendo a infecção malárica descartada pelo veterinário. O animal evoluiu em duas semanas para cura clínica, porém, a alta reatividade no ELISA juntamente com o bloqueio praticamente total da interação PvDBP<sub>II</sub>-DARC (94% de inibição), trazem fortes indícios de que o animal apresentou uma infecção por plasmódio não detectável pela microscopia óptica. Para todas as outras amostras utilizadas neste ensaio, foram obtidos o soro e o sangue no mesmo momento, sendo os resultados de PCR condizentes com o mesmo período da coleta dos soros. O fato de encontrarmos uma correlação positiva entre o índice de reatividade no ELISA e a inibição da ligação PvDBP-DARC, pode ser justificado pelo fato da infecção simiana ser crônica e não tratada, de forma que o contato constante com o parasito na circulação sanguínea seja capaz de ativar a memória imunológica e levar a produção de uma alta taxa de anticorpos inibitórios.

A ligação específica demonstrada no presente trabalho entre DARC de *Alouatta clamitans*, um hospedeiro natural para *P. simium*, e a PvDBP<sub>II</sub> apontam a possibilidade de novos estudos que envolvam o uso deste modelo natural para testes de vacina contra o *P. vivax*. Avaliar uma vacina potencial em primatas não humanos **naturalmente** infectados por *P. simium*, um parasita geneticamente próximo ao *P. vivax*, seria ideal devido também à proximidade genética entre os hospedeiros (Galinski & Barnwell, 2003). Na literatura, ainda não havia sido explorada tal interação (DARC-PvDBP) de bugios, sendo o nosso trabalho inédito. O macaco *Saimiri bolivinensis* tem sido exaustivamente utilizado em ensaios de vacina contra o *P. vivax*, embora ensaios funcionais realizados por Barnwell e colaboradores (1989) tenham demonstrado que o *P.*

*vivax* infectando esses animais não utiliza o antígeno DARC para internalizar no eritrócito. Mchenry e colaboradores (2010) demonstraram que o macaco neotropical *Aotus nancymae* seria um bom modelo para vacina *vivax*, pois apresenta forte ligação PvDBP<sub>II</sub>-DARC *in vitro*. No entanto, como o macaco *Aotus* não é hospedeiro natural para malária por *P. simium*/*P. vivax*, é provável que os resultados obtidos a partir deste modelo não sejam totalmente aplicáveis para humanos.

Neste estudo, além da caracterização molecular e imunológica da infecção por plasmódio, também foi possível obter sequências gênicas dos bugios parasitados de Indaial, SC o que permitiu a realização de análises da diversidade genética bem como a reconstrução das relações evolutivas dos plasmódios. Nesta etapa, foram utilizados genes nucleares, como o 18S e genes que codificam proteínas utilizadas no processo de invasão (*dbp<sub>II</sub>* e *msp-1*). Além disso, foram sequenciadas porções do gene DARC dos primatas infectados por plasmódio, o que pode trazer maiores esclarecimentos sobre a via de invasão do *P. simium* e sua história evolutiva entre os primatas, assim como demonstrado por Demogines e colaboradores (2011) e Oliveira e colaboradores (2012). Até o momento, não existem trabalhos que avaliem os polimorfismos ao longo do gene DARC na espécie naturalmente suscetível a infecção por plasmódio, o *Alouatta clamitans*. O sequenciamento de DARC de *Alouatta* permitirá uma análise evolutiva mais precisa da coevolução destas duas proteínas: DBP e DARC. Nossos resultados em relação à proteína DARC são muito preliminares, pois as regiões sequenciadas são pequenas e, portanto, insuficientes para conclusões mais robustas sobre a história deste gene e sua correlação com a *dbp*. No entanto, foi possível confirmar que todos os primatas não possuem a mutação na posição -33T>C, que caracteriza o DARC negativo, como já descrito na literatura (Demogines *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). Além disso, através da região denominada DARC-1, foi possível reproduzir a filogenia dos primatas nos três grandes grupos, Hominidae, Primatas do Novo Mundo e Primatas do Velho Mundo. Em contrapartida, a região denominada DARC-2 não foi capaz de reproduzir a filogenia dos primatas. É válido ressaltar que a região DARC-2 é bem menor

que a região de DARC-1, apresentando em torno de 200 pb. A região DARC-1 apresenta 500 pb, o que pode ter influenciado nas análises evolutivas.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento do DNA das amostras positivas para os genes amplificados permitiu estudar as relações filogenéticas entre *P. simium* e *P. vivax*, ainda muito discutida na literatura. O sequenciamento do gene 18S de amostras de macacos infectados por plasmódio simiano, permitiu a caracterização de um haplótipo único de *P. simium*, com alta similaridade genética com o *P. vivax*, vista pelo alinhamento e também pela reconstrução filogenética (Figura 30). Estes resultados concordam com outros achados na literatura com base nestes mesmos alvos, sugerindo que estas espécies são muito próximas do ponto de vista genético e evolutivo (Lal *et al.*, 1988; Goldman *et al.*, 1993; Escalante *et al.*, 1995, 1998; Fandeur *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Leclerc *et al.*, 2004; Tazi & Ayala, 2011). Além da concordância com os resultados da literatura, nossos dados foram concordantes para os diferentes genes. Contudo, genes que sofrem pressão seletiva tais como *dbpII* e *msp-1* não são ideais para representar a filogenia da espécie, não sendo considerados bons marcadores evolutivos.

As análises de diversidade genética para o gene da *dbp* agrupou os parasitos de primatas neotropicais em três haplótipos distintos. Nas análises filogenéticas utilizando-se os haplótipos de *P. simium* dos primatas e 19 haplótipos de *P. vivax* humano, foi possível agrupar os haplótipos de *P. simium* em um clado único, em função dos três sítios segregantes conservados entre as espécies simianas. Porém, mesmo com alguns sítios segregantes, o *P. simium* apresentou a partir deste gene uma alta proximidade genética com relação ao *P. vivax*. Esta proximidade evolutiva elevada foi observada em todas as análises filogenéticas realizadas neste trabalho, o que foi confirmado pelos valores significativos de *bootstrap* na topologia das árvores filogenéticas. A alta identidade genética entre estes parasitos (humanos e simianos) demonstrada neste estudo sugere a possibilidade de uma transferência de hospedeiros entre humanos e macacos em um tempo evolutivo muito recente, assim como já fora descrito por outros autores (Escalante & Ayala; Ayala *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2005; Tazi & Ayala, 2011; Liu *et al.*, 2014). Interessantemente, um dos polimorfismos de *P. simium* deste estudo nunca foi

descrito entre as amostras de *P. vivax* do mundo e apresentou alta conservação entre os parasitos simianos, trazendo perspectivas para a diferenciação espécie-específica entre o *P. vivax* e o *P. simium*, por meio de uma sonda exclusiva para este sítio.

De forma geral, trabalhos que avaliaram as relações filogenéticas entre proteínas de invasão de *P. vivax* e *P. simium* foram realizados, porém nenhum deles utilizou o gene da dbp nas análises. Primeiramente, porque é um gene que sofre pressão seletiva, assim como *msp-1*, não sendo ideal para reconstrução da filogenia da espécie. Contudo, analisar este gene é interessante para entendermos a co-volução das proteínas DBP e DARC, bem como compreender se o mecanismo de invasão destes parasitos é semelhante. Além disso, todas as análises na literatura utilizando tanto genes nucleares quanto mitocondriais, foram baseadas em um número ainda mais restrito de amostras (Escalante *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2005; Tazi & Ayala, 2011), o que limita ainda mais as conclusões. Apesar do número ainda limitado de sequências de *P. simium* obtidas neste estudo, nosso trabalho é o primeiro a avaliar as relações filogenéticas entre este parasito e os demais parasitos humanos com um número relativamente maior de sequências. Análises de diversidade nucleotídica e de filogenia molecular com um número relativamente maior de amostras bem como o uso concomitante de diferentes genes, conferem maior robustez aos trabalhos. Um exemplo disso é a história evolutiva do *P. falciparum*, que foi completamente modificada após a caracterização e análise de oito novas sequências do parasito de chimpanzés, o *P. reichenowi* (Rich *et al.*, 2009).

Os polimorfismos identificados em *P. simium* localizados na estrutura 3-D de *P. vivax* encontram-se na mesma região do parasito humano, no subdomínio 2 da proteína, onde está localizado o sítio que interage com o antígeno DARC no eritrócito. Apesar dos sítios polimórficos de *P. simium* terem sido encontrados na subunidade 2, assim com os de *P. vivax*, nenhum deles foi encontrado na porção de interação, diferente das mutações já descritas em *P. vivax*, associadas à região de interação com DARC (Souza *et al.*, 2006, 2010). Portanto, uma vacina contra o *P. vivax* onde seria necessário incluir os diferentes haplótipos da PvDBP, parece não precisar da inclusão dos

haplótipos de *P. simium*, já que os polimorfismos descritos não influenciariam na ligação DARC-DBP.

Através do sequenciamento da região II da proteína DBP, foi possível identificar polimorfismos conservados nos parasitos simianos, nunca descritos para a *dbp<sub>II</sub>* de haplótipos de *P. vivax* de diferentes regiões do mundo obtidos a partir de 511 sequências da PvDBP<sub>II</sub>. Na comparação entre as sequências de *P. vivax* e as de *P. simium* a diversidade nucleotídica entre as sequências, foi menor para *P. simium* quando comparada com a de *P. vivax*. Além disso, a análise da diversidade genética entre as sequências de *P. simium*, Sal-1 de *P. vivax* e as sequências de *P. cynomolgi* e *P. knowlesi* demonstrou que existe uma correlação entre a distância genética e a distância evolutiva, ou seja, à medida que distância evolutiva aumenta entre as espécies analisadas, a diversidade genética também aumenta.

Tazi e Ayala (2011) estudaram de maneira aprofundada as relações filogenéticas entre os parasitos humanos geneticamente próximos dos parasitos que infectam primatas neotropicais (*P. simium* e *P. vivax* e entre o *P. brasilianum* e o *P. malariae*). Estes autores utilizaram dois genes nucleares e um gene mitocondrial em suas análises, sendo eles: CSP, 18S e *cytb*. Assim como em nossos resultados, os três genes deste estudo evidenciaram que o *P. simium* é geneticamente semelhante ao *P. vivax*, sendo o nível de polimorfismo encontrado para alguns dos genes estudados exatamente o mesmo descrito para diferentes cepas de *P. vivax*, o que é consistente com uma transferência recente de hospedeiro entre humanos e primatas neotropicais. Através de nossos achados acerca da diversidade genética da DBP<sub>II</sub>, onde a variabilidade de *P. simium* comparada a de *P. vivax* foi menor, é possível concluir que o parasito simiano originou-se do *P. vivax* humano em um processo de transferência lateral de hospedeiros (no sentido homem-macaco), como descrito por outros autores (Liu *et al.*, 2014), devido ao menor acúmulo de mutações em *P. simium*.

Todos os nossos achados contribuem para um conhecimento mais aprofundado acerca da malária simiana no Brasil e reforçam a possibilidade de circulação dos parasitos simianos entre a população humana,

tendo como reservatórios da doença os macacos infectados nessas regiões de resquício de Mata Atlântica do país. Estas evidências epidemiológicas reforçam ainda a necessidade de maiores estudos da malária de Mata Atlântica, bem como uma discussão mais ampla a respeito do controle da doença no país, de forma que inclua este bioma, investigando principalmente a participação dos reservatórios silvestres naturalmente infectados na manutenção dos casos autóctones dessas áreas.

## 7 CONCLUSÕES

- No estado de Santa Catarina foi possível observar infecção malárica em 35% dos animais de vida livre e em 4% dos animais de cativeiro. Nos animais de vida livre do Paraná e Mato Grosso do Sul, não foi possível identificar animais positivos por diferentes métodos de diagnóstico molecular.
- Em todos os estados estudados (SC, PR e MS) foi possível identificar por meio do ELISA, uma reatividade alta para as proteínas recombinantes PvDBP, PvMSP-1<sub>19</sub> e PvAMA-1, sugerindo uma estimulação antigênica nos primatas estudados.
- A análise de microssatélites identificou alelos novos e exclusivos para cada hospedeiro principalmente utilizando-se a PvMSP-1 blocos 02 e 10.
- A interação específica demonstrada no ensaio de citoaderência com amostras de sangue de bugios ruivos sugere que o parasito *P. simium* deve possuir uma proteína ortóloga a PvDBP que interage com receptor DARC, podendo dessa forma, compartilhar a mesma via de invasão no reticulócito do hospedeiro vertebrado que o *P. vivax* em humanos
- Os anticorpos de bugios foram capazes de bloquear a interação PvDBP-DARC, existindo uma correlação positiva entre reatividade no ELISA e a presença de anticorpos bloqueadores.
- Através dos genes DBP, MSP-1 e 18S foi possível identificar uma grande proximidade genética entre o *P. simium* e o *P. vivax*.

- O polimorfismo exclusivo na PsDBP<sub>II</sub> e altamente conservado entre todos os primatas infectados traz perspectivas para o diagnóstico específico por meio de uma sonda espécie específica para este SNP.

## 8 ANEXOS

## 8.1 ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28953-1	Data da Emissão: 06/06/2011 15:34
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Julio Cesar de Souza Junior	CPF: 004.957.679-80
Título do Projeto: BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE PLASMÓDIOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS?	
Nome da Instituição : MUN DE INDAIAL	CNPJ: 83.102.798/0001-00

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita e envio de material biológico	07/2011	07/2011
2	processamento e análise das amostras	08/2011	08/2012
3	publicação dos dados	09/2011	12/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Daniela Camargos Costa	Pesquisadora	063.735.836-86	MG10783684 SSP-MG	Brasileira
2	Vanessa Pecini da Cunha	Pesquisadora	064.945.179-19	4831341 SSPSC-SC	Brasileira
3	Cristiana Ferreira Alves de Brito	Pesquisadora	682.133.796-91	M-3.989.353 SSP-MG	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	INDAIAL	SC	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atelidae

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 22947186**



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28953-1	Data da Emissão: 06/06/2011 15:34
-----------------	-----------------------------------

#### Dados do titular

Nome: Julio Cesar de Souza Junior	CPF: 004.957.679-80
Título do Projeto: BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE PLASMÓDIOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS?	
Nome da Instituição : MUN DE INDAIAL	CNPJ: 83.102.798/0001-00

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
---	--------------------------------	--------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau	
2	CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU-FIOCRUZ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 22947186**



Página 2/3



## 8.2 ANEXO II



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28953-2	Data da Emissão: 30/08/2012 14:02	Data para Revalidação*: 29/09/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Julio Cesar de Souza Junior	CPF: 004.957.679-80
Título do Projeto: BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE PLASMÓDIOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS?	
Nome da Instituição : MUN DE INDAIAL	CNPJ: 83.102.798/0001-00

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita e envio de material biológico	07/2011	07/2011
2	processamento e análise das amostras	08/2011	08/2012
3	publicação dos dados	09/2011	12/2012

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiariam a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Daniela Camargos Costa	Pesquisadora	063.735.836-86	MG10783684 SSP-MG	Brasileira
2	Vanessa Pecini da Cunha	Pesquisadora	064.945.179-19	4831341 SSPSC-SC	Brasileira
3	Cristiana Ferreira Alves de Brito	Pesquisadora	682.133.796-91	M-3.989.353 SSP-MG	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	INDAIAL	SC	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 24459137



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28953-2	Data da Emissão: 30/08/2012 14:02	Data para Revalidação*: 29/09/2013
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

\* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Julio Cesar de Souza Junior	CPF: 004.957.679-80
Título do Projeto: BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE PLASMÓDIOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS?	
Nome da Instituição : MUN DE INDAIAL	CNPJ: 83.102.798/0001-00

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atelidae

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
---	--------------------------------	--------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau	
2	CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 24459137**



Página 2/3



## 8.3 ANEXO III



www.furb.br  
UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU



## ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins, que o projeto de pesquisa independente, intitulado, **“Hemograma e Proteinograma de Bugios Ruivos (*Alouatta clamitans*) em cativeiros,** tendo como Pesquisadora, Profa. Zelinda Maria Braga Hirano, foi protocolado nesta Comissão sob n° **003/12**, e aprovado na reunião de 14/03/12.

Blumenau, 15 de março de 2012.

**Profa. Dra. Alessandra Beirith**  
**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA**

## 8.4 ANEXO IV

## COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 44/2005

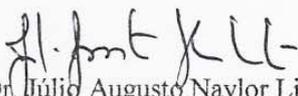
Londrina, 27 de setembro de 2005

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 20 de setembro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Investigação e monitoramento da circulação do vírus da Febre Amarela (FA) e outros arbovírus de interesse visando a criação de um modelo estadual de vigilância epidemiológica**", registrado no CEEA sob o nº 34/05 processo nº 17115/2005, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o aprovado para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa  
Coordenador do CEEA/UEL

**Ilmo. Sr.**  
**Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro**  
**Coordenador do Projeto**  
**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**  
**Centro de Ciências Agrárias**

Cópia para Paulo Sérgio Basoli (Chefe da DCA/PROPPG)

## 8.5 ANEXO V

Haplótipos de diferentes regiões do mundo da Duffy Binding Protein de *P. vivax* utilizados nas análises *in silico* da DBP.

Haplótipos (n <sup>1</sup> )	Código da sequência <sup>2</sup> (n° de acesso)	Regiões das sequências <sup>3</sup>
H1 (59)	AC141 (EU812840.1)	Brasil (1), Siri Lanka (23), Tailândia (2), Índia (33).
H2 (50)	AC248 (EU812841.1)	Brasil (12), Siri Lanka (4), Índia (12), Irã (2), Papua Nova Guiné (20).
H3 (20)	AC250 (EU812842.1)	Brasil (7), Papua Nova Guiné (5), Tailândia (4), Índia (4).
H4 (4)	AC265 (EU812844.1)	Brasil (4).
H5 (20)	AC267 (EU812845.1)	Brasil (10), Colômbia (1), Irã (2), Coreia (4), Coreia do Sul (1), Siri Lanka (1), Tailândia (1).
H6 (17)	AC312 (EU812849.1)	Brasil (7), Colômbia (1), Siri Lanka (1), Tailândia (2), Índia (6).
H7 (6)	AC425 (EU812861.1)	Brasil (4), Siri Lanka (1), Índia (1).
H8 (18)	AP14 (EU812869.1)	Brasil (14), Irã (2), Índia (2).
H9 (39)	AP25 (EU812874.1)	Brasil (15), Siri Lanka (17), Tailândia (1), Índia (5), Irã (1).
H10 (4)	MT11 (EU812898.1)	Brasil (1), Siri Lanka (1), Tailândia (1), Índia (1).
H11 (25)	MT120 (EU812915.1)	Brasil (5), Irã (2), Siri Lanka (10), Tailândia (2), Índia (6).
H12 (7)	PA05 (EU812927.1)	Brasil (3), Papua Nova Guiné (4).
H13 (9)	RO17991 (EU812954.1)	Brasil (1), Siri Lanka (5), Índia (2), Irã (1).
H14 (4)	KOR97-13 (AF220662)	Tailândia (1), Coreia do Sul (3).
H15 (16)	PNGw152; (AF289650)	Papua Nova Guiné (16).
H16 (4)	PNGw168 (AF289649)	Papua Nova Guiné (4).
H17 (10)	SLKASA185 (GU143965)	Siri Lanka (10).
H18 (18)	SLKKTTPV022 (GU143986)	Siri Lanka (7), Índia (11).
H19 (12)	THAI 65 (EF379128)	Índia (2), Tailândia (1), Papua Nova Guiné (9).

1: total de sequências agrupadas neste haplótipo.

2: sequência representativa do haplótipo utilizada nas análises.

3: regiões das sequências agrupadas neste haplótipo.

## 8.6 ANEXO VI

Espécies utilizadas nas análises *in silico* de DARC-1 e seus respectivos números de acesso no GenBank.

<b>Espécie de primata</b>	<b>Número de acesso das sequências</b>
<i>Homo sapiens</i>	H3423
<i>Gorilla gorila</i>	HQ285843.1
<i>Saimiri sciureus</i>	HQ285857.1
<i>Saimiri sciureus</i>	JN544138.2
<i>Saimiri ustus</i>	HQ285856.1
<i>Cebus paella</i>	HQ285855.1
<i>Cercopithecus mitis</i>	HQ285846.1
<i>Mandrillus shinx</i>	HQ285854.1
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	HQ285853.1
<i>Cercobes torquatus</i>	HQ285845.1
<i>Cercocebus galeritus</i>	HQ285844.1
<i>Lophocebus aterrimus</i>	HQ285847.1
<i>Macaca mulata</i>	AF311921.1
<i>Macaca fascicularis</i>	HQ285848.1
<i>Macaca nemestrina</i>	HQ285850.1
<i>Macaca thibetana</i>	HQ285852.1
<i>Macaca nigra</i>	HQ285851.1

## 8.7 ANEXO VII

Espécies utilizadas nas análises *in silico* de DARC-2 e seus respectivos números de acesso no GenBank.

<b>Espécie de primata</b>	<b>Número de acesso das sequências</b>
<i>Homo sapiens</i>	H3423
<i>Gorilla gorila</i>	HQ285843.1
<i>Callithrix sp.:</i>	AF311915.1
<i>Callithrix jacchus isolate 17036</i>	GU219520.1
<i>Saguinus midas isolate 549521</i>	GU219523.1
<i>Saguinus imperator</i>	AF311916.1
<i>Callicebus cupreus</i>	JN544139.2
<i>Saimiri ustus</i>	HQ285856.1
<i>Saimiri sciureus</i>	JN544138.2
<i>Saimiri boliviensis</i>	AF311918.1
<i>Cebus apela</i>	AF311919.1
<i>Pithecia pithecia isolate pr239</i>	GU219527.1
<i>Chiropotes satanas isolate 549519</i>	GU219522.1
<i>Atelles geoffroyi isolate pr133</i>	GU219525.1
<i>Macaca thibetana</i>	HQ285852.1
<i>Macaca mulata</i>	AF311921.1
<i>Mandrillus shinx</i>	HQ285854.1
<i>Macaca fascicularis</i>	HQ285848.1
<i>Cercobes torquatus</i>	HQ285845.1
<i>Macaca nemestrina</i>	HQ285850.1
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	HQ285853.1
<i>Macaca nigra</i>	HQ285851.1
<i>Cercopithecus mono isolate 166</i>	GU219517.1
<i>Cercopithecus mitis</i>	HQ285846.1
<i>Cercopithecus wolffi</i>	JN544124.2

## 8.8 ANEXO VIII

Espécies utilizadas nas análises *in silico* da MSP-1, blocos 2 e 10, *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*, bem como dos 15 haplótipos de *P. vivax* e respectivos números de acesso no GenBank.

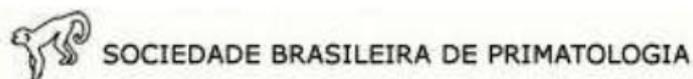
Nome	Quantidade de sequências	Número de acesso das sequências
<i>P. cynomolgi</i>	1	PCYB 073770
<i>P. knowlesi</i>	1	PKH 072850
H1	2	gi 26985113 gb AF435 gi 26985083 gb AF435
H2	1	gi 26985105 gb AF435;
H3	1	gi 26985137 gb AF435
H4	1	gi 26985159 gb AF435
H5	1	gi 26985109 gb AF435
H6	1	gi 26985089 gb AF435
H7	3	gi 26985129 gb AF435 gi 26985123 gb AF435 gi 26985121 gb AF435
H8	1	gi 26985127 gb AF435
H9	1	gi 26985111 gb AF435
H10	19	gi 313848965 dbj AB5 gi 313848963 dbj AB5 gi 313848961 dbj AB5 gi 313848959 dbj AB5 gi 313848945 dbj AB5 gi 313848939 dbj AB5 gi 313848935 dbj AB5 gi 313848931 dbj AB5 gi 313848929 dbj AB5 gi 313848927 dbj AB5 gi 313848925 dbj AB5 gi 313848923 dbj AB5 gi 313848921 dbj AB5 gi 313848919 dbj AB5 gi 313848917 dbj AB5 gi 313848915 dbj AB5 gi 313848911 dbj AB5 gi 313848909 dbj AB5 gi 313848907 dbj AB5
H11	1	gi 26985085 gb AF435
H12	1	gi 307000628 gb HQ17
H13	1	gi 307000626 gb HQ17
H14	1	307000624 gb HQ17
H15	4	gi 307000620 gb HQ17 gi 26985157 gb AF435 gi 26985153 gb AF435 gi 26985151 gb AF435

## 8.9 ANEXO IX

Espécies utilizadas nas análises *in silico* do gene 18S e seus respectivos números de acesso no GenBank.

<b>Nome</b>	<b>Isolados</b>	<b>Número de acesso das sequências</b>
<i>P. falciparum</i>	-	JQ627150.1
<i>P. brasilianum</i>	-	KC906730.1
<i>P. malariae</i>	-	GU815531.1
<i>P. ovale</i>	-	KF018663.1
<i>P. vivax</i>	Isolado D5	HQ283223
	Isolado H15	HQ283225
	Isolado H120	HQ283226
	Isolado SV4	JQ627156
	Isolado SV5	JQ627157
	Isolado SV3:	JQ627155
	Isolado SV2	JQ627154
	Isolado SV6	JQ627158
	Isolado Belém	AY579418

## 8.10 ANEXO X



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o manuscrito “Relato da caracterização molecular de *P. simium*/*P. vivax* em exemplar cativo de bugio-ruivo (*Allouatta clamitans*) em Indaial, Santa Catarina” de autoria de: Daniela C. Costa, Vanessa P. Cunha, Flávia C.F. Araújo, Júlio C. Souza-Junior, Mércia E. Arruda, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho & Cristiana F.A. Brito foi aceito para publicação na forma de capítulo como parte integrante do livro A PRIMATOLOGIA NO BRASIL – Vol. 13, a ser publicado pela Sociedade Brasileira de Primatologia em Recife, em julho de 2013 por ocasião da abertura do XV Congresso Brasileiro de Primatologia.

Curitiba, 16 de dezembro de 2012



---

Dr. Fernando C. Passos  
Dr. João Marcelo Deliberador Miranda  
Editores do livro A Primatologia no Brasil vol. 13

## 8. 11 ANEXO XI

### Carta de Aceite da publicação

**De:** [memorias.artigo@ioc.fiocruz.br](mailto:memorias.artigo@ioc.fiocruz.br)

**Data:** 24/05/2014 09:29:33

**Para:** [cristiana@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cristiana@cpqrr.fiocruz.br)

**Cc:** [memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br)

**Assunto:** MIOC-2013-0578.R1 Accept Submission

24-May-2014

Dear Dr. Brito:

We are pleased to inform you that submission manuscript entitled "Plasmodium simium/P. vivax infections in southern brown howler monkeys from Atlantic Forest" received favorable comments from the Editorial Board of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

The final acceptance of your manuscript depends on its adequacy to the Memorias documents. Please check the following:

Please find attached the Creative Common License and Affidavit forms. The affidavit form must be signed by each author. Authors from different countries or institutions may sign in separate sheets containing the same basic statement (which may be sent by e-mail to [memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br)) The Creative Common License form must be signed and returned by the corresponding author. Please use [memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br) and send by e-mail within 10 days.

Please inform if any of the images have been previous published in a Journal.

If you have a colour photograph (10 cm x 10 cm) that illustrates as aspect of the present manuscript and would like to submit it for consideration to illustrate the cover, please include it when you send the signed forms of this manuscript.

1. TIFF file format
2. 600 dpi
3. Size up to 4Mb

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Ricardo Lourenço de Oliveira

Handling Editor

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

[memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br)

## 8.12 ANEXO XII

Short communication

Running title: *P. simium*/*P. vivax* infected howler monkeys

### ***Plasmodium simium*/*P. vivax* infections in southern brown howler monkeys from Atlantic Forest**

**Daniela Camargos Costa<sup>1</sup>, Vanessa Peccini da Cunha<sup>2</sup>, Gabriela Maria Pereira de Assis<sup>1</sup>, Júlio César de Souza Junior<sup>2,3</sup>, Zelinda Maria Braga Hirano<sup>2,3</sup>, Mércia Eliane de Arruda<sup>4</sup>, Flora Satiko Kano<sup>1</sup>, Luzia Helena Carvalho<sup>1</sup>, Cristiana Ferreira Alves de Brito<sup>1/+</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de malária, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup>FURB, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil

<sup>3</sup>CEPESBI - Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, Indaial, SC, Brazil

<sup>4</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Pernambuco, Recife, PE, Brazil

+ Corresponding author: [cristiana@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cristiana@cpqrr.fiocruz.br)

Cristiana Ferreira Alves de Brito,

Laboratório de Malária,

Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas

Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte/MG, Brazil,

30190 002, Tel.: 55 31 33497772, fax: 55 11 32953115; [cristiana@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cristiana@cpqrr.fiocruz.br)

Blood-infection by the simian parasite, *Plasmodium simium*, was identified in captive (n= 45, 4.4%) and in wild *Alouatta clamitans* monkeys (n= 20, 35%) from the Atlantic forest, Southern Brazil. A single malaria infection was symptomatic and the monkey presents clinical and hematological alterations. High frequency of *P.vivax*-specific antibodies was detected among these monkeys, with 87% of positivity against *P. vivax* antigens. These findings highlight the possibility of malaria as a zoonosis in the remaining Atlantic Forest, and its impact on the epidemiology of the disease.

Key words: Simian Malaria - *Plasmodium simium* - New World monkey.

Sponsorships: CAPES, CNPq, FAPEMIG

*Plasmodium* infections have been identified in New World monkeys caused by *Plasmodium brasilianum* or *Plasmodium simium*. *P. brasilianum* naturally infects several species of monkeys from a large geographical distribution in Latin America and seems to be identical to *P. malariae*, a human malaria parasite (Coatney 1971, Cochrane et al. 1985, Leclerc et al. 2004). In a similar way, *P. simium*, restricted to the Atlantic Forest regions, is indistinguishable from the human parasite *P. vivax* (Collins et al. 1969, Deane 1988). *P. simium* was first identified by Fonseca (1951) in a monkey from São Paulo, Brazil and was described naturally infecting only three species, *Alouatta caraya* (black howler monkey), *Alouatta clamitans* (southern brown howler monkey) and *Brachytelles arachnoides* (woolly spider monkey) (Deane et al. 1966, 1968). Malaria in monkeys has been reported in the remaining Atlantic Forest in Southern and Southeastern Brazil, where autochthonous human malaria cases have been described (Deane 1992, Yamasaki et al. 2011, Wanderley et al. 1994, Curado et al. 1997, 2006, Cerutti et al. 2007). In these regions, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* and *Anopheles (K.) bellator* are incriminated as the local vectors (Deane et al. 1966, Marrelli et al. 2007). In this manuscript, we describe the prevalence of *Plasmodium* infection and levels of antibodies against *P. vivax* antigens among wild and captive monkeys from Atlantic Forest in the South of Brazil (Indaial city, Santa Catarina).

A total of 65 southern brown howler monkeys were studied, 20 wild and 45 captive monkeys from Center for Biological Research (CEPESBI - IBAMA Registration No. 1/42/98/000708-90, Indaial, SC). The wild animals were captured in the Geisler Mountain in Indaial, or attended at veterinary hospital in Blumenau victims of electrical shock or running over. This study was approved by the ethical use of animals in research at the Regional University of Blumenau (protocol no. 28953-1

2011). A preliminary survey identified 4 out of 13 monkeys with suggestive forms of *Plasmodium* (Table and Supplementary data). Molecular diagnosis—using Nested-PCR (Snounou et al. 1993) and Real-time PCR (Mangold et al. 2005) for identification of human species of plasmodia confirmed *P. vivax/P. simium* infection (Figure 1) in 2 (4.4%) captive and 7 (35%) wild monkeys (average 13.8%) (Table). The prevalence for wild *A. clamitans* monkeys is much higher than previously reported for São Paulo state (5.6%, Duarte et al. 2008). In Santa Catarina, infection of *A. clamitans* has been caused by *P. brasilianum* and *P. simium* in almost similar rates, around 10% (Deane et al. 1992). Here, we identified higher prevalence rate of *P. simium* infection, however, none infection by *P. brasilianum* was identified among surveyed monkeys. The identification of *P. malariae* infection by PCR might be hampered by polymorphisms in SSU rRNA gene, leading to underestimate its prevalence (Liu et al. 1998).

One out of 45 captive monkeys (named BL10) with positive microscopy showed suggestive malaria symptoms, including inappetence, weakness, apathy, intermittent muscle tremors, dry and pale mucous membranes, mild dehydration, loss of muscle mass and body weight. This animal showed several hematological and biochemistry alterations, mainly severe thrombocytopenia, anemia and serum uremia (supplementary data). *P. vivax/P. simium* infection was confirmed by PCR-based techniques (Figure S1). This animal was treated with sulphamethoxazole/trimethoprim (23mg/kg).

Since chronic asymptomatic infections, with very low levels of parasitemia, could be present in that area, we evaluated the prevalence of ELISA-detected antibodies against *P. vivax* antigens (PvDBPII, PvMSP-1<sub>19</sub> and PvAMA-1, the last two antigens were kindly provided by Dr. Irene Soares from USP) according to Kano et al. 2010 using anti-IgG of *Macaca mulatta* as secondary antibodies (Sigma-Aldrich). The results confirmed high frequencies (ranging from 64 to 83% for each antigen and 87% for any

antigen) of *P.vivax*-specific antibodies (Figure 2), however, at low levels, which confirmed chronic simian malaria infection in this area. Similar serological results were previously described in monkeys from São Paulo state by using an ELISA with *P.vivax* circumsporozoite peptides (Duarte et al. 2006).

Taken together, our results confirmed high prevalence of simian malaria in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest remaining, suggesting that malaria has the potential to be a public health problem due to closely contact between humans and monkeys in these regions. These findings highlight the possibility of malaria as a zoonosis in specific geographic regions and its might impact the epidemiology of the disease.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank CNPq for scholarships from CFAB and LHC.

#### REFERENCES

- Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab Mdo C, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafrente RS 2007. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J* 6: 33.
- Coatney GR 1971. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg* 20: 795-803.
- Cochrane AH, Barnwell JW, Collins WE, Nussenzweig RS 1985. Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasilianum*. *Infect Immun* 50: 58-61.

- Collins WE, Contacos PG, Guinn EG 1969. Observations on the sporogonic cycle and transmission of *Plasmodium simium* Da Fonseca. *J Parasitol* 55: 814-816.
- Curado I, Dos Santos Malafrente R, de Castro Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA 2006. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop* 100: 54-62.
- Curado I, Duarte AM, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 235-243.
- Deane LM 1988. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 38: 223-230.
- Deane LM 1992. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 1-20.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J 1966. Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull World Health Organ* 35: 805-808.
- Deane M, Neto JF, Sitônio JG 1968. New host of natural *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*: mono, *Brachyteles arachnoides*. *J Inst Med Trop São Paulo* 10: 287-288.
- Duarte AM, Malafrente R dos S, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves Ddo V, de Oliveira SG, Gomes Ade C 2008. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop* 107: 179-285.

- Duarte AM, Porto MA, Curado I, Malafrente RS, Hoffmann EH, de Oliveira SG, da Silva AM, Kloetzel JK, Gomes Ade C 2006. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol* 35: 87-96.
- Fonseca F 1951. *Plasmodium* of a primate of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 49: 543-553.
- Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, Renaud F 2004. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology* 129: 677-684.
- Liu Q, Zhu S, Mizuno S, Kimura M, Liu P, Isomura S, Wang X, Kawamoto F 1998. Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. *J Clin Microbiol* 36: 3378-3381.
- Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LR, Kaul KL 2005. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Rev Microbiol* 43: 2435-2440.
- Marrelli MT, Malafrente RS, Sallum MA, Natal D 2007. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malar J* 6: 127.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jar W, Thaithong S, Brown KN 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain

reaction and detection of the high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 58: 283-292.

Souza jr JC 2007. Perfil sanitário de bugios ruivos, *alouatta guariba clamitans* (cabrera, 1940) (primates: atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de indaial, santa catarina – brasil. Dissertação mestrado, UFSC, Florianópolis, SC.

Wanderley DM, da Silva RA, de Andrade JC 1994. Epidemiological aspects of malaria in the State of São Paulo, Brazil, 1983 to 1992. *Rev Saude Publica* 28: 192-197.

Yamasaki T, Duarte AMRC, Curado I, Summa MEL, Neves DV, Wunderlich G, Malafronte RS 2011. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol* 40: 392-400.

TABLE

Prevalence of *Plasmodium vivax*/*Plasmodium simium* infection in captive and wild*Alouatta clamitans* from Indaial, SC

Origin of samples	Microscopy (n=13) <sup>a</sup>		Nested PCR (n=65)		Real-time PCR (n=65)		Total (n=65)	
	Pos	Neg	Pos <sup>b</sup>	Neg	Pos <sup>b</sup>	Neg	Pos	Neg
Captive (n=45) <sup>a</sup>	01	09	02	43	02	43	02 (4.4%)	43
Wild (n=20) <sup>a</sup>	03	0	07	13	07	13	07 (35%)	13
Total (n=65) <sup>a</sup>	04	09	09	56	09	56	09 (13.8%)	56

<sup>a</sup> The number of samples which have thin blood smears analyzed by microscopy were 13 (10 captive and 03 wild monkeys). <sup>b</sup> Pos – positive samples, all of them for *P. vivax*/*P. simium*. Neg – Negative samples.

## Figures legends

Fig. 1: Real-time (Mangold et al. 2005) results showing dissociation curve of human *Plasmodium* species positive controls, and samples of 4 *P. simium* infected monkeys: wild - BL4, BL5 and captive - BL10 (symptomatic) and BL28.

Fig. 2: Frequencies of IgG antibodies among *Alouatta clamitans* monkeys against *P. vivax* antigens: 19kDa fragment of merozoite surface antigen 1 (MSP-1<sub>19</sub>), domain II of Duffy binding protein (DBPII), and apical membrane antigen 1 (AMA-1). Negative: OD<sub>492nm</sub><cut off; Low responders: cut off < OD<sub>492nm</sub><0.3; High responders: OD<sub>492nm</sub>>0.3. Numbers above the plots indicated the percentage of positive monkeys (low and high responders). Cut-off: mean OD<sub>492nm</sub> of negative controls (monkeys non-exposed to infection) + 3 SDs.

Fig 1.

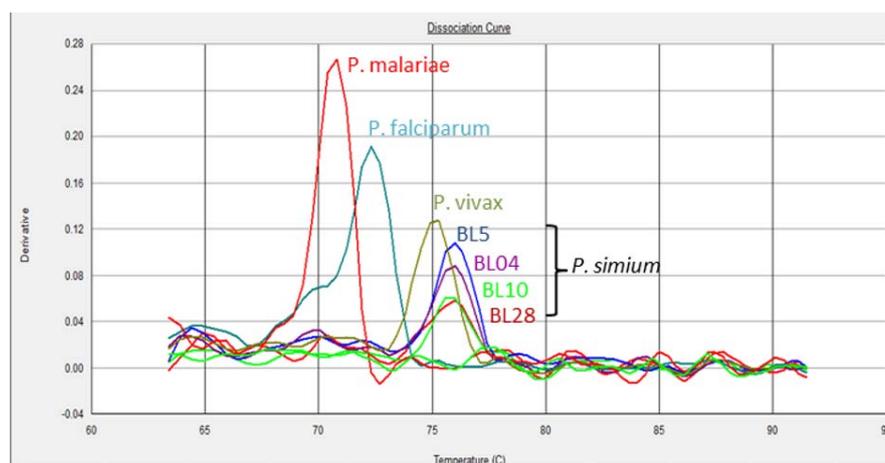
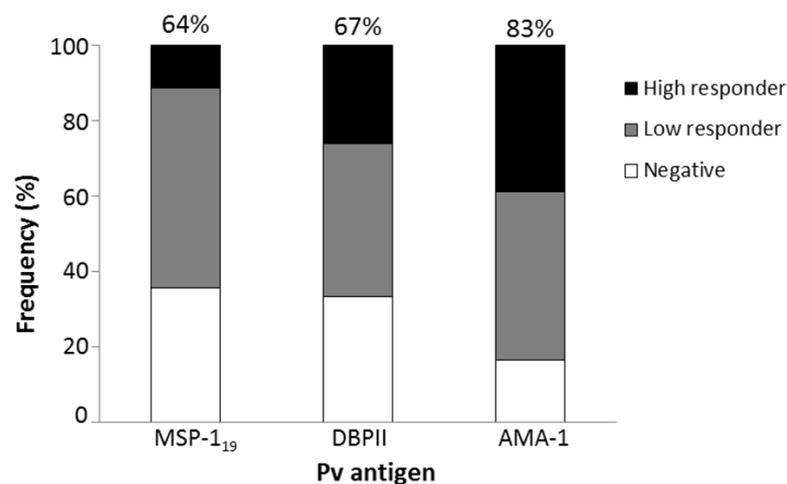


Fig. 2



### 8.13 ANEXO XIII

#### Artigos publicados durante a tese

**COSTA, D. C.;** MADUREIRA, A. P.; AMARAL, L. C.; SANCHEZ, B. A. M.; GOMES, L. T.; FONTES, C. J. F.; LIMONGI, J. E.; BRITO, C.F.A ; CARVALHO, L.H. 2014. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are PCR-based methods? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 109:21-28.

**doi: 10.1590/0074-0276140102.**

LIMONGI, J. E.; **COSTA, D. C.;** CARVALHO, L.H.; LOPES, IS; SILVA, A.A.; FERREIRA, M. S. 2014. *Plasmodium ovale* malaria in Brazil: report of an imported case with a long incubation period. The Journal of Infection in Developing Countries, 8 (4) 554-557.

**doi: 10.3855/jidc.4037.**

**10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adams, J., Hudson, D., Torii, M., Ward, G., Wellems, T., Aiakawa, M., Miller, L. 1990. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 63: 141-153.

Adams, J., Sim, B. K. L., Dolan, S. A., Fang, X. D., Kaslow, D. C. and Miller, L. 1992. A family of erythrocyte binding-proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 7085-7089.

Aiakawa, M., Miller, L.H., Johnson, J., Rabbege, J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocytes and parasite. *J Cell Biol* 77: 72-82.

Alexandre, A.M., Ferreira, C. O., Siqueira, A. M., Magalhães, B. L., Mourão, M. P. G., Iacerda, M. L., Alecrim, M. G. C. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 16 (10):v1611-1614.

Alonso, P. L., Tanner, M. 2013. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature Medicine* 19: 150-155.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Ménard, R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, 12, 220-224.

Arruda, M.E., Nardini, E. H., Nussenzweig, R. S., Cchrane, A. H. 1989. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 4:379-385.

Arruda, M.E., Zimmerman, R.H., Souza, R.M., Oliveira-Ferreira, J., 2007. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 367-371.

Azevedo, A.L. 1997. Aspectos da epidemiologia da malária e da biologia do *Anopheles (Kerteszia) cruzi* Dyar&Knab em vales montanhosos do sistema da mata Atlântica. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

Ayala, S.C, Lee, C. 1970. Saurian malaria: development of sporozoites in two species of phlebotominae sandflies. *Science* 167(3919):891-892.

Barnwell, J.W., Nichols, M.E., Rubenstein, P. 1989. *In vitro* evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med.* 169: 1.795-1.802.

Barnwell, J., Thomas, A. W., Conway, D. J. 1989. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. Prog. Clin. Biol. Res. 313:1-11.

Baum, J., Thomas, A.W., Conway, D.J. 2003. Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Genetics 163(4): 1327-1336.

Branquinho, M.S., Marrelli, M.T., Curado, I., Natal, D., Barata, J.M., Tubaki, R., Carréri-Bruno, G.C., de Menezes, R.T., Kloetzel, J.K., 1997. [Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Juquitiba, São Paulo]. Rev Panam Salud Publica 2, 189-193.

Bronner, U., Divis, P.C., Färnert, A., Singh, B., 2009. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. Malar J 8, 15.

Bértoli, M., Moitinho M. D. 2001. [Malaria in the state of Paraná, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop 34, 43-47.

Carréri-Bruno, G.C., Ciaravolo, R.M., Pereira, M., 1995. [Malaria acquired during entomological research in the Serra do Mar, southeastern region of Brazil]. Rev Saude Publica 29, 142-143.

Cavalli-Sforza, L. L., Menozzi, P. Piazza, A. 1994. The History and Geography of Human Genes. American Publishers Awards: Princeton, New Jersey, USA, in press.

Cavasini, M.T., Ribeiro, W.L., Kawamoto, F., Ferreira, M.U., 2000. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop 33, 489-492.

Center of Disease Control. (2009). Simian Malarian in a USA traveler - New York, 2008. CDC, 58, 229-232.

Ceravolo, I.P., Souza-Silva, F.A., Fontes, C.J.F., Braga, E.M., Madureira, A.P., Krettli, A.U., Souza, J.M., Brito, C.F.A., Adams, J.H., Carvalho, L.H., 2008. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. Scandinavian Journal of Immunology 67, 270-278.

Ceravolo, I., F Souza-Silva, C. F., Braga, E., Madureira, A., Krettli, A., Souza, J., Brito, C., Adams, J., Carvalho, L. 2008. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. Scand J Immunol 67: 270-278.

Ceravolo I. P., Sanchez B. A. M., Sousa T. N., Guerra B. M., Soares I. S., Braga E. M., McHenry A. M., Adams J. H., Brito C. F. A., Carvalho L. H. 2009.

Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(2): 502-510.

Cerutti-Junior, C., Boulos, M., Coutinho, A.F., Hatab, M.C.L.D., Falqueto, A., Rezende, H., Duarte, A.M.R.C., Collins, W., Malafronte, R.S. 2007. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Mal Jour* 6:33 1-12.

Chaudurini, A., Polyakova, J., Zbrzezna, V., Williams, K., Gulati, S., Pogo, A.O. 1993. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (22): 10793-10797.

Chin, W., Contacos, P.G., Coatney, G.R., Kimball, H.R., 1965. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science* 149, 865.

Coatney, G.R., Collins, W.E., Warren, M., Contacos, P.G. CD-ROM. 2003. The primate malarias [original book published 1971] Atlanta (GA):CDC.

Collins, W., Contacos, P., Guinn, E., 1969. Observations on the sporogonic cycle and transmission of *Plasmodium simium* Da Fonseca. *J Parasitol* 55, 814-816.

Collins, W., Warren, M., Contacos, P., Skinner, J., Richardson, B., 1979. Infectivity of *Plasmodium simium* to *Aotus trivirgatus* monkeys and different anophelines. *J Parasitol* 65, 870-874.

Collins, W., Skinner, J., Pappaioanou, M., Broderson, J., Ma, N., Stanfill, P., Filipski, V., 1987. Transmission of *Plasmodium simium* to *Aotus nancymai*, *A. vociferans*, *A. azarae boliviensis*, and *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. *J Parasitol* 73, 653-655.

Collins, W.E., Jeffery, G.M. 2003. A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 366-371.

Collins, W.E., Jeffery, G.M. 2007. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microb Reviews* 20, 579-592.

Cormier, L.A. 2010. *The 10,000 Year Fever: The Historical Ecology of Human and Wild Primate Malarias*; Left Coast Press: Walnut Creek, CA, USA, in press.

Cormier, L.A. 2011. *The ten-thousand year fever: Rethinking human and wild-primate malaria*. Left Coast Press: Walnut Creek, California, USA, in press.

- Cornejo, O.E., Escalante, A.A., 2006. The origin and age of *Plasmodium vivax*. Trends Parasitol 22, 558-563.
- Costa, A.P.C.M., Bressan, C., Pedro, R.S., Valls, R., Daniel-Ribeiro, C.T., Brasil, P. 2009. Malária de mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop, 42:477.
- Costa A. P., Bressan, C. S., Pedro, R. S., Valls-de-Souza, R., Silva, S., Souza, P. R., Guaraldo, L., Ferreira-da-Cruz, M. F., Daniel-Ribeiro, C. T., Brasil, P. 2010. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop, 43 (5): 571-574.
- Curado, I., Dos Santos Malafronte, R., de Castro Duarte, A.M., Kirchgatter, K., Branquinho, M.S., Bianchi Galati, E.A., 2006. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. Acta Trop 100: 54-62.
- Curado, I., Duarte, A.M., Lal, A.A., Oliveira, S.G., Kloetzel, J.K. 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 235-243.
- Das, A., Holloway, B., Collins, W.E., Shama, V.P., Ghosh, S.K., Sinha, S., Hasnain, S.E., Talwar, G.P., Lal, A.A. 1995. Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. Mol Cell Probes, 9: 161-165.
- Deane, L.M., Deane, M.P., Ferreira-Neto, J.A. 1966a. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bull. W.H.O. 35: 805-808.
- Deane, L.M., Ferreira-Neto, J.A. 1969. Encontro do *Plasmodium brasilianum* em macacos do território federal do Amapá, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 11, 199-202.
- Deane, L.M., Ferreira Neto, J.A., Lima, M.M., 1984. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzi* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. Mem Inst Oswaldo Cruz 79, 461-463.
- Deane, L.M. 1988. Malaria studies and control in Brazil. Am J Trop Med Hyg 38 (2): 223-230.
- Deane, L.M., 1992. Simian malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 87 Suppl 3, 1-20.
- de Araujo, F. C., Rezende, A. M., Fontes, C. J., Carvalho, L. H., Brito, C. F. A. 2012. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. Plos One 11: 49871.

Demogines, A., Truong, K.A., Sawyer, S.L. 2012. Species-specific features of DARC, the primate receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Mol Bio Evol* 29(2):445-449.

Duarte, A.M., Malafronte, R.o.S., Cerutti, C., Curado, I., de Paiva, B.R., Maeda, A.Y., Yamasaki, T., Summa, M.E., Neves, D.o.V., de Oliveira, S.G., Gomes, A.e.C., 2008. Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop* 107, 179-185.

Duval, L., Fourment, M., Nerrienet, E., Rousset, D., Sadeuh, S.A., Goodman, S.M., Andriaholinirina, N.V., Randrianarivelojosia, M., Paul, R.E., Robert, V., Ayala, F.J., Ariey, F., 2010. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10561-10566.

Escalante, A.A., Cornejo, O.E., Freeland, D.E., Poe, A.C., Durrego, E., Collins, W.E., Lal, A.A., 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1980-1985.

Eyles, D.E., Coatney, G.R., Getz, M.E. 1960 *Vivax* type parasite of macaques transmissible to man. *Science* 132: 1812-1813.

Fonseca, F. 1951. Plasmódio de primata do Brasil. *Mem. Inst Osw Cruz.* 49: 543-555.

Ferreira Neto JA, Deane LM, Carneiro EW. 1970. Natural infection of monkeys, *Alouatta belzebul belzebul* (L., 1766), with *Plasmodium brazilianum* Gonder and Berenberg-Gossler, 1908, in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 12:161-74.

Furuya, T., Sá, J. M., Chitnis, C. E., Wellems, T. E., Stedmana, T. T. 2014. Reticulocytes from cryopreserved erythroblasts support *Plasmodium vivax* infection in vitro. *Parasit Internat* 63: 278–284.

Gadelha, P., 1994. From "forest malaria" to "bromeliad malaria": a case-study of scientific controversy and malaria control. *Parassitologia* 36, 175-195.

Galinski, M.R., Barnwell, J.W., 2009. Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitol* 25, 200-204.

Garcia L.J., Svoboda, W.K., Chryssafidis, L.S.M., Shiozawa, M.M., Aguiar, L.M., Teixeira, G.M., Ludwig, G., Silva, L.R., Hilts, C., Navarro, I.T. 2005. Sero-epidemiological survey of toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, paraná state, Brazil. *Vet Parasit* 133: 307-311.

Gaur, D., mayer, D.C., Miller, L.H. 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J parasitol* 34: 1.413-1.229.

- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J.C., Alpers, M.P., Müller, I., 2008. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5, e127.
- Golenda, F. C., Li, J., Rosenberg, R. 1997. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6786–6791.
- Gosi, P., Khusmith, S., Khalambaheti, T., Lanar, D., Schaecher, T, Fukuda, M, Miller, S. 2008. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malar J* 7:112.
- Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J., Targett, G.A., 2005. Malaria. *Lancet* 365, 1487-1498.
- Gysin, J. 1998. Animal models: primates. *Malaria: parasite Biology, Pathogenesis and protection.* ed Sherman, I. W. ASM, Press, Washington, DC. p. 419-441.
- Hadley, T.J. 1986. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. *Annu Rev Microbiol.* 40: 451-77.
- Hadley, T., Peiper, S. 1997. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*, 89, 3077-3091.
- Haghi, A. M., Nateghpour, M., Edrissian, G. H., Mohelabi, S. M., Khoramizade, M. R., Shahrabak, S. S. 2012. Sequence Analysis of Different Domains of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen (PvAMA-1 gene) Locus in Iran Iranian. *J Parasitol* 7: 26-31.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hawkes, M., Kain, K.C., 2007. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5, 485-495.
- Hemmer, C.J., Holst, F.G., Kern, P., Chiwakata, C.B., Dietrich, M., Reisinger, E.C., 2006. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 11, 817-823.
- Hirano, Z.M.B. 2004. Secreção epidérmica de *Alouatta guariba clamitans*. Tese de doutorado em Biologia Comparada - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Howell, D., Samudrala, R. and Smith, J. 2006. Disguising itself--insights into *Plasmodium falciparum* binding and immune evasion from the DBL crystal structure. *Mol Biochem Parasitol* 148: 1-9.

Huang, X. 1992. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* 14: 18-25.

Iwamoto, S. Li, J. Omi, T., Ikemoto, S., Kajii, E. 1996. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood*. 87 (1): 378-385.

Jongwutiwes, S., Buppan, P., Kosuvin, R., Seethamchai, S., Pattanawong, U., Sirichaisinthop, J., Putaporntip, C., 2011. *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17, 1799-1806.

Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523-526.

Kocher, T.D., Meyer, T.A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, X., Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS* 86: 6196-6200.

Koepfli, C., Mueller, M.J., Goroti, M., Sie, A., Genton, B., Beck, H.P., Felger, I. 2009. evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *J Infect Dis*. 199: 1074-80.

Krief, S., Escalante, A.A., Pacheco, M.A., Mugisha, L., André, C., Halbwax, M., Fischer, A., Krief, J.M., Kasenene, J.M., Crandfield, M., Cornejo, O.E., Chavatte, J.M., Lin, C., Letourneur, F., Grüner, A.C., McCutchan, T.F., Rénia, L., Snounou, G., 2010. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS Pathog* 6, e1000765.

Krotoski, W.A. 1985. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79, 1-11.

Lacerda M.V. 2007. Clinical manifestations and pathogenesis of the thrombocytopenia in malaria Brasilia: Universidade de Brasilia.

Langhi DM Jr, Bordin JO. 2006. Duffy blood group and malaria. *Hematology*. 11(5):389-398.

Leclerc, M., Hugot, J., Durand, P., Renaud, F., 2004. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology* 129, 677-684.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

- Lim, C., Tazi, L., Ayala, F., 2005. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 15523-15528.
- Liu, Q., Zhu, S., Mizuno, S., Kimura, M., Liu, P., Isomura, S., Wang, X., Kawamoto, F. 1998. Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. J Clin Microbiol, 36: 3378-3381.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F., Ndjango, J.B., Sanz, C.M., Morgan, D.B., Locatelli, S., Gonder, M.K., Krzuszus, P.J., Walsh, P.D., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A.V., Muller, M.N., Shaw, G.M., Peeters, M., Sharp, P.M., Rayner, J.C., Hahn, B.H., 2010. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. Nature 467, 420-425.
- Liu, W., Li, Y., Shaw, K.S., Learn, G.H., Plenderleith, L.J., Malenke, J.A., Sundararaman, S.A., Ramirez, M.A., Crystal, P.A., Smith, A.G., Bibollet-Ruche, F., Ayouba, A., Locatelli, S., Esteban, A., Mouacha, F., Guichet, E., Butel, C., Ahuka-Mundeye, S., Inogwabini, B.I., Ndjango, J.B., Speede, S., Sanz, C.M., Morgan, D.B., Gonder, M.K., Krzuszus, P.J., Walsh, P.D., Georgiev, A.V., Muller, M.N., Piel, A.K., Stewart, F.A., Wilson, M.L., Pusey, A.E., Cui, L., Wang, Z., Färnert, A., Sutherland, C.J., Nolder, D., Hart, J.A., Hart, T.B., Bertolani, P., Gillis, A., Lebreton, M., Tafon, B., Kiyang, J., Djoko, C.F., Schneider, B.S., Wolfe, N.D., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Carter, R., Culleton, R.L., Shaw, G.M., Rayner, J.C., Peeters, M., Hahn, B.H., Sharp, P.M. 2014. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nat Commun 21(5): 3346-3356.
- Lourenço-de-Oliveira, R., Deane, L. M. 1995. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I - The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. Mem Inst Osw Cruz 90(3) 331-339.
- Luchavez, J., Espino, F., Curameng, P., Espina, R., Bell, D., Chiodini, P., Nolder, D., Sutherland, C., Lee, K.S., Singh, B., 2008. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. Emerg Infect Dis 14, 811-813.
- Machado, R. L. D., Couto, A. A. R. D., Cavasini, C. E., Calvosa, V. S. P. 2003. Malária em região extra-Amazônica: situação no estado de Santa Catarina. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 36(5), 581-586.
- Malaria/SVS/MS: Malária in "Doenças de A a Z". 2009  
[[http://portalsaude.gov.br/portal/saude/profissional/areacfm?id\\_area=1526](http://portalsaude.gov.br/portal/saude/profissional/areacfm?id_area=1526)].  
SVS/Ministério da Saúde
- Mali, S., Steele, S., Slutsker, L., Arguin, P.M., (CDC), C.f.D.C.a.P., 2010. Malaria surveillance - United States, 2008. MMWR Surveill Summ 59, 1-15.
- Mangold, K.A., Manson, R.U., Koay, E.S.C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R.B., Peterson, L.R., Kaul, K.L., 2005. Real-time PCR for detection

and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2435-2440.

Marques, G.R.A.M, Condino, M.L.F., Serra, L.L.N., Cursino, T.V.M. 2008. Aspectos epidemiológicos da malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, estado de São Paulo, 1985-2006. *Ver Soc Bras Med Trop* 41, 386-389.

Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J., 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol* 47, 261-273.

McGhee, R.B. 1953. The infection by *Plasmodium lophurae* of duck erythrocytes in the chicken embryo. *J Exp Med* 97(6): 773-782.

McHenry, A.M., Barnwell, J. W., Adams, J.H. 2010. *Plasmodium vivax* DBP binding to *Aotus nancymae* erythrocytes is Duffy antigen dependent. *J Parasitol* 96: 225-227.

Meis, J. F., Wismans, P. G., Jap, P. H., Lensen, A. H., Ponnudurai, T. 1992. A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Trop* 3: 227-236.

Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinnis MH, Rothman. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 189:561.

Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F., McGinnis, M.H. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy blood group genotype FyFy. *N Engl J Med* 295: 302-304.

Miller, L.H., McAuliffe, F.M., Mason, S.J. 1977. Erythrocyte receptor of malaria merozoites. *Am J Trop Med Hyg* 26: 204-208

Miller, L.H., Mason, S.J., Clyde, D.F.. 1979. Interaction between cytochalasin B-treated malaria parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med* 149: 172-184

Miller, L.H., Hudson, D., Haynes, J.D. 1988. Identification of *Plasmodium knowlesi* erythrocyte binding proteins. *Mol Biochem Parasitol* 31(3): 217-22.

Ministério da Saúde. 2009. Boletim sobre Malária. Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão.

Ministério da Saúde. 2006. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão.

Ministério da Saúde. 2013. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2000 a 2011. Boletim Epidemiológico. vol 44 n 1 Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.

Mota, M., Pradel, G., Vanderberg, J., Hafalla, J., Frevert, U., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V. and Rodríguez, A. 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291, 141-144.

Mota, M., Hafalla, J., Rodriguez, A. 2002. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*, 8, 1318-1322.

Mota, M. M., & Rodriguez, A. 2004. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cellular Microbiology*, 12, 1113-1118.

Moyes, C. L., Henry, A. J. Golding, N., Huang, Z., Singh, B. Baird, J.K., Newton, P. N., Huffman, M. Duda, K.A., Drakeley, C. J., Elyazar, I.R.F., Anstey, N.M., Chen. Q., Zommers, Z., Bhatt, S., Gething, P. W., Hay, S.I., Defining the Geographical Range of the *Plasmodium knowlesi* Reservoir. *Plos Neglect Trp Dis*, 8 (3), 1-13.

Mueller, I., Galinski, M.R., Baird, J.K., Carlton, J.M., Kochar, D.K., Alonso, P.L., del Portillo, H.A. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.*, 9 (9): 555-566.

Mu, J., Joy, D.A., Duan, J., Huang, Y., Carlton, J., Walker, J., Barnwell, J., Beerli, P., Charleston, M.A., Pybus, O.G., Su, X.Z., 2005. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol* 22, 1686-1693.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, New York.

Neote, K., Mak, J.Y., Kolakowski, L. F., Schall, T. J. 1994. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84 (1): 44-52.

Netto, R. C. M., Fabbri, C., Freitas, M. V., Neto, M. B., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V. G., Lima, E. S., Penha-Silva, N. 2014. Influence of *Plasmodium vivax* malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res* 113: 863–874.

Neves, A., Urbinati, P.R., Malafronte, R.S., Fernandes, A., Paganini, W.S., Natal, D. malaria outside the Amazon region: Natural *Plasmodium* infection in

anophelines collected near and indigenous village in the Vale do Rio Branco, Intanhaém, SP. 2012. *Acta Tropica* 2952:1-5.

Nishimoto *et al.*, 2008 Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*.

Ng, O.T., Ooi, E.E., Lee, C.C., Lee, P.J., Ng, L.C., Pei, S.W., Tu, T.M., Loh, J.P., Leo, Y.S., 2008. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis* 14, 814-816.

Ntumngia, F.B., McHenry A.M., Barnwell J.W., Cole-Tobian, J., King, C.L., Adams, J.H. 2009. Genetic variation among *Plasmodium vivax* isolates adapted to non-human primates and the implication for vaccine development. *Am J Trop Med Hyg* 80:218-227.

Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M.V., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauil, P.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9, 115.

Ollomo, B., Durand, P., Prugnolle, F., Douzery, E., Arnathau, C., Nkoghe, D., Leroy, E., Renaud, F., 2009. A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathog* 5, e1000446.

Olsson, M. L. 1998. The Fy (x) phenotype is associated with missense mutation in the Fy (b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol* 103 (4): 1184-1191.

Patil, A., Orjuela-Sánchez, P., da Silva-Nunes, M., Ferreira, M.U. 2010. Evolutionary dynamics of the immunodominant repeats of the *Plasmodium vivax* malaria-vaccine candidate circumsporozoite protein (CSP). *Infect Genet Evol* 10: 298-303.

Pittendrigh, C. S. 1948. The Bromeliad-Anopheles-Malaria Complex in Trinidad. I-The Bromeliad Flora. *Evol* 2: 58-89.

Plewes, K., Royakkers, A. A., Hanson, J., Hasan. M. M. U., Alam, S., Ghose, A., Maude, R. J., Stassen, P. M., Charunwatthana, P., Lee, S. J., Turner, G. D. H., Dondorp, A. M., Schultz, M. J. 2014. Correlation of biomarkers for parasite burden and immune activation with acute kidney injury in severe falciparum malaria. *Mal Jour* 13 (91) 1-10.

Pogo, A. O., Chaudhuri, A. 2000. The Duffy protein: a malaria and chemokine receptor. *Semin Hematol*. 37(2): 122-129.

Portes, M.a.G., Rossi, J.C., Nascimento, J.C., Zeccer, S., Silva, L.A., 2010. Anophelines of Santa Catarina (Diptera: culicidae), Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43, 156-160.

Phoas, C., Alecrim W.D., Alecrim M.G.C., Lacerda M.V.G. 2006. Malaria and sickle cell anemia: report of complications and clinical management of three patients in a highly endemic area for *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Case Rep Clin Pract Rev*, 7:220-223.

Prugnolle, F., Durand, P., Neel, C., Ollomo, B., Ayala, F.J., Arnathau, C., Etienne, L., Mpoudi-Ngole, E., Nkoghe, D., Leroy, E., Delaporte, E., Peeters, M., Renaud, F., 2010. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1458-1463.

Rezende, A.M., Tarazona-Santos, E., Fontes, C.J., Souza, J.M., Couto, A.D., Carvalho, L.H., Brito, C.F., 2010. Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health* 15, 718-726.

Rich, S.M., Leendertz, F.H., Xu, G., LeBreton, M., Djoko, C.F., Aminake, M.N., Takang, E.E., Dikko, J.L., Pike, B.L., Rosenthal, B.M., Formenty, P., Boesch, C., Ayala, F.J., Wolfe, N.D., 2009. The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14902-14907.

Rodriguez-Morales, A.J., Ferrer, M.V., Barrera, M.A., Pacheco, M., Daza, V., Franco-Paredes, C., 2009. Imported cases of malaria admitted to two hospitals of Margarita Island, Venezuela, 1998-2005. *Travel Med Infect Dis.* 7: 44-48.

Sachs J., Malaney P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 415: 680-685.

Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Singh, S., Hora, R., Belrhali, H., Chitnis, C. and Sharma, A. 2006. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*, 439: 741-744.

Sinnis, P. & Zavala, F. (2008). The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future Microbiol*, 3, 275-278.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). 2014. [acessado em 24/01/2014]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/malaria/bases/malabrnet.def>.

Sistema Integrado de Gestão Ambiental (SIGAM), 2009. Atlas dos Remanescentes Florestais de Mata Atlântica. Sistema Ambiental Paulista. Governo de São Paulo. [acessado em 24/01/2014]. Disponível em: [http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/Repositorio/222/Documentos/EPBio/EPBio\\_20\\_Flavio.pdf](http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/Repositorio/222/Documentos/EPBio/EPBio_20_Flavio.pdf)

Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the

polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 58:283-92.

Souza, T. N., Tarazona-Santos, E. M., Wilson, D. J., Madureira, A. P., Kuser, P. R., Fontes, C. J. F., Gil, L. H. S., Ferreira, M. U., Carvalho, L. H., Brito, C. F. A. 2010. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Mal J* 9: 334.

Souza-Silva, F. A., Silva-Nunes, M., Sanchez, B. A. M., Ceravolo, I.P., Malafronte, R. S., Brito, C. F. A., Ferreira, M. U., Carvalho, L. H. 2010. Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(2): 185–193.

Souza-Silva, F. A., Torres, L. M., Santos-Alves, J. R., Tang, M. L., Sanchez, B. A. M., Souza, T. N., Fontes, C. J., Nogueira, P. A., Rocha, R.S., Brito, C. F. A., Ferreira, M. U., Adams, J. H., Kano, F. S., Carvalho, L. H. 2014. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *Plos One* 9: 1-10.

Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C. Regen, T., Retzlaff, S., Rennernberg, A, Krueger, A. Pollok, J. M., Menard, R. Heussler, V. T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313: 1287-90.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.

Taui P, Daniel-Ribeiro C. 1998. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. *Res Rev Parasitol*, 58:163-167.

Tazi, L., Ayala, F., 2011. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol.*

Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680.

Tournamille, C., Blacher, A., Le Van, K.C., Gane, P., Apoil, P.A., Nakamoto, W., Cartron, J.P., Colin, Y. 2004. Sequence, evolution and ligand binding properties of mammalian Duffy antigen/receptor for chemokines. *Immunogenetics* 55:682-694.

- Ueno, H. M., Foratinni, O. P., Kakitani, I. 2007. Distribuição vertical e sazonal de *Anopheles* (Kerteszia) em Ilha Comprida, SP. *Rev Saúde Pública* 41(2): 269-275.
- Van den Eede, P., Van, H.N., Van Overmeir, C., Vythilingam, I., Duc, T.N., Hung, I.X., Manh, H.N., Anné, J., D'Alessandro, U., Erhart, A., 2009. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J* 8, 249.
- VanBuskirk K.M., Cole-Tobian, J.L., Baisor, M., Sevova, E.S., Bockaire, M., King, C.L., Adams, J.H. 2004 Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis* 190: 556-562.
- Vythilingam, I., Noorazian, Y.M., Huat, T.C., Jiram, A.I., Yusri, Y.M., Azahari, A.H., Norparina, I., Noorain, A., Lokmanhakim, S., 2008. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasit Vectors* 1, 26.
- Wanderley, D.M., da Silva, R.A., de Andrade, J.C., 1994. [Epidemiological aspects of malaria in the State of São Paulo, Brazil, 1983 to 1992]. *Rev Saude Publica* 28, 192-197.
- Waters, A.P., Higgins, D.G., McCutchan, T.F. 1993. Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Mol Biol Evol* 10, 914-923.
- White, N.J., 2008. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 46, 172-173.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., Dondorp, A.M. 2013. Malaria. *The Lancet* 6736 (13):1-10.
- WHO: Guidelines for the Treatment of Malaria. Geneva: World Health Organization; 2010  
[<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/>]
- WHO. World malaria Report 2011. Geneva, World Health Organization, 2011.
- Wijeyesakere, S., Richardson, R., Stuckey, J. 2007. Modeling the tertiary structure of the patatin domain of neuropathy target esterase. *Protein J* 26: 165-172.
- Yamasaki, T., Duarte, A.M., Curado, I., Summa, M.E., Neves, D.V., Wunderlich, G., Malafronte, R.S., 2011. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol* 40, 392-400.
- Yamauchi, L., Coppi, A., Snounou, G., Sinnis, P. (2007). *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 9, 1215-1222.

Zimmerman, P., Woolley, I., Masinde, G., Miller, S., McNamara, D., Hazlett, F., Mgone, C., Alpers, M., Genton, B., Boatman, B., Kazura, J. 1999. Emergence of FY\*A (null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 13973-13977

Zhu, H.M., Li, J., Zheng, H., 2006. Human natural infection of Plasmodium knowlesi. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 24, 70-71.