



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA  
NÚCLEO DE SAÚDE - DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO E DOUTORADO EM  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**MAISA DA SILVA ARAÚJO**

**Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no  
Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira**

**Porto Velho**

**2013**

**MAISA DA SILVA ARAÚJO**

**Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no  
Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Experimental do Departamento de  
Medicina da Fundação Universidade Federal de  
Rondônia, como requisito parcial par obtenção do  
título de Doutor em Biologia Experimental.

Área de concentração: Malária

Orientador: Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

Coorientador: Dr. Luiz Shozo Ozaki

Porto Velho  
2013

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA CENTRAL PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Araújo, Maisa da Silva.

A663e

Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. / Maisa da Silva Araújo. Porto Velho, Rondônia, 2013.

66 f.: il.

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva.

1. Primatas não Humanos. 2. Rondônia. 3. *Plasmodium Brazilianum*. 4. *Plasmodium Falciparum*. I. Título.

CDU: 616.936(811.1)

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11-549

## **MAISA DA SILVA ARAÚJO**

### **Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Departamento de Medicina da Fundação Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental, em sessão pública realizada no dia 07 de Março de 2013.

#### **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva**

Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia  
Orientador

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antoniana Ursine Krettli**

Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisa René Rachou - CpRR  
Belo Horizonte - MG

**Prof. Dr. Luiz Shozo Ozaki**

Virginia Commonwealth University - VCU  
Richmond - USA

**Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo**

Universidade Federal de Rondônia - UNIR  
Porto Velho – RO

**Dr. Mauro Shugiro Tada**

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia - CEPEM  
Porto Velho – RO

Julgamento: Aprovada

Local de defesa: Auditório do PGBIOEX

*“Deixem-me que lhes conte o segredo que me ajudou  
a atingir os meus objetivos. Minha força reside  
apenas na minha tenacidade.”*

Louis Pasteur

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de salientar que sou agradecida a muitas pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, deixando clara a inegável importância de cada um daqueles aqui citados e me desculpando previamente aqueles que por ventura, não sejam citados abaixo. Desta forma, registro meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu equilíbrio para superar os momentos difíceis e força para seguir adiante.

Aos meus pais Maria Auxiliadora da Silva Araújo e Ivan de Souza Araújo, os responsáveis por eu ter chegado até aqui. Por todo esforço, amor e apoio imensuráveis e a toda minha família pela compreensão várias vezes demonstrada de que realizar uma tese de doutorado requer privação do convívio familiar de dias, semanas, meses e de anos. Esse apoio foi fundamental para que eu, muitas vezes, renovasse as minhas forças para cumprimento do que me propus.

Ao meu namorado, Guilherme, que sempre esteve ao meu lado desde o início desde doutorado, “praticamente”, onde tivemos a oportunidade de nos conhecermos. O apoio dado por ele foi, e é, muito importante para finalização desta etapa de minha vida. Agradeço também sua mãe, Dona Márcia e família, pelas orações, apoio e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Hildebrando, quero agradecer principalmente por toda a paciência direcionada a mim e pelos ensinamentos que me fizeram crescer não somente como profissional, mas também como pessoa, além do privilégio de ser sua aluna. Sua dedicação ao trabalho e à ciência são exemplos de um grande profissional.

Ao meu coorientador e idealizador deste projeto Dr. Luiz Shozo Ozaki pelo apoio, ensinamento, discussões, críticas e sugestões que me fizeram crescer e ver a ciência com olhar diferenciado.

Ao Laboratório de Entomologia, onde desenvolvi grande parte do projeto, em especial aos responsáveis pelo laboratório, Msc. Luiz Herman e Dr. Alexandre de Almeida, além de todos os integrantes que estavam sempre dispostos a me ajudar.

À Dra Joana D’Arc Neves e toda sua equipe, por ter me recebido no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Malária, no início da parte prática e no decorrer do projeto.

À Dra Mariluce Rezende, pelo apoio, ensinamento e pelas amostras de primatas não humanos cedidas ao nosso projeto, de fundamental importância para a realização desse trabalho.

Á equipe de campo, Hélio, Ribamar, Jayro, Elisângela, Daniel, Thaís, Elis, Dionatan, aos alunos da Malu e aos motoristas da instituição. Agradeço a todos pela grande ajuda, alegrias (grandes risadas e histórias inesquecíveis) e conhecimentos que nunca esquecerei. Adorei trabalhar com todos vocês.

Á equipe do Laboratório de Epidemiologia sob a responsabilidade do Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa pelo treinamento para a confecção das lâminas das amostras de primatas não humanos, além do diagnóstico das mesmas, realizado pela sua equipe, em especial ao Alzemar e pelas amostras de humanos cedidas ao nosso trabalho.

Á pessoas como Aline Rodrigues, que me ajudou na produção do mapa da área de estudo, ao Dr. Fernando Zanchi, que me ajudou nas análises de bioinformativa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

Á Energia Sustentável do Brasil e Santo Antônio Energia pelo a liberação e apoio nas coletas de amostra dos animais resgatados na área de impacto da construção das Usinas Hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio.

Ás minhas grandes amigas do laboratório, Elizângela, Thais, Prícila e Jéssica, que sempre estiveram ao meu lado torcendo pelo sucesso desse trabalho.

Aos funcionários do IPEPATRO/FIOCRUZ- RO e CEPEM pela grande ajuda em todos os setores as quais são responsáveis, em especial a Rosi, Aline e Marlene.

Á coordenação do curso de pós-graduação e aos professores pelo ensinamento e contribuição para o meu crescimento profissional bem como pela construção de um bom ambiente de trabalho.

Ao Instituto Pasteur, por proporcionar a oportunidade de estágio no Centro de Produção e Infecção de *Anopheles*, onde fui muito bem recebida pela responsável do Laboratório Dra Catherine Bourgouin e toda sua equipe.

Em especial, agradeço aos animais desse estudo. A finalidade maior desse trabalho é que tudo o que for aprendido se reverta em benefícios para resolução do problema da malária.

Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desta tese.

## RESUMO

Em estudos anteriores sobre a malária em primatas não humanos, nativos de florestas do continente Americano, estão registradas apenas duas espécies de plasmódios, *Plasmodium brasilianum* e *P. simium*, parasitas semelhantes aos da malária humana, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente. Estes parasitas infectam naturalmente primatas da família *Cebidae* e *Atelidae*. O *P. brasilianum* foi observado em ampla distribuição geográfica e parasitando um grande número de espécies de primatas, ao contrário do *P. simium*, restrito a três espécies nas áreas do Sul e Sudeste da Mata Atlântica do Brasil. Todavia, é possível que essa distribuição reflita uma subestimação, pois esses dados foram baseados, em sua maioria, em análises microscópicas e penalizadas pelas dificuldades em obter amostras, limitando-as a um pequeno número de animais. A introdução, no presente trabalho, de metodologias moleculares em adição à microscopia para a detecção e identificação dos parasitas da malária, permite abordar o problema das relações entre malária de primatas não humanos e malária humana, uma vez que interpretações conflitantes sobre a origem humana das malárias de primatas não humanos no continente Americano ou, ao contrário, origem simiana da malária humana, tem sido proposta por diferentes autores. Peculiaridades da região de Rondônia, com áreas florestais de instabilidade devido à intensa intervenção ambiental de origem humana favorecendo o contato entre o homem e animais da floresta, permitiu um estudo preliminar da prevalência da malária de primatas não humanos e sua possível relação com a malária humana local. Foram coletadas 184 amostras de sangue de primatas não humanos e analisadas utilizando-se microscopia e técnicas moleculares. As amostras estudadas foram de animais silvestres e de cativeiro. Os animais silvestres foram de duas origens: (i) áreas de instabilidade ecológica (local de construção de hidrelétricas, extração de madeira, etc) e (ii) áreas atualmente estáveis (antigas áreas de mineração e extração de borracha, atividade agrícola estável, etc.). De forma geral, a frequência de infecções por *Plasmodium* foi de 10,3% (19/184), sendo maior em animais selvagens (12,6%) do que em animais de cativeiro (4,1%). A maioria das infecções observadas nos animais de diferentes espécies foi por *P. brasilianum* (18/19). Nenhum caso de infecção por *P. simium* foi detectado. No entanto, foram observados 3 casos de infecção por *P. falciparum*, estes em animais silvestres e de cativeiro (1,6%), sendo 2 dos casos infecções mistas com *P. brasilianum*. Todas as amostras positivas foram de animais pertencentes às famílias *Cebidae*, *Atelidae*, *Pitheciidae* e um dos casos de infecção por *P. brasilianum* inclui pela primeira vez a família *Aotidae*. A prevalência de *P. brasilianum* em primatas não humanos capturados em área próxima a habitações humanas, bem como casos de *P. malariae* na população humana local e casos positivos de *P. falciparum* em primatas não humanos constituem evidências adicionais da possível interrelação entre malária humana e de primatas não humanos e que estes podem eventualmente constituir em reservatório natural para a malária humana, o que implicaria em futuras ações de controle da doença na região.

**Palavras-chave:** Primatas não humanos. Rondônia. *Plasmodium brasilianum*. *Plasmodium falciparum*.

## ABSTRACT

In previous studies of malaria in non-human primates dwellers of forests of the American continent, only two species of *Plasmodium* parasites have been identified, *Plasmodium brasilianum* and *P. simium* which are similar to those that infect humans, *P. malariae* and *P. vivax*, respectively. These parasites are found naturally infecting primates of the *Cebidae* and *Atelidae* families. *P. brasilianum* has been observed infecting a large number of primate species widely distributed geographically, while *P. simium* has been observed in only three non-human primates species in the southern and southeastern areas of the Brazilian Atlantic Forest. The distribution of parasite and host species might however be underestimated as the recorded data are mostly based on microscopic investigations on a relatively small number of animals. The use of molecular techniques, in addition to microscopy for the detection and identification of malarial parasites, helps clarify the existing issues between monkey and human malaria, in view of the conflicting interpretations that have been proposed by different authors on the origin of human malaria parasites in monkeys or conversely, on monkey malaria parasites in humans, in the American continent. The peculiarities of the Rondonia region, with forests in environmentally unstable areas due to human intervention leading to close encounters of humans and wild animals allowed a preliminary study of the prevalence of monkey malaria and its possible relationship with the local human malaria. One hundred eighty-four blood samples of non-human primate were collected and analyzed by microscopy and molecular techniques. The samples examined were from wild and captive animals. The wild animals were from two sources: (i) areas with environmental instability (hydroelectric dam construction, wood extraction areas, etc.) and (ii) stable areas (former mining and rubber extraction areas, stable agricultural activities, etc.). In general, the frequency of infections by *Plasmodium* was 10.3% (19/184), being more significant in wild (12.6%) than in captive animals (4.1%). Infection by *P. brasilianum* was the most common in all species of monkeys examined (18/19). No case of infection by *P. simium* was observed. However, some cases of infection by *P. falciparum* were observed in wild and captive animals, 1.6%, two of them as mixed infections of *P. falciparum* and *P. brasilianum*. All positive samples were from animals of the *Cebidae*, *Atelidae* and *Pitheciidae* families and one case was observed for the first time in one monkey of the *Aotidae* family. The prevalence of *P. brasilianum* in monkeys caught near human inhabited areas, as well as cases of *P. malariae* in the local human population, and positive cases of *P. falciparum* in non-human primates provide further evidence of the possible interrelation between human and non-human primates malarias, the latter being thus potentially a natural reservoir of human malaria, requiring additional control measures for this disease in the region.

**Keywords:** Non-human primate. Rondônia. *Plasmodium brasilianum*. *Plasmodium falciparum*.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico das espécies de <i>Plasmodium</i> . Fonte: Greenwood et al., 2008.....	2
Figura 2 -	Distribuição mundial da malária humana. Fonte: WHO, 2011.....	3
Figura 3 -	Distribuição dos casos confirmados de malária no Brasil (por 1.000 habitantes). Fonte: WHO, 2012 .....	4
Figura 4 -	<i>Cacajao calvus</i> (uacari-branco) da Amazônia Brasileira. Fonte: <a href="http://www.scientificlib.com">http://www.scientificlib.com</a> .....	10
Figura 5 -	Espécies de primatas não humanos susceptíveis naturalmente ao <i>P. simium</i> . Fonte: wikipedia.org .....	11
Figura 6 -	Infecção por <i>Plasmodium</i> de primatas não humanos no Brasil. Fonte dos dados: DEANE, 1992 .....	12
Figura 7 -	Modelo de transmissão de <i>P. knowlesi</i> em humanos. Fonte: YAKOB et al., 2010.....	15
Figura 8 -	Mapa de Rondônia, norte do Brasil, mostrando as localidades incluídas no estudo. Regiões hachuradas em cinza escuro representam os municípios contidos em áreas florestais de instabilidade ecológica, e as regiões hachuradas em cinza claro em áreas florestais atualmente estáveis. Os números representam as localidades onde foram realizadas coletas de sangue de primatas não humanos .....	19
Figura 9 -	Posição do <i>primer</i> do gênero e dos <i>primers</i> específicos em relação ao gene 18S rRNA de <i>P. vivax</i> (GenBank #PVU93234) .....	24
Figura 10 -	Distribuição percentual do número de amostras obtidas de animais mantidos em cativeiro e selvagens.....	26
Figura 11 -	Número de primatas não humanos analisados com as respectivas espécies infectadas. Numeração a cima das barras indica o número de animal infectado por <i>Plasmodium</i> .....	27
Figura 12 -	Formas de <i>P. brasilianum</i> em lâmina de esfregaço de <i>Lagothrix cana cana</i> (macaco-barrigudo). Coloração panótica rápida, utilizando o princípio de coloração de Romanowski. (A) Trofozoíto; (B) Esquizonte; (C) Gametócito imaturo. Morfologicamente, as formas apresentadas são semelhantes a formas de <i>P. vivax</i> .....	28
Figura 13 -	Lâmina fresca do estômago de <i>An. darlingi</i> alimentado em <i>Lagothrix cana cana</i> infectado com oocisto de <i>P. brasilianum</i> .....	30
Figura 14 -	Detecção de infecção por <i>P. brasilianum</i> e infecção mista ( <i>P. brasilianum</i> + <i>P. falciparum</i> ) em amostras de primatas não humanos pela amplificação de PCR <i>Multiplex</i> . (PM) Peso molecular 100 pares de base: pb; (S69) e (S70) DNA de <i>Pithecia irrorata</i> positiva para <i>P. brasilianum</i> ; (S71) DNA de <i>Saguinus weddelli</i> negativo para <i>Plasmodium</i> ; (S72) DNA de <i>Callicebus brunneus</i> e (S103) DNA de <i>Lagothrix cana cana</i> positivo para <i>P. brasilianum</i> + <i>P. falciparum</i> ; (H <sub>2</sub> O) controle negativo .....	33
Figura 15 -	Alinhamento múltiplo parcial das sequências do gene 18S rRNA obtidas de primatas não humanos com sequências do <i>GenBank</i> . As sequências obtidas de primatas não humanos são alinhadas com a sequência de <i>P. malariae</i> (Pm) Uganda-1, bem como uma sequência parcial de Papua Nova Guiné (PNG) e isolado <i>P. brasilianum</i> (Pb) do <i>Genbank</i> . S39, S69 e S141 indicam as três amostras representativas de primatas não humanos diagnosticadas como <i>P. brasilianum</i> . Letras minúsculas indicam a região do <i>primer</i> Plgen18SF gênero específico. Pf indica <i>P. falciparum</i> e Pv <i>P. vivax</i> . (.) mesmo nucleotídeo e (-) <i>gaps</i> .....	35

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 -	Casos de malária nos Estados da Amazônia Legal, ano 2012 .....	5
Tabela 2 -	Espécie de <i>Plasmodium</i> descritos em primatas e seus respectivos hospedeiros .....	10
Tabela 3 -	Espécies de <i>Plasmodium</i> de primatas não humanos que apresentam semelhanças morfológicas com as espécies de <i>Plasmodium</i> que acometem o homem .....	13
Tabela 4 -	<i>Primers</i> do gene 18S rRNA para identificação <i>Plasmodium</i> por <i>Semi Nested PCR Multiplex</i> .....	23
Tabela 5 -	Amostras DNA de plasmódios de origem humana selecionadas para a avaliação de infecção de <i>P. malariae</i> por <i>Semi Nested PCR Multiplex</i> .....	27
Tabela 6 -	Animais avaliados no xenodiagnóstico.....	29
Tabela 7 -	Frequência de <i>Plasmodium</i> sp. por <i>Semi Nested PCR Multiplex</i> em primatas não humanos de acordo com a família, gênero e área de localização .....	32
Tabela 8 -	Número de infecção por <i>Plasmodium</i> em primatas não humanos por <i>Semi Nested PCR Multiplex</i> , de acordo área de coleta.....	33
Tabela 9 -	Número de infecção por <i>Plasmodium</i> em humanos por <i>Semi Nested PCR Multiplex</i> comparado com as análises microscópicas realizadas anteriormente .....	34

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acre

AM – Amazonas

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia

CEUA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

CSP – *Circumsporozite protein* (Proteína Circumsporozoita)

FIOCRUZ-RO – Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia

FLONA – Floresta Nacional

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IPEPATRO – Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais de Rondônia

MSP-1 – *Merozoite Surface Protein – 1* (Proteína 1 da Superfície de Merozoíto)

MT – Mato Grosso

NARF – *Nucleic Acids Research Facilities*

PCH – Pequena Central Hidrelétrica

RO - Rondônia

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/MMA

SSU rRNA – *Small Subunit Ribosomal RNA*

OMS – Organização Mundial de Saúde

UHE – Usina Hidrelétrica

UNIR – Fundação Universidade Federal de Rondônia

VCU – *Virginia Commonwealth University*

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

	<b>Epígrafe</b> .....	I
	<b>Agradecimento</b> .....	II
	<b>Resumo</b> .....	IV
	<b>Abstract</b> .....	V
	<b>Lista de Figuras</b> .....	VI
	<b>Lista de Tabelas</b> .....	VII
	<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	VIII
	<b>Sumário</b> .....	IX
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	Epidemiologia da malária .....	3
1.2	Malária humana .....	5
1.3	Malária em primatas não humanos .....	8
1.4	Relação da malária de primatas não humanos com a malária humana .....	13
1.5	Malária, uma zoonose ou antroponose? .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	Objetivo geral .....	17
2.2	Objetivos específicos .....	17
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1	Considerações éticas .....	18
3.2	Amostras de primatas e área de estudo .....	18
3.3	Amostras de origem humana .....	20
3.4	Testes parasitológicos .....	21
3.4.1	Gota espessa e esfregaço .....	21
3.4.2	Xenodiagnóstico .....	22
3.5	Testes moleculares .....	22
3.5.1	Extração de DNA .....	22
3.5.2	<i>Semi Nested PCR Multiplex</i> .....	23
3.5.3	Sequenciamento .....	24
4	<b>RESULTADOS</b> .....	26
		IX

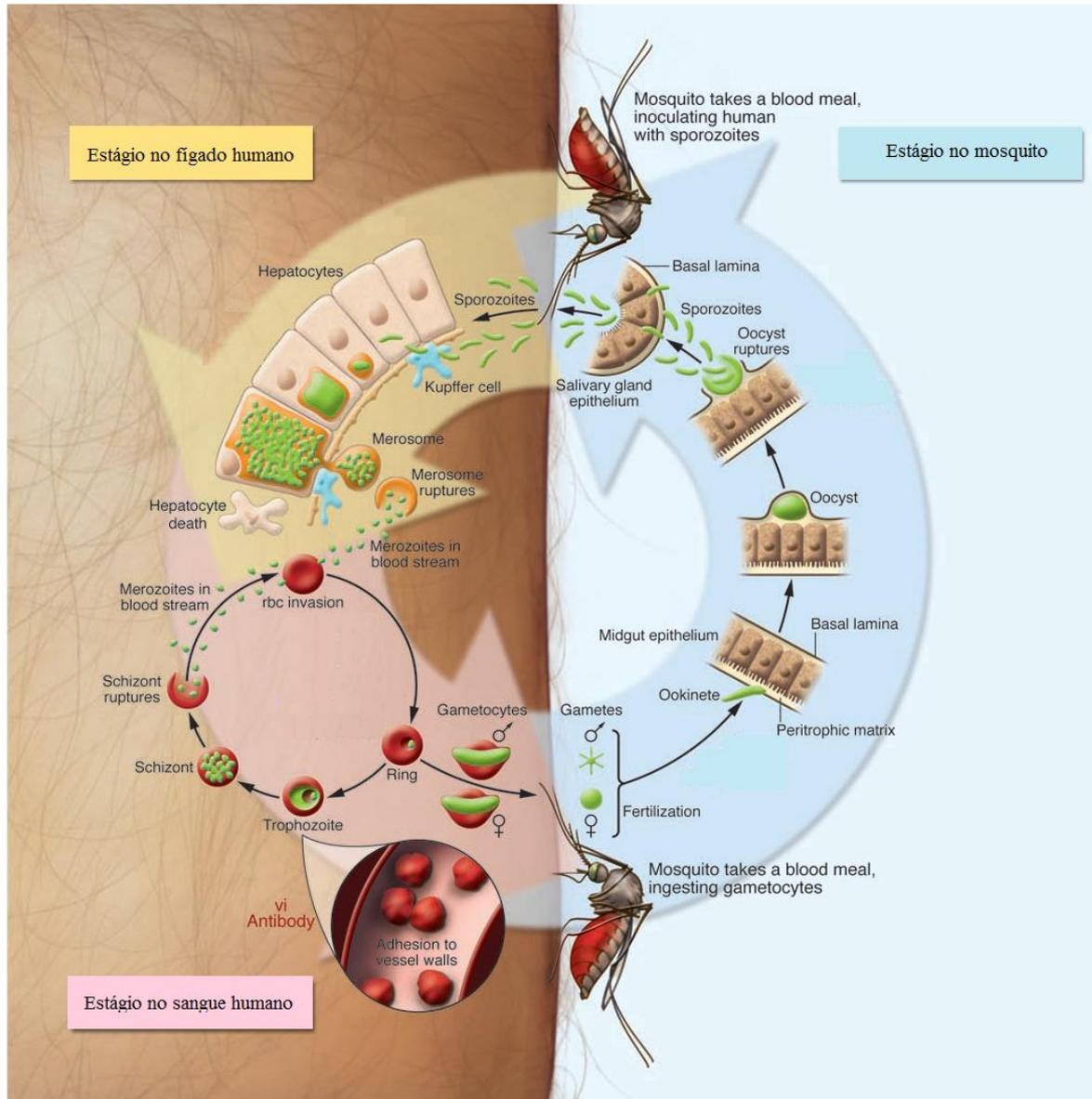
4.1	Amostras biológicas.....	26
4.1.1	Primatas não humanos .....	26
4.1.2	Humana .....	27
4.2	Testes parasitológicos .....	28
4.2.1	Microscopia .....	28
4.2.2	Xenodiagnóstico .....	28
4.3	Identificação de Espécie de <i>Plasmodium</i> por PCR e Sequenciamento .....	30
4.3.1	Primatas não humanos .....	30
4.3.2	Humanos .....	33
4.4	Análise das sequências do gene 18S rRNA .....	34
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
	<b>ANEXOS</b> .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários heteroxenos pertencentes ao filo *Apicomplexa*, da família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*, que apresenta níveis elevados de prevalência, morbidade e mortalidade (WHO, 2012). Há cerca de 200 espécies conhecidas de plasmódios parasitas de diferentes grupos de animais vertebrados e novas espécies continuam sendo descritas (PERKINS & AUSTIN, 2009). As espécies que infectam naturalmente o homem são: *Plasmodium falciparum*, descrito por Welch em 1897, *P. vivax*, descrito por Grassi & Feletti em 1890, *P. malariae*, descrito por Laveran em 1881, *P. ovale*, descrito por Stephens em 1922 e a espécie *P. knowlesi*, descrito por Sinton & Mulligan em 1932, recentemente descrita como a quinta malária humana (WHITE, 2008; KANTELE & JOKIRANTA, 2011). As demais espécies infectam outros animais, incluindo primatas não humanos, roedores, aves e répteis escamados (PERKINS & AUSTIN, 2009).

Todas as espécies de *Plasmodium* conhecidas são transmitidas por mosquitos, dípteros da família *Culicidae*, com exceção de uma única espécie, *P. mexicanum*, que ocorre em répteis e é transmitida por flebotomíneos (Família: *Psychodidae*) (AYALA & LEE, 1970). Espécies de *Plasmodium* de aves são transmitidas principalmente por mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes*, mas raramente do gênero *Anopheles* (VALKIUNAS, 2005). No entanto, a malária nos mamíferos é transmitida única e exclusivamente por mosquitos *Culicidae* do gênero *Anopheles* (COATNEY et al., 2003). Atualmente são conhecidas aproximadamente 400 espécies de *Anopheles*, mas apenas 60 são descritas como transmissoras da malária em condições naturais (TUTEJA, 2007).

O ciclo evolutivo do parasita é extremamente complexo, no qual o *Plasmodium*, como parasita heteroxeno, evolui obrigatoriamente em dois hospedeiros para completar o seu ciclo: o mosquito, hospedeiro invertebrado e vetor, e os hospedeiros vertebrados (Figura 1). Durante o seu desenvolvimento, o parasita apresenta várias etapas, com formas morfológicas distintas em cada hospedeiro. Uma única fase de desenvolvimento sexuado (esporogonia) no mosquito, portanto hospedeiro definitivo e duas fases de multiplicação assexuada (esquizogonia) no hospedeiro vertebrado. Nessa primeira fase é pré-eritrocítica e passa-se no fígado, na malária de mamíferos e em células do sistema retículo endotelial, na malária de répteis e aves, a segunda se passa sempre nos eritrócitos e é responsável pela patologia desenvolvida pelo parasita (PARAENSE, 1945; MILLER et al., 2002; STURM et al., 2006).



**Figura 1** - Ciclo biológico das espécies de *Plasmodium*. Fonte: Greenwood et al., 2008.

Apesar de o *Plasmodium* ter a capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros vertebrados, raramente causa doença grave nos hospedeiros não humanos (ZILVERSMIT & PERKINS, 2008). A malária humana caracteriza-se como uma enfermidade sistêmica, febril e aguda, cuja gravidade e curso dependem da espécie de plasmódio, além do grau de imunidade do hospedeiro (MILLER et al., 2002). Já em roedores e outros primatas, sabe-se que na maioria dos hospedeiros experimentais a infecção é aguda enquanto que nos hospedeiros naturais é geralmente crônica, com baixa parasitemia, com poucos sinais clínicos e podendo haver cura espontânea (DEANE, 1992; LANDAU & CHABAUD, 1994; OZWARA et al., 2003).

A malária humana tem um grande impacto econômico e social, por suas altas taxas de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas (WHO, 2012). As demais malárias merecem atenção por seu papel na pesquisa experimental (GALLAND, 2000) e relatos de transmissão zoonótica envolvendo primatas não humanos na Ásia (SINGH et al., 2004; COX-SINGH & SINGH, 2008; LEE et al., 2010; SERMWITTAYAWONG et al. 2012). Forte suspeita existe também de zoonose envolvendo macacos da América do Sul (FANDEUR et al., 2000; VOLNEY et al., 2002; DUARTE et al., 2008) mostrando assim a importância de estudos sobre a malária de primatas não humanos.

### 1.1. Epidemiologia da malária

A malária apresenta ampla distribuição, ocorrendo principalmente em áreas tropicais da África, Ásia, Américas Central e do Sul, Oriente Médio e Oceania (Figura 2). Globalmente, estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estão em risco de contrair malária, principalmente populações pobres (WHO, 2012).

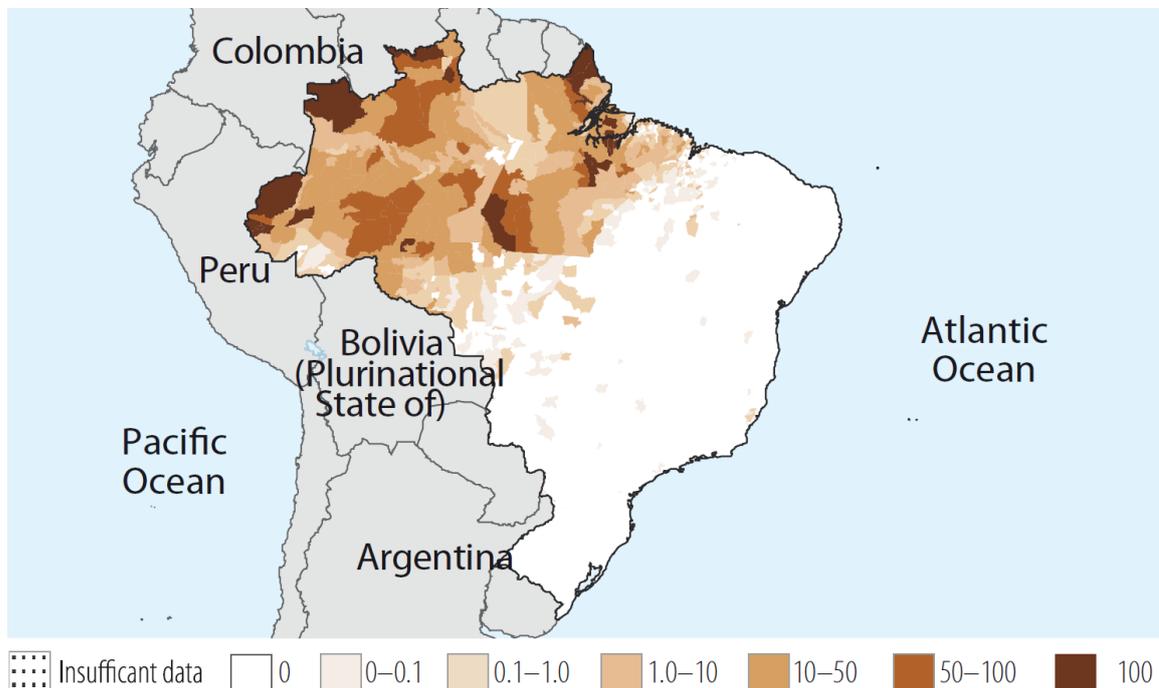


**Figura 2** – Distribuição mundial da malária humana. Fonte: WHO, 2011.

Atualmente, a malária é considerada endêmica em 104 países e territórios, sendo a maioria destes países localizados no continente africano. Aproximadamente 219 milhões de casos e 660.000 mortes foram registradas em 2010 em decorrência da malária. Em torno de

80% dos casos e 90% das mortes ocorreram no continente africano decorrentes de infecções por *P. falciparum*, sendo a maioria delas em crianças com menos de 5 anos de idade e mulheres grávidas. Nas Américas, a malária ocorre em 21 países, sendo o *P. vivax* responsável pela a maioria dos casos notificados na região, com exceção das regiões do Haiti e República Dominicana (WHO, 2012).

O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária nas Américas (WHO, 2012). A transmissão é praticamente restrita à região da Amazônia Legal, onde são registrados 99,8% dos casos notificados no país (OLIVEIRA- FERREIRA et al. 2010). Essa região é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins (Figura 3). Alguns casos de malária no Brasil ocorrem fora da área de transmissão ativa da Amazônia Brasileira, como os correspondentes casos autóctones de malária transmitida e mantida em pequenos focos com características específicas (OLIVEIRA-FEREIRA et al., 2010). Exemplos deles são aqueles relatados na Mata Atlântica, possivelmente mantidos pela infecção de primatas não humanos (DEANE, 1992; CURADO et al., 1997; CERUTTI et al., 2007; DUARTE et al. 2008).



**Figura 3** – Distribuição dos casos confirmados de malária no Brasil (por 1.000 habitantes). Fonte: WHO, 2012.

No Estado de Rondônia foram notificados 23.123 casos de malária em 2012, correspondendo a 10% dos casos notificados no país. É o quarto entre os estados da Amazônia Legal, sendo os primeiros o estado do Amazonas, do Pará e do Acre (Tabela 1). A

distribuição da malária é bastante heterogênea no estado de Rondônia, tendo municípios com mais de 1.000 casos de malária (Porto Velho, Candeias do Jamari e Machadinho D'Oeste) e vinte três municípios com menos de 10 casos (BRASIL, 2013).

O município de Porto Velho, capital do Estado de Rondônia, ocupa frequentemente o primeiro lugar em termos de números de casos de malária, seguido pelos municípios de Candeias do Jamari e Machadinho D'Oeste (BRASIL, 2013). Dos casos de malária na capital, aproximadamente 80% incide em áreas ribeirinhas ou associadas a estas, observando-se nestas áreas um alto número de portadores assintomáticos (ALVES et al., 2002; KATSURAGAWA et al., 2008, 2009, 2010).

**Tabela 1** – Casos de malária nos Estados da Amazônia Legal, ano 2012.

Estados	Total Positivo	F	V	F+V	M	Não F
AM	82.692	6.793	74.183	509	-	1.209
PA	80.033	12.719	63.325	2.297	34	1.658
AC	26.729	5.743	20.212	146	-	230
RO	23.123	805	22.212	100	-	10
AP	12.882	2.575	9.618	204	44	441
RR	5.843	485	5.318	35	-	5
MT	1.055	102	934	16	-	3
MA	968	15	944	9	-	-
TO	3	1	1	1	-	-

Não F = exame realizado através de teste rápido. Em destaque cinza, os dados de Rondônia. Fonte: BRASIL, 2013.

## 1.2. Malária humana

Tradicionalmente, são reconhecidas quatro espécies de parasitas de malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Uma quinta espécie, *P. knowlesi*, originalmente descrita infectando macacos no Sudeste Asiático, foi descrita recentemente infectando humanos (WHITE, 2008; KANTELE & JOKIRANTA, 2011). Em geral, estas 5 espécies diferem uma das outras nas suas manifestações clínicas, resposta aos antimaláricos, transmissão, morfologia, imunidade que provocam nos hospedeiros, distribuição geográfica e seus padrões de recaídas (LIU et al., 1998; TUTEJA, 2007; MOHAPATRA et al., 2008).

O *P. falciparum* é o causador da forma mais grave das malárias humanas, infectando eritrócitos em qualquer estágio de maturidade e em consequência resultando em parasitemias altas. Além disso, concentra-se nos pequenos vasos sanguíneos de órgãos interno vitais, devido a sua capacidade de citoaderência, causando eventualmente complicações clínicas e

morte (HEDDINI, 2002). Dessa forma, conhecida como terçã maligna. A identificação microscópica do *P. falciparum* é geralmente baseada na presença de pequenos trofozoítos e gametócitos que apresentam formas característica, com aspecto crescente ou em formato de banana, inconfundível com de outras espécies que infectam naturalmente o homem. Este estágio surge no sangue periférico somente depois de 7 a 15 dias depois das crises febris (DAY et al., 1998; EICHNER et al., 2001). *P. falciparum* é espécie mais estudada dos plasmódios, por sua importância epidemiológica e pelo sucesso do cultivo *in vitro*. Em 2002, um grande avanço na luta contra este parasita foi alcançado com o sequenciamento completo de seu genoma (GARDNER et al., 2002). Entre os plasmódios, o *P. falciparum* é considerado o mais recente e evolutivamente o menos eficiente como parasita (COATNEY et al., 2003).

O *P. vivax* é responsável pela terçã benigna, causando uma doença mais branda, embora questões sobre as complicações associadas com a infecção por este parasita tenham sido recentemente levantadas (BAIRD, 2007; ANDRADE et al., 2010; LACERDA et al., 2012). A alta prevalência de malária por *P. vivax*, provavelmente decorre do aparecimento precoce do estágio infectante para o mosquito, os gametócitos (PRICE et al., 2009) e a persistência de estágio dormente (hipnozoíta) que pode permanecer no fígado por semanas a anos (KROTOSKI, 1985; MUELLER et al., 2009). Na fase eritrocítica, todas as formas sanguíneas do parasita de *P. vivax* podem ser visualizadas no sangue periférico em microscopia. Na maioria dos estágios, o tamanho do parasita é maior que o das outras espécies de *Plasmodium* humano causando um aumento no diâmetro das hemácias parasitadas, as quais apresentam granulações de Schüffner (GILLES, 1993). O parasita preferencialmente invade reticulócitos, o que limita a parasitemia para cerca de 2% dos eritrócitos circulantes. Para invadir os eritrócitos o *P. vivax* requer a interação com antígeno Duffy, o que explicaria a raridade de *P. vivax* na África Ocidental e Central, já que a maioria da população é Duffy negativo (MILLER et al., 1976). Entretanto, alguns trabalhos descrevem a possibilidade de infecções por *P. vivax* em indivíduos Duffy negativo (RYAN et al., 2006; CAVASINI et al., 2007; MENDES et al., 2011). Por ser considerada “malária benigna”, leva a ser negligenciada em algumas regiões, principalmente quando coexiste com *P. falciparum* (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Além disso, a diversidade fenotípica de *P. vivax* encontrada em populações de parasitas de diferentes regiões, sugeri forte subdivisão genética (COGSWELL, 1992; LI et al., 2001; HULDEN & HULDEN, 2011).

O *P. malariae*, responsável pela “malária quartã”, está presente no mundo todo (COLLINS & JEFFERY, 2007; MUELLER et al., 2007), sendo mais comum na África

subsaariana e sudoeste do Pacífico (GRASSI & FELETTI, 1890). O parasita é caracterizado por um desenvolvimento lento (TSUCHIDA et al., 1982; GILLES, 1993; CHADEE et al., 2000) e apresenta uma parasitemia de baixo grau, raramente excedendo 30.000 parasitas por microlitro de sangue circulante, provavelmente devido a baixa produção de merozoítos na fase eritrocítica, juntamente com a preferência por eritrócitos maduros (GARNHAM, 1966). Este parasita é capaz de persistir no sangue com baixa parasitemia por longo período (20-49 anos ou mais) (VINETZ et al., 1998; CHADEE et al., 2000; SIALA et al., 2005; COLLINS & JEFFERY, 2007). Microscopicamente, esta espécie pode ser confundida com o *P. vivax*, o que resulta em infecções subestimadas em algumas regiões (CAVASINI et al., 2000; MOHAPATRA et al., 2008). Uma característica típica da espécie de *P. malariae*, são as formas de “faixa” ou “banda” que se estende ao longo do eritrócito parasitado no estágio de trofozoíto (GILLES, 1993). Historicamente, este parasita tem sido considerado de menor importância por causa da sua moderada infecção e baixa prevalência (BRUCE et al., 2007).

O *P. ovale* é responsável por uma forma terçã benigna com ciclo de 48 horas (COLLINS & JEFFERY, 2005). Infecções por *P. ovale* são raras, exceto na África subsaariana e algumas ilhas do oeste do Pacífico. No entanto, a migração humana coloca a possibilidade de sua presença e estabelecimento em outras áreas tropicais onde os vetores possam está presentes (COLLINS & JEFFERY, 2005; MUELLER et al., 2007). A parasitemia é geralmente baixa durante a infecção por *P. ovale*, provavelmente devido ao desenvolvimento restrito a eritrócitos jovens. A alteração produzida pelo *P. ovale* nos eritrócitos infectados é semelhante ao produzido por *P. vivax*, onde esquizontes e gametócitos são similares ao de *P. malariae* (GILLES, 1993). Outra similaridade ao *P. vivax* são as recaídas, sendo as únicas espécies de plasmódio humano capazes de produzir formas latentes de *Plasmodium* (GARNHAM, 1980; MUELLER et al., 2009).

O *P. knowlesi* é reconhecido como a quinta espécie de *Plasmodium* humano (WHITE, 2008; KANTELE & JOKIRANTA, 2011). Até agora, a transmissão natural de malária por *P. knowlesi* ocorre a partir de macacos para humanos. Dessa forma alguns autores acreditam que seja prematuro dizer que *P. knowlesi* seja a quinta espécie de malária humana, porque não há relatos de casos de transmissão do parasita na sequência humano–mosquito–humano (YAMASAKI et al., 2011). Morfologicamente, o *P. knowlesi* apresenta semelhança ao *P. falciparum* no estágio inicial e ao *P. malariae* nos estágios maduros (SINGH et al., 2004), constituindo um problema para o diagnóstico e tratamento da doença. Em vários países inúmeros casos de malária por *P. knowlesi* têm sido erroneamente identificados como *P.*

*malariae* através de análises microscópicas (KANTELE & JOKIRANTA, 2011). No entanto, com o progresso do diagnóstico molecular, a distinção entre *P. knowlesi* e *P. malariae* foi possível, além de identificar a importância da prevalência dessa espécie nos casos de malária humana, não somente na península da Malásia, mas também em outras partes do Sudoeste da Ásia (SINGH et al., 2004; KANTELE & JOKIRANTA, 2011).

### 1.3. Malária em primatas não humanos

A malária em primatas não humanos tem apresentado especial interesse na área da malariologia, desde a utilização destes como modelo animal da malária humana, para estudos sobre a biologia do parasita e vacinas (WATERS et al., 1993). Com os avanços nesta área, a partir da descrição de várias espécies de *Plasmodium* nesses animais, da susceptibilidade humana, do possível papel de reservatório e a relação filogenética desses parasitas com os humanos, estes animais e seus parasitas passaram a apresentar um papel central na compreensão da origem e controle da doença, possível depois do avanço da biologia molecular.

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

No início do século XX, a malária de primatas não humanos começou a ser descrita, quando a prática de importação de animais exóticos, incluindo primatas não humanos tornava-se comum pelo uso desses animais em circos e zoológicos na Europa (LAL et al., 1988). Entretanto, ao contrário do que ocorre com a malária humana, objeto de grande interesse por razões médicas e em saúde pública, relativamente pouco se conhece sobre a malária de primatas não humanos.

Atualmente são descritas 33 espécies de *Plasmodium* de primatas não humanos: sete espécies são de chimpanzés e gorilas (*Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla*) na África Central e do Oeste, duas parasitam orangotangos (*Pongo pygmaeus*) na Indonésia e Malásia, quatro infectam gibões (*Hylobates lar* e *Hylobates moloch*) no Sudeste da Ásia, onze infectam macacos no Velho mundo (Família *Cercopithecidae*) na África e Ásia, duas infectam macacos do Novo Mundo (principalmente da Família *Cebidae* e *Atelidae*) na América do Sul e oito

espécies infectam lêmures (*Lemur spp.*) em Madagascar (Tabela 2) (LECLERC et al., 2004; OLLOMO et al., 2009; KRIEF et al., 2010).

**Tabela 2** – Espécie de *Plasmodium* descritos em primatas e seus respectivos hospedeiros.

Grupo	Local	Espécie	Hospedeiro
Chimpanzês e Gorilas 	África Central e Oeste	<i>Plasmodium rodhaini</i> <sup>a</sup>	<i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorilla gorilla</i>
		<i>Plasmodium schwetzi</i> <sup>a</sup>	
		<i>Plasmodium reichenowi</i> <sup>b</sup>	
		<i>Plasmodium gaboni</i> <sup>b,i</sup>	<i>Pan troglodytes</i>
		<i>Plasmodium billcollinsi</i> <sup>b</sup>	
		<i>Plasmodium adleri</i> <sup>b,ii</sup>	<i>Gorilla gorilla</i>
		<i>Plasmodium blacklocki</i> <sup>b,iii</sup>	
Orangotangos	Indonésia e Malásia	<i>Plasmodium pitheci</i> <i>Plasmodium silvaticum</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
Gibões	Sudeste da Ásia	<i>Plasmodium eylesi</i>	<i>Hylobates lar</i>
		<i>Plasmodium jefferyi</i>	
		<i>Plasmodium youngi</i>	<i>Hylobates moloch</i>
		<i>Plasmodium hylobati</i>	
Macacos do Velho Mundo 	África Central, Sul e Sudeste da Ásia	<i>Plasmodium coatneyi</i>	<i>Macaca fascicularis</i> (Malásia e Filipinas)
		<i>Plasmodium cynomolgi</i>	<i>Macaca spp.</i> , <i>Presbytis cristatus</i> , <i>Presbytis 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 spp.</i> , <i>Mandrillus leucophaeus</i> (Congo, Camarões)
		<i>Plasmodium inui</i>	<i>Cynopithecus niger</i> , <i>Macaca spp.</i> , <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 georgesi</i>	<i>Cercocebus albigena</i> , <i>Cercocebus galeritus</i> (Quênia)
		<i>Plasmodium petersi</i>	<i>C. albigena</i> (Uganda)
Macacos Novo Mundo 	América do Sul	<i>Plasmodium brasilianum</i>	<i>Alouatta spp.</i> <i>Aotus vociferans</i> <i>Ateles spp.</i> <i>Brachyteles arachnoides</i> <i>Cacajao cabvus</i> <i>Callicebus spp.</i> <i>Cebus spp.</i> <i>Chiropotes spp.</i> <i>Lagothrix spp.</i> <i>Pithecia spp.</i> <i>Saguinus spp.</i> <i>Saimiri spp.</i>
		<i>Plasmodium simium</i>	<i>Alouatta caraya</i> <i>Alouatta guariba</i> <i>Brachyteles arachnoides</i>
Lêmures 	Madagascar	<i>Plasmodium foleyi</i>	<i>Lemur fulvus fulvus</i> , <i>Lemur fulvus rufus</i>
		<i>Plasmodium girardi</i>	
		<i>Plasmodium uilenbergi</i>	<i>L. fulvus fulvus</i>
		<i>Plasmodium sp.</i>	
		<i>Plasmodium malagasi</i>	<i>Propithecus verreauxi</i>
<i>Plasmodium percygarnhami</i> <i>Plasmodium coulangesi</i> <i>Plasmodium bucki</i>	<i>Lemur macaco macaco</i>		

a = Subgênero *Plasmodium* (BRAY, 1958).

b = Subgênero *Laverania* (BRAY, 1958).

i = *P. billbrayi* foi considerado da mesma espécie de *P. gaboni* (RAYNER et al. 2011).

ii = *P. adleri* referente ao *P. GorA* (RAYNER et al. 2011; DUVAL & ARIEY, 2012).

iii = *P. blacklocki* referente ao *P. GorB* (RAYNER et al. 2011; DUVAL & ARIEY, 2012).

Em contraste com o elevado número de plasmódios de macacos do Velho Mundo, de onde atualmente tem sido descritas as novas espécies de plasmódio de primatas, apenas duas espécies são conhecidas de macacos do Novo Mundo (Tabela 2), *P. brasilianum* (GONDER & BERENBERG-GOSSLER, 1908) e *P. simium* (FONSECA, 1951). No entanto, este grupo apresenta o maior número de espécies de primatas não humanos silvestres infectados por *Plasmodium* (CORMIER, 2011).

O *P. brasilianum* é responsável pela malária quartã, descoberto por Gonder & Berenberg-Gossler (1908) em *Cacajao calvus* (uacari-branco) da Amazônia Brasileira (Figura 4). Apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na floresta Amazônica do Panamá, Venezuela, Peru, Colômbia e Brasil, bem como na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil (DEANE, 1992). O *P. brasilianum* não só apresenta uma ampla distribuição, mas parasita uma grande variedade de macacos do Novo Mundo. Atualmente, 35 espécies de macacos selvagens foram encontradas com *P. brasilianum* (CORMIER, 2011).



**Figura 4** – *Cacajao calvus* (uacari-branco) da Amazônia Brasileira. Fonte: <http://www.scientificlib.com>.

Até 1951, *P. brasilianum* era a única espécie de malária de primatas não humanos conhecida nas Américas, quando a espécie de *P. simium*, foi descoberta em sangue de um *Alouatta guariba* (bugio ruivo) no Sul do Brasil, sendo responsável pela malária terçã (FONSECA, 1951). Ao contrário do *P. brasilianum*, o *P. simium* não só apresenta uma restrita distribuição geográfica, mas também foi descrito em apenas três espécies de primatas (Figura 5): *Alouatta guariba*, *Brachyteles arachnoides* (macaco miqui ou monocarvoeiro) e

o *Alouatta caraya* (bugio preto), na Mata Atlântica do Sul e Sudeste do Brasil (DEANE, 1992; DUARTE et al., 2008). No entanto, a sua distribuição geográfica ainda é questionada, já que a maioria dos dados é baseada apenas em análise de microscopia de sangue periférico, método de baixa sensibilidade (DUARTE et al., 2006).



Foto de Júlio César Bicca-Marques

*Alouatta guariba* - bugio



*Alouatta caraya* – bugio preto



*Brachyteles arachnoides* - muriqui

**Figura 5** – Espécies de primatas não humanos susceptíveis naturalmente ao *P. simium*. Fonte: wikipédia.org.

O *Anopheles (Kertessia) cruzii* é o transmissor conhecido de ambas as espécies de *Plasmodium* (*P. simium* e *P. brasilianum*) na região Sul e Sudeste da Mata Atlântica. Na região Amazônica, ainda não se conhece ao certo o vetor envolvido nesta transmissão (DEANE, 1969; DEANE & FERREIRA-NETO, 1969; DEANE et al., 1969; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & LUZ, 1996). *An. cruzii* é uma das espécies mais abundantes na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo conhecido como vetor da “malária de bromélia”, já que os vertículos das bromélias servem de criadouros dos vetores. Além disso, possui uma característica peculiar, a dispersão vertical, o que favorece o contato tanto com os primatas não humanos como com os humanos (DEANE, 1992).

O desenvolvimento do parasita nos primatas não humanos é semelhante ao observado nos humanos. A parasitemia geralmente é baixa e as infecções podem durar poucos

meses ou persistir por anos, no caso de *P. brasilianum* (DEANE, 1992). Os sintomas nos animais podem ser febre, apatia, perda de apetite e de peso, mas a malária pode ter cura espontânea. E em cativeiro a mortalidade por *P. brasilianum* pode ser alta (GARNHAM, 1966; DEANE, 1992). Em geral, poucas são as informações sobre a dinâmica desses parasitas, principalmente em campo (COATNEY et al., 2003).

As infecções são consideradas altas, em geral, em torno de 10%, sendo mais representativas nos casos de *P. brasilianum*. No Brasil, são registrados 14,3% dos casos, tendo a região Sudeste a que apresenta maior percentagem 35,6%, seguido pela Região Sul, com 18%, 10% na Região Amazônica e ausente na Região semi-árida do Nordeste (Figura 6) (DEANE, 1992). O gênero *Alouatta* reúne o maior número de infecções quando comparado com os demais primatas (DEANE, 1992; FANDEUR et al., 2000).

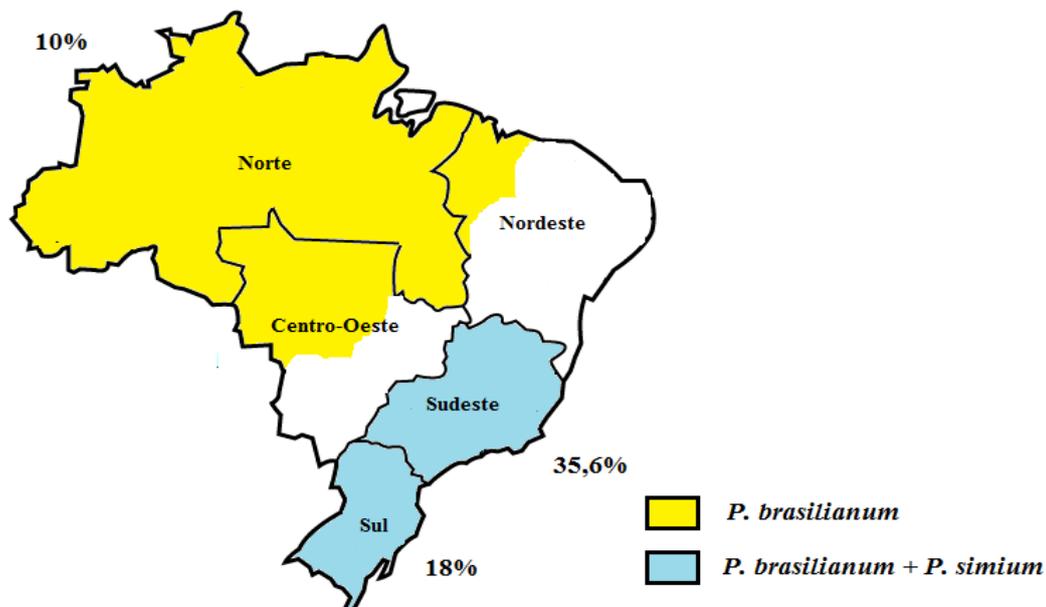


Figura 6 – Infecção por *Plasmodium* de primatas não humanos no Brasil. Fonte dos dados: DEANE, 1992.

Na Região Amazônica, a percentagem representa apenas *P. brasilianum*, pois casos de parasitismo por *P. simium* nunca foram registrados (DEANE, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995), apesar de a região possuir uma das espécies susceptível a este parasita, o *Alouatta caraya*, e uma das maiores faunas silvestres de primatas. O vetor, *An. cruzii*, não está presente na região, mas o *P. brasilianum* não deixou de existir entre as espécies de primatas da Amazônia, tendo então outros potenciais vetores relacionados com a transmissão desse parasita (WARREN & WHARTON, 1963; DEANE, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & LUZ, 1996). Além disso, não se descarta a possibilidade de abrangência da

distribuição geográfica de *P. simium* e de espécies de primatas susceptíveis para *P. brasilianum* e *P. simium*, já que os dados se baseiam em análises de baixa sensibilidade e a amostragem de espécies analisadas é relativamente pequena.

#### 1.4. Relação da malária de primatas não humanos com a malária humana

Um dos grandes interesses em relatos ao estudo da malária de primatas não humanos se deve ao fato da maior parte destes plasmódios apresentarem uma relação com a malária humana, além de que, infecções naturais em seres humanos por *Plasmodium* de primatas não humanos já foram relatadas (Tabela 3) (EYLES et al., 1960; CHIN et al., 1965; DEANE et al., 1966).

As duas espécies de *Plasmodium* responsáveis por manter a malária de primatas não humanos nas Américas, *P. brasilianum* e *P. simium*, são semelhantes aos parasitas da malária humana, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente (Tabela 3). E em torno delas surge há anos uma grande discussão sobre a possibilidade de serem a mesma espécie, pois o nível de similaridade abrange as características morfológicas, imunológicas e genéticas (COCHRANE et al., 1985; DEANE, 1992; ESCALANTE et al., 1995; COATNEY et al., 2003; DUARTE et al., 2006).

**Tabela 3** – Espécies de *Plasmodium* de primatas não humanos que apresentam semelhanças morfológicas com as espécies de *Plasmodium* que acometem o homem.

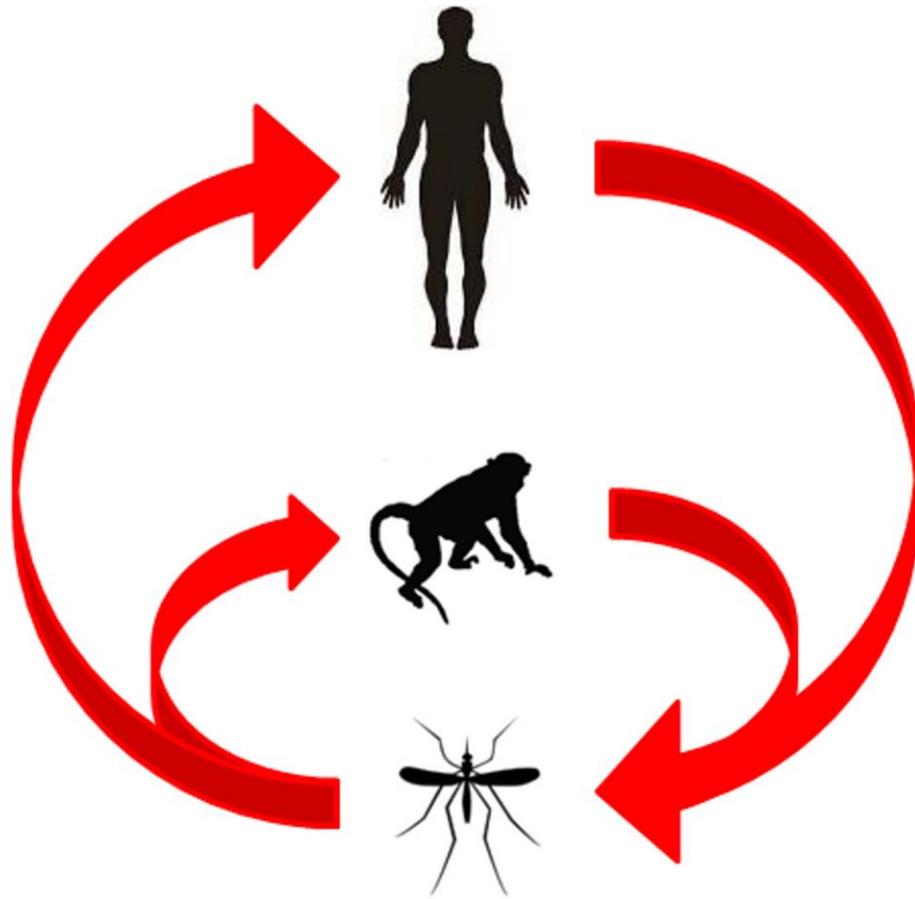
<i>Plasmodium</i> de primatas não humanos	Área de distribuição	<i>Plasmodium</i> humano
	<b>Ásia</b>	
<i>P. coatney</i>	Malásia, Filipinas	<i>P. falciparum</i>
<i>P. cynomolgi</i> *	Índia, Indonésia, Malásia, Sri Lanka, Taiwan	<i>P. vivax</i>
<i>P. eylesi</i>	Malásia	<i>P. vivax</i>
<i>P. fragile</i>	Índia, Sri Lanka	<i>P. falciparum</i>
<i>P. hylobati</i>	Indonésia	<i>P. vivax</i>
<i>P. inui</i>	Índia, Indonésia, Malásia, Filipinas, Sri Lanka, Taiwan	<i>P. malariae</i>
<i>P. jeffreyi</i>	Indonésia, Malásia	<i>P. vivax</i>
<i>P. knowlesi</i> *	China, Indonésia, Malásia, Filipinas, Singapura, Tailândia, Taiwan	<i>P. malariae</i> , <i>P. falciparum</i>
<i>P. pitheci</i>	Malásia	<i>P. vivax</i>
<i>P. simiovale</i>	Sri Lanka	<i>P. ovale</i>
<i>P. silvaticum</i>	Malásia	<i>P. vivax</i>
<i>P. youngi</i>	Malásia	<i>P. vivax</i>
	<b>América do Sul</b>	
<i>P. brasilianum</i>	Brasil, Colômbia, México, Panamá, Peru, Venezuela	<i>P. malariae</i>
<i>P. simium</i> *	Brasil	<i>P. vivax</i>

\* = Espécies de *Plasmodium* com relatos de infecção natural em humanos. Fonte: Adaptação de <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml>. Acesso em 12/02/2013.

O *P. brasilianum* é indistinguível do *P. malariae* humano, com base nas observações morfológicas e características biológicas (TALIAFERRO, 1932; DUNN, 1965; YOUNG, 1970; COCHRANE et al., 1985). Imunologicamente, os anticorpos contra esses dois parasitas apresentam reação cruzada (COCHRANE et al., 1984, 1985). Dados genéticos de genes do 18S rDNA, SSU rRNA, citocromo b mtDNA e estrutura primária codificante das proteínas CSP (*Circumsporozite protein* – Proteína Circumsporozoita) e MSP-1 (*Merozoite Surface Protein – 1* – Proteína 1 da Superfície de Merozoíto), sugerem que essas espécies sejam na realidade uma única espécie (LAL et al., 1988; ESCALANTE et al., 1995; FANDEUR et al., 2000; LECLERC et al., 2004). O mesmo acontece com o *P. simium* quando comparado com o *P. vivax* (GOLDMAN et al., 1993; LI et al., 2001; LECLERC et al., 2004).

Tazi & Ayala (2011) adicionaram novos dados genéticos sobre a similaridade de *P. brasilianum* e *P. malariae*, com relação a dois genes nucleares, SSU rRNA e o gene codificante da proteína MSP-1. No entanto ressaltam que o número limitado de cepas de *Plasmodium* de primatas não humanos disponíveis para análise torna a discussão ainda sem conclusões definitivas. Historicamente, o caso da origem filogenética do *P. falciparum*, é exemplo da insegurança introduzida por falta de dados. Isso determinou que sua origem fosse inicialmente descrita como sendo de plasmódio aviário, enquanto atualmente (CORMIER, 2011), graças à descrição da variedade de plasmódios encontrados em gorilas, chimpanzés e bonobos e suas estruturas moleculares relacionados com os da malária humana maligna, esteja-se chegando a importantes conclusões sobre a linhagem filogenética do *P. falciparum* como derivada dos parasitas de macacos do Velho Mundo Africanos (RAYNER et al., 2011; DUVAL & ARIEY, 2012).

A análise epidemiológica dessas espécies de malária de primatas não humanos, toma por base alelos do segmento de DNA responsável pela síntese de RNA ribossômico, assim como genes codificantes de proteínas (CSP e MSP-1), ou anticorpos monoclonas contra epítopo semelhante ao *Plasmodium* dos humanos (FANDEUR et al., 2000; VOLNEY et al., 2002; DUARTE et al., 2006, 2008). Desta forma, em áreas onde circulam simultaneamente esses *Plasmodium* de primatas não humanos e humanos, existe a possibilidade de que a malária se comporte como uma zoonose ou mesmo antropozoonose, onde a tradicional dinâmica de transmissão da malária humana, possa ter um novo modelo de transmissão, como sugerido no caso das infecções de *P. knowlesi* (Figura 7).



**Figura 7** – Modelo de transmissão de *P. knowlesi* em humanos. Fonte: YAKOB et al., 2010.

### 1.5. Malária, uma zoonose ou antroponose?

As infecções naturais em humanos por *Plasmodium* de primatas não humanos (Tabela 3) eram raras e praticamente acidentais (EYLES et al., 1960; CHIN et al., 1965; DEANE et al., 1966). No entanto, com os vários casos descritos de *P. knowlesi* em humanos no Sudeste da Ásia nos últimos anos, deixou de ser incomum a ponto desta espécie ser considerada a quinta malária humana (COX-SINGH & SINGH, 2008; WHITE, 2008).

No Brasil, apenas um caso de infecção humana por plasmódio de primatas não humanos foi registrado, sendo este por *P. simium*. Essa infecção ocorreu em Cantareira (Sudeste do Brasil), onde *P. simium* é altamente enzoótico (aproximadamente 60% dos bugios são infectados), de certo modo considerado por alguns um caso acidental, devido ao fato de ser um dos guardas florestais que realizava capturas de vetores na copa das árvores (DEANE, 1992), mas não deixa de mostrar a possibilidade deste tipo de infecção.

Na região Sul e Sudeste do Brasil, os surtos de malária humana que ocorrem na região são algumas vezes suspeito de terem origem de primatas não humanos, pois ocorrem

em locais onde a transmissão de malária humana foi controlada. Com efeito, a prevalência da malária de primatas não humanos é alta nessas regiões onde o vetor, o *An. cruzii*, pode participar dessa transmissão zoonótica devido a sua dispersão vertical, que lhe permite se alimentar tanto ao nível do solo quanto ao nível da copa das árvores (DEANE, 1992).

Infecções naturais por *P. brasilianum* aparentemente não foram registradas em humanos no Sul e Sudeste do Brasil. Entretanto, a transmissão da malária de primatas não humanos para humanos e vice-versa, parece não ser um evento tão raro na floresta Amazônica, como demonstrado nos resultados de alta prevalência de anticorpos contra *P. brasilianum*/*P. malariae* em primatas não humanos e em população indígena da Amazônia Brasileira (DE ARRUDA et al., 1989; DEANE, 1992) e nos trabalhos de Fandeur et al., (2000) e Volney et al., (2002) na região da Guiana Francesa em população rural. Esses fatos sugerem a existência de uma zoonose nessas regiões (DEANE, 1992; DUARTE et al., 2006, 2008), mas uma antroponose também pode ser sugerida, ou mesmo ambas.

Recentemente, a direção de transferência de hospedeiro foi avaliada com a comparação da diversidade gênica das espécies de *Plasmodium* humanos e de primatas não humanos para as espécies de *P. brasilianum* e *P. simium* verso *P. malariae* e *P. vivax* (TAZI & AYALA, 2011), o que poderia sugerir a ocorrência de uma zoonose ou antroponose. Interessantemente, *P. malariae* pode ter sido derivado de cepas de *P. brasilianum* (TAZI & AYALA, 2011; GUIMARÃES et al., 2012), e o oposto para *P. vivax*, *P. simium* pode ter sido derivado de *P. vivax*, ou seja, teríamos uma antroponose e uma zoonose, respectivamente. No entanto, o limitado número de sequências genômicas, principalmente das espécies de *Plasmodium* de primatas não humanos ainda deixa lacunas para essa discussão (TAZI & AYALA, 2011).

Neste contexto, a ocorrência de malária em primatas não humanos deve ser melhor investigada, principalmente na região Amazônica, onde apresenta uma das maiores diversidades da fauna silvestre de primatas, prevalência de casos de malária humana e grande ação antrópica, resultando em um aumento do contato entre humanos e primatas não humanos. Estas investigações poderão dar subsídios importantes das relações da malária humana com a malária de primatas não humanos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Estudar a malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Obter amostras sanguíneas de primatas não humanos mantidos em cativeiro e selvagens do Estado de Rondônia;
- ✓ Detectar e identificar infecções por *Plasmodium sp.* em primatas não humanos utilizando exames microscópicos (esfregaço e gota espessa) e moleculares: PCR (amplificação do gene que codifica a subunidade 18S do rRNA) e sequenciamento de fragmentos amplificados;
- ✓ Determinar infecções por *P. malariae* em amostras de DNA genômico de pacientes da região de Porto Velho utilizando exames moleculares: PCR (amplificação do gene que codifica a subunidade 18S do rRNA) e sequenciamento de fragmentos amplificados;
- ✓ Avaliar o potencial zoonótico dos primatas não humanos a partir do xenodiagnóstico com o principal vetor da malária humana na Amazônia, *Anopheles darlingi*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Considerações Éticas

O projeto de tese foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais de Rondônia (IPEPATRO), Porto Velho, sob o registro CEUA/IPEPATRO 2009/1. Além disso, todos os procedimentos neste estudo foram aprovados em total conformidade com as autorizações específicas emitidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), processo números 14081-3 e 17302-1, para manipulação dos animais selvagens.

Para as análises de amostras de origem humana, o projeto também possui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Nacional (CEP), sob o número CEP/CEPEM/77561.

Todas as licenças encontram-se em anexo.

#### 3.2. Amostras de primatas e área de estudo

As amostras de primatas não humanos foram obtidas em áreas do Estado de Rondônia, incluindo duas áreas nas fronteiras com os Estados do Amazonas e Mato Grosso, entre julho de 2009 a novembro de 2012. As localidades de captura foram predominantemente áreas de Floresta Amazônica, com exceção de três localidades (Pimenta Bueno - RO, Cabixi - RO e Comodoro - MT), que representam áreas de transição de Floresta Amazônica e Cerrado (Figura 8).

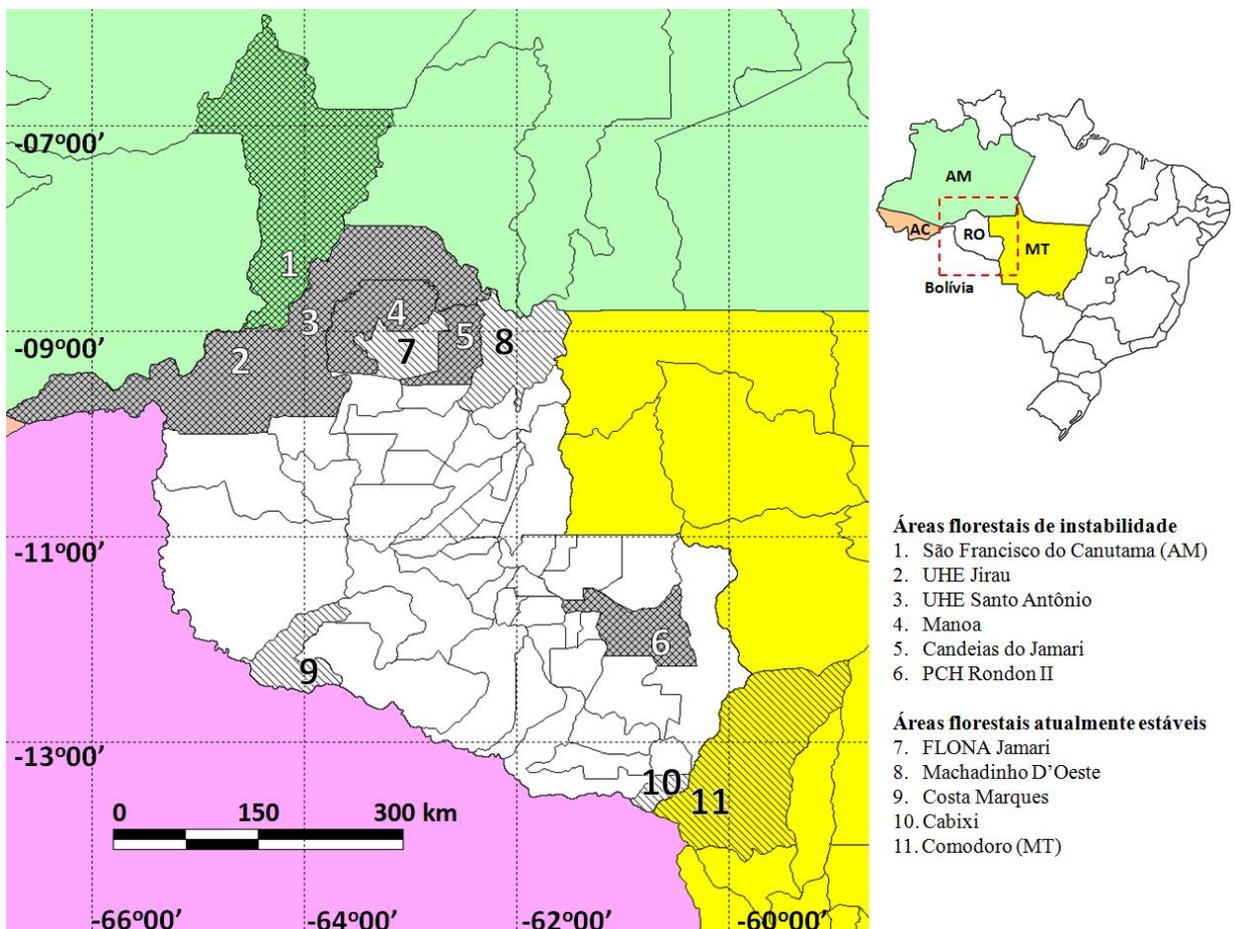
Os animais analisados pertenciam a dois grupos: (i) animais de cativeiro e (ii) animais selvagens. Os animais de cativeiros eram mantidos próximos das áreas de habitação humana, como os do Parque Ecológico de Porto Velho e os animais apreendidos pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), na maioria das vezes, mantidos em residências de cidades, como animais de estimação, em áreas rurais ou periféricas. Os dados de origem dos animais de cativeiro são desconhecidos por se tratar de animais apreendidos.

Os animais selvagens foram coletados em 11 localidades diferentes, sendo estas classificadas de acordo com as alterações ambientais efetuadas na área (Figura 8):

- 1) Áreas florestais de instabilidade ecológica: Cujubim (fazenda Manoa, com extração de madeira), Porto Velho (construção de duas Usinas hidrelétricas

(UHEs) no Rio Madeira – Santo Antônio e Jirau), Pimenta Bueno (construção de uma Pequena Central Hidrelétrica – PCH no Rio Machado – Rondon II) e duas áreas de ocupação com assentamentos agrícolas em São Francisco do Canutama – AM e Candeias do Jamari – RO.

- 2) Áreas florestais atualmente estáveis: FLONA do Jamari (antiga mineradora de estanho em Itapuã D'Oeste), Machadinho D'Oeste e Costa Marques (antiga área de extração de borracha) e em duas áreas de manchas florestais preservadas de grandes monoculturas de soja em Cabixi – RO e Comodoro – MT.



**Figura 8** - Mapa de Rondônia, norte do Brasil, mostrando as localidades incluídas no estudo. Regiões hachuradas em cinza escuro representam os municípios contidos em áreas florestais de instabilidade ecológica, e as regiões hachuradas em cinza claro em áreas florestais atualmente estáveis. Os números representam as localidades onde foram realizadas coletas de sangue de primatas não humanos.

As coletas eram realizadas em sua maioria em fragmentos florestais pela equipe do Laboratório de Mastozoologia e Taxidermia da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) sob a supervisão da pesquisadora Mariluce Rezende para obtenção de material destinado as Coleções de Referência de Vertebrados Terrestres do Estado de Rondônia, sendo cedidas

amostras de sangue de primatas não humanos para o presente estudo. E no caso de áreas de construção das UHEs e da PCH de Rondon II, as amostras foram coletadas por nossa equipe, durante o resgate dos animais antes da transferência dos mesmos para áreas de soltura, sob a orientação da equipe de resgate das empresas contratadas pelas concessionárias responsáveis pela construção das usinas.

A identificação dos animais foi realizada de acordo com as características morfológicas, sendo estes classificados em famílias, gênero (RYLANDS & MITTERMIER, 2009) e espécies (EMMONS & FEER, 1997).

O sangue foi obtido por punção da veia femoral dos animais previamente anestesiados por um veterinário especializado e recolhidos em tubos a vácuo com anticoagulante. O volume de sangue variava de acordo com o peso e as condições físicas do animal avaliadas pelo veterinário.

As amostras de sangue foram transportadas para o Laboratório de Entomologia da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (FIOCRUZ-RO), onde foram centrifugadas para separação de hemácias, plasmas e leucócitos e congeladas a -20°C. Para as coletas, processamento e transporte das amostras foram utilizados materiais descartáveis e proteção individual.

### 3.3. Amostras de origem humana

As amostras de origem humana foram selecionadas a partir de um banco de DNA genômico de pacientes obtidas em projetos anteriores pelas instituições CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina de Rondônia) e IPEPATRO. Essas amostras são de pacientes de áreas ribeirinhas de Porto Velho, como Vila Candelária, Cachoeira do Teotônio e Jaci Paraná, onde apresentam altos índices de malária humana, com casos de infecções assintomáticas e alta densidade de *Anopheles*, além das habitações humanas estarem próximas de fragmentos florestais.

Os critérios de inclusão das amostras de origem humana foram os seguintes: (i) amostras positivas para *P. vivax* e *P. falciparum* em exames microscópicos e negativas em PCR para *P. vivax* e *P. falciparum* (únicas espécies analisadas nos projetos anteriores); (ii) amostras negativas exames microscópico e em PCR;

Este critério teve como objetivo selecionar amostras possivelmente infectadas por *P. malariae*, já que é a espécie humana que apresenta semelhança ao único *Plasmodium* de

primatas não humanos identificado em nossa região, o *P. brasilianum*, e que é praticamente ausente segundo as análises microscópicas realizadas no Estado (Tabela 1). De modo que seja possível avaliar a real presença de casos de *P. malariae* em humanos na nossa região.

### **3.4. Testes parasitológicos**

#### **3.4.1. Gota espessa e esfregaço**

O preparo e a coloração das lâminas de gota espessa e esfregaço foi realizada de acordo com as técnicas preconizadas pela WHO (2005). Antes da punção venosa, foi realizada a assepsia com álcool 70% na região femoral dos animais e após a punção, a agulha utilizada na coleta de sangue foi substituída por uma nova agulha estéril para transferência do sangue para o tubo a vácuo, evitando assim qualquer tipo de contaminação com o pelo do animal.

As lâminas eram preparadas com pequenas gotas que restavam da seringa após a transferência do sangue para os específicos tubos de coleta de sangue. Para cada animal eram preparadas duas lâminas de gota espessa e dois esfregaços, de acordo com a quantidade de sangue disponível durante a coleta.

Na coloração da gota espessa, no primeiro momento as lâminas eram mergulhadas em solução de azul de metileno por 10 segundo e em seguida mergulhadas rapidamente em um recipiente de água tamponada para remoção do excesso de azul de metileno. Após este procedimento, as lâminas eram colocadas em placas de coloração com o lado da gota voltada para superfície da placa, onde foram adicionado uma solução de Giemsa na proporção de 1 gota de corante para 1ml de água tamponada para coloração por 10 minutos. Após este período, as lâminas foram mergulhadas em água tamponada para retirada do excesso do corante e finalmente secas a temperatura ambiente (BRASIL, 2009).

Para a coloração de esfregaço foi utilizado o kit comercial Panótico Rápido LB – Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. O esfregaço foi submetido à ação de fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos cada, e ao final da última imersão lavada com água destilada para retirada do excesso de corante e secada a temperatura ambiente.

A leitura das lâminas foi realizada de modo duplo cego por microscopistas do CEPEM, que rotineiramente realizam diagnóstico microscópico de malária em humanos que

procuram este serviço na instituição. Além disso, uma revisão de leitura das lâminas ainda era realizada pelo responsável do Laboratório de Epidemiologia da FIOCRUZ-RO.

### 3.4.2. Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico foi realizado a partir da alimentação direta de mosquitos nos animais anestesiados, com uma duração de 15 minutos. A espécie de mosquito utilizada no xenodiagnóstico foi de *An. darlingi*, F1 (primeira geração), com idade alada de 3 a 5 dias, criados no Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (2012).

Para cada animal foram utilizados 40 mosquitos para obtenção de uma média de 20 mosquitos alimentados no xenodiagnóstico, já que nem todos realizam o repasto sanguíneo durante o procedimento. Os mosquitos alimentados no xenodiagnóstico foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO com umidade (80%), temperaturas ( $27 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e fotoperíodo diário de 12 horas, condição propícia para o desenvolvimento do parasita (KLEIN et al. 1991a, 1991b; COATNEY et al., 2003).

A dissecação foi realizada de acordo com a técnica descrita por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), após 11 dias da alimentação dos mosquitos no xenodiagnóstico para pesquisa de oocistos por análise microscópica. A definição de 11 dias para dissecação foi baseada de acordo com o descrito por Klein et al. (1991a,b) em infecções com *P. vivax* e *P. falciparum* e por Coatney et al. (2008) em infecções com *P. brasilianum* de modo que aumentasse as chances de visualização de oocisto e esporozoíto de todas as espécies de plasmódios avaliadas.

As amostras positivas (estômago positivo) foram submetidas à extração de DNA por hidróxido de sódio e detecção da espécie de *Plasmodium* pela técnica de *Semi Nested PCR Multiplex* descrita no item 3.5.2.

## 3.5. Testes moleculares

### 3.5.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico de amostras de sangue de primatas não humanos utilizamos o Kit Comercial de Extração da GE (*Illustra genomicPrep Mini Spin Kit, GE*

*Health Care* – 28-9042-65), a partir de uma das alíquotas de hemácias de cada amostra de primatas não humanos.

### 3.5.2. Semi Nested PCR Multiplex

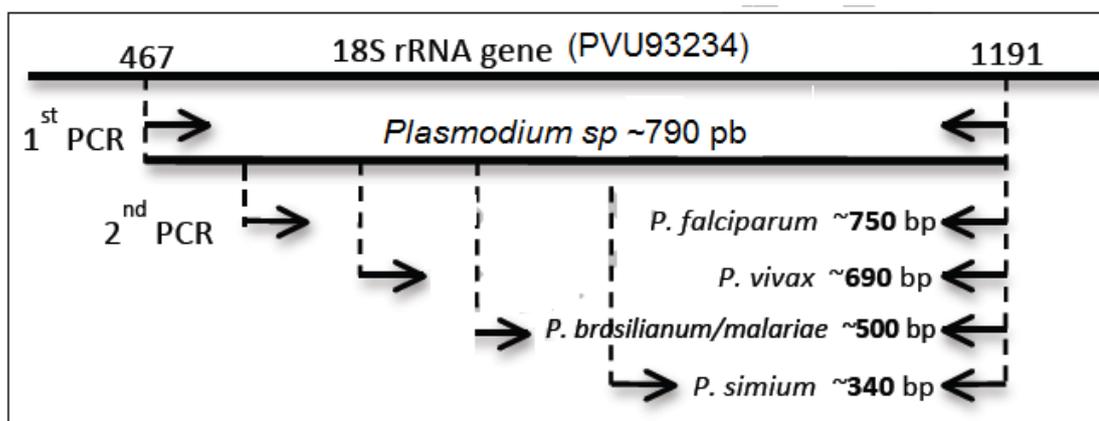
Para a detecção de *Plasmodium* foi realizada uma das técnicas de PCR, *Semi Nested PCR Multiplex*, a partir da amplificação de fragmentos do gene da região 18S rRNA do *Plasmodium*. Neste PCR, os *primers* foram desenhados de forma que na primeira reação (*Semi Nested PCR*) se obtenha um fragmento correspondente ao gênero de *Plasmodium*. E na segunda reação (*Multiplex PCR*) seja possível identificar 4 espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae/P. brasilianum* e *P. simium*, de acordo com o fragmento amplificado, (Tabela 4 e Figura 9).

Na primeira reação (*Semi Nested PCR*), os fragmentos foram amplificados em uma reação contendo: 1,5µl de tampão de Taq DNA Polimerase 10X com 25mM de Mg<sup>2+</sup> (5 *primer*), 1,5µl de desoxinucleotídeo trifosfatados (dNTPs) 2mM cada um (*Invitrogen*®), 1,5µl dos *primers* (2,5µM de cada *primer* plgen18SF e plgen18SR), 1µl de Taq DNA polimerase *HotMaster* 5U/µl (5 *primer*) e 5µl de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril para um volume final de 15µl. Na segunda etapa (*Multiplex PCR*) a reação continha: 1,5µl de tampão de Taq DNA Polimerase 10X com 25mM de Mg<sup>2+</sup> (5 *primer*), 1,5µl de desoxinucleotídeo trifosfatados (dNTPs) 2mM cada um (*Invitrogen*®), 1,5µl dos *primers* (2,5µM de cada *primer* plgen18SR, fal18SF, viv18SF, mal/bra18SF, sim18SF), 1µl de Taq DNA polimerase *HotMaster* 5U/µl (5 *primer*) e 1,5µl do produto da primeira reação de PCR sem diluição, totalizando um volume final igual ao da primeira reação de PCR.

**Tabela 4** – *Primers* do gene 18S rRNA para identificação de *Plasmodium* por *Semi Nested PCR Multiplex*

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do fragmento
1ª PCR		789pb
plgen18SF	TATTA A A A T T G T T G C A G T T A A A A C G	
plgen18SR	C T G T C A A T C C T A C T C T T G T C	
2ª PCR <sup>a</sup>		
fal18SF	G A A T C C G A T G T T T C A T T T A A A C T G G	747pb
viv18SF	A A C G C C G T T A G C T A G A T C C A C	686pb
bra/mal 18SF	G T T A A A A C A G T T T C T G T G T T T T G A A T A	498pb
sim18SF	A A C A C T G G A A A G C C T T T G C C T A A A A	343pb

a = *primer* desenhado para espécies de *Plasmodium* encontrados na área de estudo, incluindo as variantes de *P. vivax*.



**Figura 9** – Posição do *primer* do gênero e dos *primers* específicos em relação ao gene 18S rRNA de *P. vivax* (GenBank #PVU93234).

A PCR foi realizada em um termociclador (*Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems*) nas seguintes condições: desnaturação 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 3 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto; segunda reação (*Multiplex*): desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 68°C por 1min, sem a necessidade do ciclo final.

Os amplificadores foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão de TAE 1X. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e os produtos visualizados e fotodocumentados em aparelho *ImageQuant* (GE Healthcare®).

Todas as amostras positivas para *Plasmodium* eram submetidas a uma nova extração de DNA e reação de PCR para confirmação do resultado. Ressaltando que toda manipulação de amostras de primatas foram realizadas separadas das amostras de origem humana. As amostras de primatas não humanos foram processadas no Laboratório de Entomologia Molecular da FIOCRUZ – RO e as amostras de origem humana no Laboratório de Epidemiologia Molecular do CEPEM, evitando assim qualquer tipo de contaminação entre essas amostras.

### 3.5.3. Sequenciamento

Os produtos amplificados foram primeiramente clonados em plasmídeo pGEM®-T-*Easy* (Promega), conforme instruções do fabricante, e, *Escherichia coli* da cepa TOP10 quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinado com o Kit *Z-Competent™ E. coli transformation* (ZYMO RESEARCH CORP). Os insertos do DNA clonado foram amplificados por PCR de colônia utilizando *primer* SP6/T7.

Os fragmentos clonados e amplificados foram purificados para sequenciamento pelo método ExoSAP-IT® (USB-Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) e submetidos ao sequenciamento na VCU – NARF (*Virginia Commonwealth University - Nucleic Acids Research Facilities*) e FIOCRUZ Bahia (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz).

Os dados brutos foram editados com o programa *Sequencher* (*Gene Codes*, Ann Harbor, MI) e as sequências identificadas por BLASTn – *Basic Alignment Search Tool Program for Nucleotides* (ALTSCHUL et al., 1990) no NCBI/*GenBank*.no NCBI/*Genbank*.

As sequências correspondentes aos produtos de PCR obtidas na primeira reação foram submetidas ao BLASTn para confirmação da identidade das sequências e, em seguida analisadas quanto à porcentagem de identidade, empregando-se o método de múltipla progressão de *Clustal W Multiple alignment* (THOMPSON et al., 1994) por meio do programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis – Software Version 4*; TAMURA et al., 2007). A análise de identificação foi, ainda, realizada comparando-se os isolados obtidos neste estudo com as sequências de referência para espécies depositadas no *GenBank*.

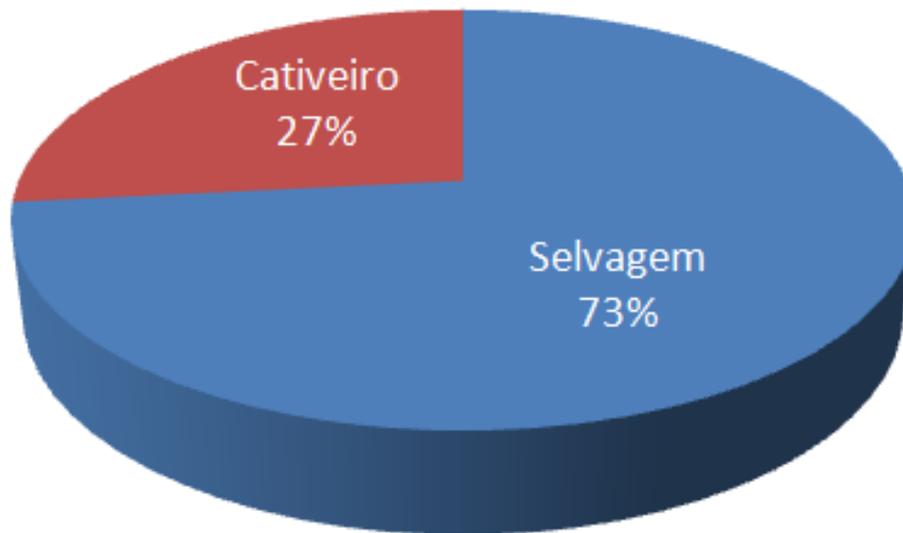
As amostras obtidas neste estudo estão sendo depositadas no *GenBank* como novas sequências para o gene 18S rRNA.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras biológicas

#### 4.1.1. Primatas não humanos

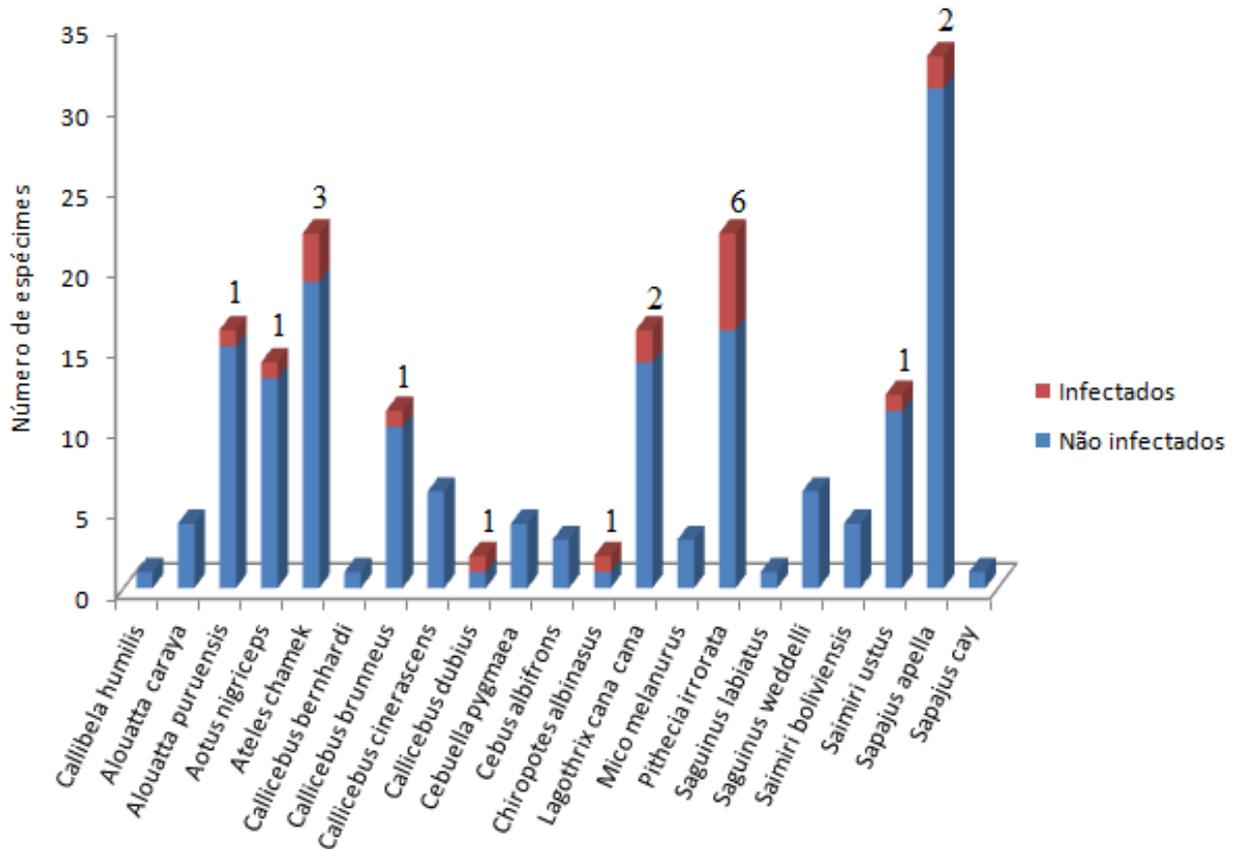
Foram coletadas 184 amostras de sangue de primatas não humanos, dos quais 27% (49/184) eram animais de cativeiro e 73% (135/184) animais selvagens (Figura 10). As amostras coletadas representam praticamente todas as espécies de primatas registradas em Rondônia pertencentes às cinco famílias: *Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae* e *Atelidae*, em um total de 21 espécies. As únicas espécies de primatas conhecidos da região e não coletadas foram *Mico rondoni* (espécie recentemente descrita em Rondônia: FERRARI et al., 2010) e *Callimico goeldii* (sagui goeldi), ambos da família *Callitrichidae*.



**Figura 10** – Distribuição percentual do número de amostras obtidas de animais mantidos em cativeiro e animais selvagens.

A espécie mais comum foi *Sapajus apella* (macaco-prego) (17,9%), seguido pelas espécies *Pithecia irrorata* (parauacú ou macaco velho) e *Ateles chamek* (coatá ou macaco-aranha-de-cara-preta), 12% de cada espécie. As espécies menos comuns foram *Sapajus cay* (macaco-prego) e três espécies de sagui (*Callibela humilis*, *Saguinus labiatus* e *Callicebus*

*bernhardi*), das quais foram coletas amostras de apenas um animal de cada espécie, correspondendo a 0,5% (Figura 11).



**Figura 11** – Número de primatas não humanos analisados com as respectivas espécies infectadas. Numeração a cima das barras indica o número de animal infectado por *Plasmodium*.

#### 4.1.2. Humana

De acordo com o critério de seleção das amostras de DNA de origem humana de plasmódio, foram selecionadas 180 amostras de DNA genômico de plasmódios de três áreas ribeirinhas de Porto Velho – RO, conforme descrição na tabela 5.

**Tabela 5** – Amostras DNA de plasmódios de origem humana selecionadas para a avaliação de infecção de *P. malariae* por *Semi Nested PCR Multiplex*.

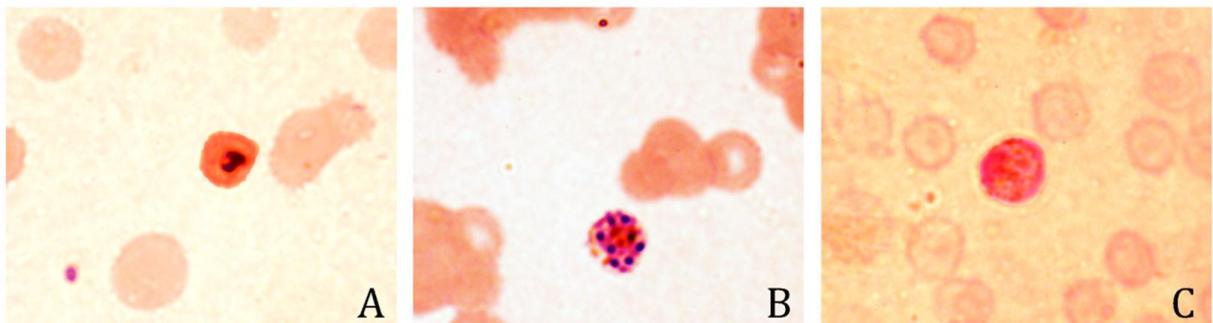
Localidades	Cachoeira do Teotônio	Jaci Paraná	Vila Candelária	Total
<b>Total</b>	25	39	116	180

## 4.2. Testes Parasitológicos

### 4.2.1. Microscopia

Todas as amostras obtidas dos primatas não humanos foram submetidas à análise de lâmina de gota espessa e /ou esfrego e apenas 3 apresentaram parasitemia detectada (1,6%), sendo estas procedentes de animais de cativeiro, com formas sugestivas para plasmódio (Figura 12). Todas as formas de *Plasmodium* observadas nas lâminas positivas apresentavam semelhanças com as formas de *P. vivax*, sendo estas diagnosticadas inicialmente como *P. vivax*, pelos microscopistas da instituição.

O número de parasitas e a qualidade da preparação das lâminas impediram o diagnóstico de algumas lâminas, sendo estas consideradas negativas.



**Figura 12** – Formas de *P. brasilianum* em lâmina de esfregaço de *Lagothrix cana cana* (macaco-barrigudo). Coloração panótica rápida, utilizando o princípio de coloração de Romanowski. (A) Trofozoíto; (B) Esquizonte; (C) Gametócito imaturo. Morfologicamente, as formas apresentadas são semelhantes as formas de *P. vivax*.

### 4.2.2. Xenodiagnóstico

Dentre os 184 animais avaliados 80 (43,5%) destes foram submetidos ao xenodiagnóstico, tendo em vista às dificuldades logísticas envolvidas na realização do mesmo em animais selvagens. No entanto, 23 animais (28,75%) não foram avaliados devido a problemas tais como a não alimentação dos mosquitos ou a morte dos mesmos antes da sua dissecação. Os 57 animais restantes apresentaram uma taxa de infecção de 17,5% (10/57) nas análises microscópicas e 4,0% (2/57) nas análises moleculares (Tabela 6).

O número de mosquitos positivos no xenodiagnóstico por animal avaliado variou de 1 a 3 espécimes enquanto que o número de oocistos presentes em cada mosquito dissecado variou de 1 a 2 formas por lâmina (Figura 13). Todas as amostras positivas por microscopia

(presença de oocisto) foram submetidas ao *Semi Nested PCR Multiplex* para identificação da espécie de *Plasmodium*, sendo estas identificadas como *P. brasilianum*.

**Tabela 6 – Animais avaliados no xenodiagnóstico.**

Origem	Espécie	Primatas não humanos		Mosquitos	
		PCR <sup>a</sup> +	Alimentados/ dissecados	Microscopia <sup>b</sup> +	PCR <sup>c</sup> +
Cativeiro	<i>Alouatta puruensis</i>	-	13/11	-	-
	<i>Aotus nigriceps</i>	-	18/14	1	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	20/20	1	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	30/10	1	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	20/14	-	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	20/19	1	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	20/18	1	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	22/20	-	-
	<i>Callibela humilis</i>	-	4/3	-	-
	<i>Callicebus brunneus</i>	-	33/8	-	-
	<i>Cebus albifrons</i>	-	28/20	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	19/18	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	20/19	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	32/30	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	15/11	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	11/11	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	12/12	-	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	6/4	2	-
	<i>Lagothrix cana cana</i>	-	17/12	-	-
	<i>Pithecia irrorata</i>	-	17/11	1	-
	<i>Pithecia irrorata</i>	-	10/8	-	-
	<i>Pithecia irrorata</i>	-	21/15	-	-
	<i>Saimiri boliviensis</i>	-	10/6	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	35/30	2	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	15/12	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	23/20	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	10/8	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	8/5	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	22/19	-	-
	<i>Sapajus apella</i>	-	15/11	-	-
<i>Sapajus apella</i>	-	10/5	-	-	
<i>Sapajus apella</i>	-	8/7	-	-	
<i>Sapajus apella</i>	-	8/3	-	-	
<i>Sapajus apella</i>	+ Pb	5/3	-	-	
Selvagem	<i>Alouatta puruensis</i>	-	12/10	-	-
	<i>Alouatta puruensis</i>	-	10/4	-	-
	<i>Alouatta puruensis</i>	-	25/8	-	-
	<i>Alouatta puruensis</i>	-	20/9	-	-
	<i>Alouatta puruensis</i>	-	5/3	-	-
	<i>Aotus nigriceps</i>	-	20/11	-	-
	<i>Ateles chamek</i>	-	5/2	-	-
		-	16/1	-	-

<i>Ateles chamek</i>	-	13/6	-	-
<i>Callicebus brunneus</i>	-	21/20	-	-
<i>Callicebus brunneus</i>	-	3/2	-	-
<i>Callicebus dubius</i>	+ Pb	8/5	3	3
<i>Cebuella pygmaea niveiventris</i>	-	5/2	-	-
<i>Cebuella pygmaea niveiventris</i>	-	4/1	-	-
<i>Chiropotes albinasus</i>	-	16/8	-	-
<i>Lagothrix cana cana</i>	-	16/1	-	-
<i>Lagothrix cana cana</i>	+ Pb	7/3	1	1
<i>Pithecia irrorata</i>	-	25/14	-	-
<i>Pithecia irrorata</i>	+ Pb	24/16	-	-
<i>Pithecia irrorata</i>	+ Pb	25/13	-	-
<i>Pithecia irrorata</i>	+ Pb	21/17	-	-
<i>Saimiri boliviensis</i>	-	9/3	-	-
<i>Sapajus apella</i>	-	9/4	-	-
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>896/600</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

a = *Semi Nested PCR Multiplex* de amostra de sangue de primatas não humanos

b = Microscopia do estômago de mosquito *An. darlingi*

c = *Semi Nested PCR Multiplex* dos estômagos de mosquito *An. darlingi* positivos em microscopia individualmente

+ Pb = animal positivo para *P. brasilianum*.



**Figura 13** – Lâmina fresca do estômago de *An. darlingi* alimentado em *Lagothrix cana cana* infectado com oocisto de *P. brasilianum*.

### 4.3. Identificação de Espécie de *Plasmodium* por PCR e Sequenciamento

#### 4.3.1. Primatas não humanos

No *Semi Nested PCR Multiplex*, do total de 184 amostras avaliadas, 19 revelaram-se positivas para *Plasmodium*, incluindo os animais positivos pela microscopia, apresentando uma taxa de infecção de 10,3% (19/184), sendo 8,7% (16/184) positivas para *P. brasilianum*,

0,5% (1/184) para *P. falciparum* e 1,1% (2/184) para infecção mista (*P. falciparum* + *P. brasilianum*) (Figura 14). Não foi detectada infecção por *P. vivax* ou *P. simium* em nenhuma das 184 amostras analisadas, apesar da alta prevalência de infecções por *P. vivax* na população humana em algumas regiões do Estado de Rondônia. Dessa forma, a taxa de infecção revelada por microscopia foi 1,6% (3/184), enquanto que por *Semi Nested PCR Mutiplex* foi 10,3% (19/184) (Tabela 7).

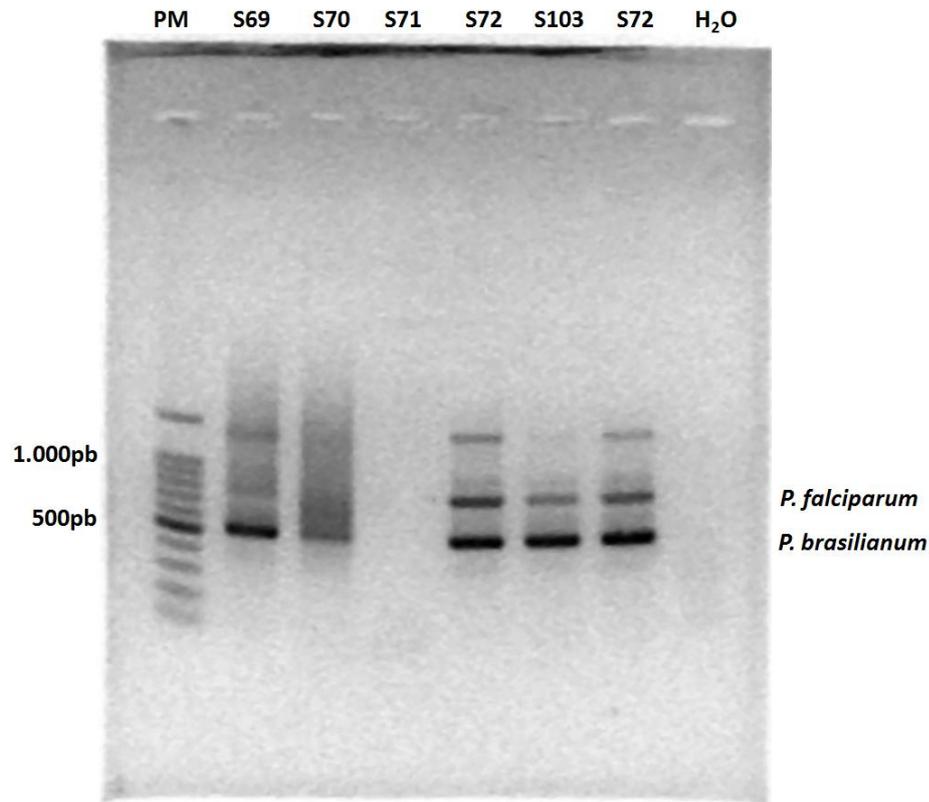
As seguintes espécies de primatas não humanos foram encontradas infectadas com *Plasmodium* sp.: *Sapajus apella* (macaco-prego) e *Saimiri ustus* (macaco de cheiro ou mão de ouro) da família Cebidae; *Callicebus brunneus* (zogue-zogue), *Callicebus dubius* (zogue-zogue), *Chiropotes albinasus* (cuxiú-de-nariz-branco) e *Pithecia irrorata* (parauacú ou macaco-cabeludo) da família Pitheciidae; *Alouatta puruensis* (bugio ou guariba), *Ateles chamek* (coatá ou macaco-aranha-de-cara-preta) e *Lagothrix cana cana* (macaco-barrigudo) da família Atelidae; e *Aotus nigriceps* da família Aotidae (Figura 11 e Tabela 7). Este último é descrito aqui pela primeira vez como sendo naturalmente infectados com *Plasmodium*, neste caso com *P. brasilianum*, originário de área afetada pela construção da UHE de Jirau.

DNA positivo para *P. falciparum* foi detectado em espécimes de *Alouatta puruensis* (animal de cativeiro), *Callicebus brunneus* e *Lagothrix cana cana* (animais selvagens), das quais duas espécies (*Callicebus brunneus* e *Lagothrix cana cana*) tinha infecções mistas (*P. falciparum* + *P. brasilianum*). Do total de 21 espécies de primatas não humanos examinadas, 10 espécies foram encontradas infectadas com *Plasmodium* (Tabela 7).

A espécie de primata não humano com o segundo maior número de espécimes avaliadas (22) e com a maior taxa de infecção foi a *Pithecia irrorata* (Família Pitheciidae), com uma taxa de infecção de 27,3% (6/22). A família Pitheciidae apresentou maior taxa de infecção 20,5% (9/44 espécimes da família Pitheciidae). Além da espécie *Pithecia irrorata*, as seguintes espécies dentro desta mesma família foram encontradas infectadas: *Callicebus brunneus* (1/11), *Callicebus dubius* (1/2) e *Chiropotes albinasus* (1/2). Com exceção da família *Callitrichidae*, todas as famílias de primatas não humanos tiveram representantes infectados (Tabela 7).

Com relação ao local de origem dos animais, observa-se um maior número de infecções por *Plasmodium* em animais selvagens (17/135) que em animais de cativeiro, dos quais apenas 2 animais foram encontrados infectados (2/49). Dentre os animais selvagens, o número de infecção por *Plasmodium* foi maior em animais de áreas florestais de instabilidade ecológica, que em animais de áreas florestais atualmente estáveis (Tabela 8).





**Figura 14** – Detecção de infecção por *P. brasilianum* e infecção mista (*P. brasilianum* + *P. falciparum*) em amostras de primatas não humanos pela amplificação de PCR *Multiplex*. (PM) Peso molecular 100 pares de base: pb; (S69) e (S70) DNA de *Pithecia irrorata* positiva para *P. brasilianum*; (S71) DNA de *Saguinus weddelli* negativo para *Plasmodium*; (S72) DNA de *Callicebus brunneus* e (S103) DNA de *Lagothrix cana cana* positivo para *P. brasilianum* + *P. falciparum*; (H<sub>2</sub>O) controle negativo.

**Tabela 8** – Número de infecção por *Plasmodium* em primatas não humanos por *Semi Nested PCR Multiplex*, de acordo área de coleta.

Área	Primatas não humanos	
	Avaliados	Infectados com <i>Plasmodium</i>
Floresta com instabilidade ecológica	82	11
Floresta atualmente estável	53	6
Cativeiro	49	2
Total	184	19

#### 4.3.2. Humanos

Dentre as 180 amostras de DNA de origem humana avaliadas, 6 estavam positivas para *P. malariae*, correspondendo a uma taxa de infecção de 3,3%, anteriormente diagnósticas como *P. vivax* e negativas nas análises microscópicas (Tabela 9). As amostras positivas para *P. malariae* são de pacientes de Vila Candelária, onde foram avaliadas 116 amostras (Tabela

5). Vila Candelária é uma área que está sendo afetada pela construção da UHE de Santo Antônio e como as demais áreas apresentam população de primatas não humanos nos fragmentos florestas próximos das áreas de habitação humana.

Nestas análises moleculares, além das amostras positivas para *P. malariae*, observados também amostras positivas para *P. vivax* e *P. falciparum* (Tabela 9).

**Tabela 9** – Número de infecção por *Plasmodium* em humanos por *Semi Nested PCR Multiplex* comparado com as análises microscópicas realizadas anteriormente.

Diagnóstico	Cachoeira de Teotônio		Jaci Paraná		Vila Candelária		Total de PCR +
	Gota Espessa	PCR	Gota Espessa	PCR	Gota Espessa	PCR	
V	20	4	10	1	30	6	11
F	4	2	-	-	-	-	2
M	-	-	-	-	-	6	6
Neg	1	19	29	38	86	104	161
Total	25		39		116		180

V = *P. vivax*; F = *P. falciparum*; M = *P. malariae*; Neg = Negativo. Em destaque cinza, os casos de *P. malariae*.

#### 4.4. Análise das sequências do gene 18S rRNA

O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos de PCR de todas as amostras positivas para *Plasmodium* de primatas não humanos e humanos, sendo confirmado o diagnóstico. Nesta análise utilizamos as sequências das amostras amplificadas a partir da 1ª PCR (fragmento correspondente ao gênero), pois algumas foram sequenciadas a partir do 2ª PCR (fragmento espécie específica) por não obtenção do fragmento da primeira reação de PCR – *Semi Neste* PCR (provavelmente devido ao fato de menor quantidade de DNA do parasita).

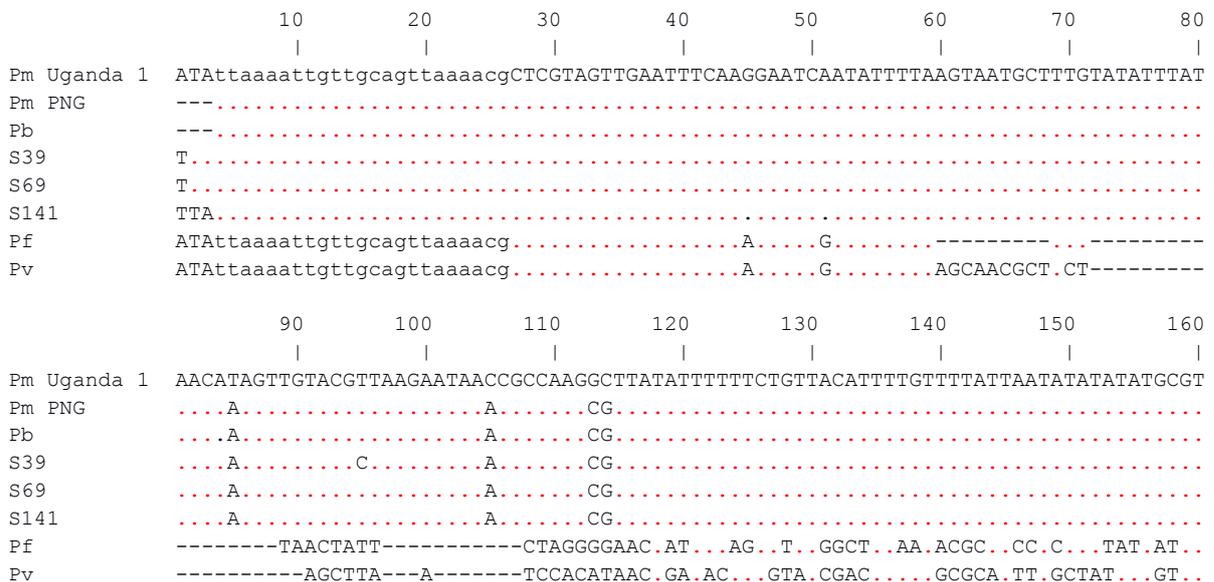
Quando comparadas com sequências de *Plasmodium* do *Genbank*, foi demonstrada similaridade de mais de 90% entre 10 amostras de primatas não humanos e *P. brasilianum/P. malariae*, 3 amostras de primatas não humanos e *P. falciparum* e 4 amostras de origem humana e *P. brasilianum/P. malariae*.

As análises dos alinhamentos das 3 sequências representativas de primatas (S39, S69, S141) para *P. brasilianum* apresentaram menos de 1% de divergência entre elas. Quando comparadas com sequências de *P. brasilianum* (AF130735) e *P. malariae* (AF145336 e AF145336) foi demonstrado maior similaridade para *P. brasilianum* 99,48% que para *P. malariae* 99,97%. Já nas amostras de origem humana os alinhamentos de 3 sequências representativas de *P. malariae* (H105, H116, H163) demonstraram menos de 2% de

divergência entre elas e quanto comparadas com sequências de *P. brasilianum* e *P. malariae* apresentaram maior similaridade para *P. brasilianum* (99%) que para *P. malariae* (98%).

Na análise das 3 sequências de *P. falciparum* obtidas de primatas não humanos (S34, S72, S103), o alinhamento demonstrou menos de 0,5% de divergência entre elas. Quando comparadas com sequências de *P. falciparum* do *Genbank* (HQ283220) apresentou similaridade de 99,56%.

Sequências obtidas de *P. brasilianum* de primatas foram comparadas com sequências de referência para espécies depositadas no *GenBank*: sequência completa de *P. malariae* Uganda -1/CDC (M54897; GOMAN et al., 1991), parcial sequência de isolados de Papua Nova Guiné (AF145336, MEHLOTRA et al., 2000) e parcial sequência *P. brasilianum* (AF130735; FANDEUR et al., 2000), assim como das sequências completa do gene A de *P. falciparum* (M19172; MCCUTCHAN et al., 1988) e *P. vivax* (X13926; WATERS; MCCUTCHAN, 1989). O alinhamento parcial das sequências (Figura 15) mostra a similaridade existente entre as sequências de primatas e *P. malariae* e *P. brasilianum*, com divergência entre as sequências de *P. falciparum* e *P. vivax*. O alinhamento completo encontra-se no Anexo 5.



**Figura 15** – Alinhamento múltiplo parcial das sequências do gene 18S rRNA obtidas de primatas não humanos com sequências do *GenBank*. As sequências obtidas de primatas não humanos são alinhadas com a sequência de *P. malariae* (Pm) Uganda-1, bem como uma sequência parcial de Papua Nova Guiné (PNG) e isolado *P. brasilianum* (Pb) do *Genbank*. S39, S69 e S141 indicam as três amostras representativas de primatas não humanos diagnosticadas como *P. brasilianum*. Letras minúsculas indicam a região do primer Plgen18SF gênero específico. Pf indica *P. falciparum* e Pv *P. vivax*. (.) mesmo nucleotídeo e (-) gaps.

## 5. DISCUSSÃO

O impacto e a interação da malária de primatas não humanos na dinâmica de transmissão da malária humana em áreas onde ambos hospedeiros coexistem ainda não são bem esclarecidos. Na região Amazônica, aonde existem densas florestas povoadas por uma grande diversidade de animais, as dificuldades na investigação dessa dinâmica se relacionam, principalmente, as poucas oportunidades para obtenção de amostras de primatas não humanos em áreas onde a malária humana está sempre presente.

Neste estudo foi investigada a ocorrência de infecção por *Plasmodium* em primatas não humanos no estado de Rondônia na Amazônia Ocidental Brasileira, aonde se encontram áreas de alta prevalência de malária humana. Os primatas não humanos incluem animais criados em cativeiro e selvagens. Os animais selvagens estudados pertenciam a duas áreas distintas: (i) área de floresta de instabilidade ecológica (local de construção de hidrelétricas, extração de madeira, etc.) e (ii) área de floresta atualmente estável (antigas áreas de mineração e extração de borracha, atividade agrícola, etc.).

Os resultados obtidos pela análise de microscopia revelaram índices de parasitemia muito baixos nos primatas não humanos. A baixa parasitemia em primatas não humanos é comum, no entanto, esta se apresenta persistente em infecções por *P. brasilianum* (DEANE, 1992) e/ou *P. malariae* (HAYAKAWA et al., 2009). Em casos de parasitemia muito baixa, a leitura de lâminas não é eficiente para a detecção de parasitas demandando tempo em demasia para uma análise confiável. Além disso, este tipo de exame pode levar a uma identificação errônea de diferentes espécies de plasmódios, sendo algumas morfológicamente difíceis de distinguir entre si (ÁVILA, 2005), principalmente em se tratando de espécies de plasmódios de primatas não humanos e humanos (COCHRANE et al., 1985; COATNEY et al., 2003).

Ao se comparar os resultados de microscopia com os moleculares, observamos grandes discrepâncias. O que não causa surpresa, pois é sabido que a sensibilidade e especificidade da microscopia são limitadas por vários fatores (SNOUNOU et al., 1993). Além disso, o diagnóstico de *P. vivax* em todas as lâminas de primatas não humanos registradas neste estudo como positivas, não foi confirmado nas análises moleculares, sendo na verdade *P. brasilianum*, devido à similaridade morfológica entre *P. brasilianum* e *P. malariae* (COCHRANE et al., 1985) e igualmente entre *P. malariae* e *P. vivax* (COATNEY et al., 2003). Esta semelhança morfológica dificulta o diagnóstico preciso de casos de *P.*

*malariae* em humanos no Estado de Rondônia como em todas as regiões onde esta espécie ocorre (CAVASINI et al. 2000; SCOPEL et al. 2004).

Até o momento a caracterização de *P. brasilianum*, assim como de *P. malariae* por microscopia é feita pela observação de pequenas particularidades apresentadas tais como os médios trofozoítos de *P. malariae* e *P. brasilianum* que se dispõem em faixa transversal dentro das hemácias. Embora estas formas de faixas possam ser encontradas no sangue de todas as espécies de macacos susceptíveis à infecção, ocorrem com maior frequência em espécies de *Alouatta* (COATNEY et al., 2003). No entanto, não foi possível a observação das formas de faixas tendo em vista que nenhum primata infectado por *P. brasilianum* pertencia ao gênero *Alouatta*.

Ao realizarmos a análise molecular das amostras de primatas não humanos, percebemos a quantidade significativamente maior de resultados positivos para PCR, similarmente a estudos prévios (FANDEUR et al., 2000; DUARTE et al., 2008). Das 184 amostras analisadas, obtivemos 19 resultados positivos (10,3%) para *Semi Nested PCR Multiplex* contrastando com apenas 3 amostras positivas (1,6%) para as análises microscópicas. Em quase todos os casos, a parasitemia observada foi muito baixa e, por vezes, a má qualidade das lâminas devido às dificuldades logísticas bem como a pequena quantidade de sangue obtido de alguns animais, impediram a identificação das espécies de parasitas ou até mesmo a obtenção de inequívocos diagnósticos por microscopia ótica.

No Brasil, a malária de primatas não humanos não apresenta distribuição uniforme, sendo mais frequente na região Sudeste, seguida pelas regiões Sul e Norte e, ausente na região Nordeste Semiárido (DEANE, 1992). Mesmo com o maior número de espécies de primatas não humanos, a Região Amazônica sempre apresentou taxas de infecção consideradas altas, mas mesmo assim menores do que àquelas observadas nas regiões Sudeste e Sul (DEANE, 1976, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995), como observado nos resultados obtidos. Uma das explicações seria que além de *P. brasilianum*, as regiões Sul e Sudeste apresentam infecções por *P. simium*. No entanto, a infecção de maior frequência nessas áreas é por *P. brasilianum* (46,3%), sendo ainda superior a da Região Amazônica. Sabe-se que o gênero *Alouatta* é o mais susceptível quando comparada com os demais, sendo o *Alouatta guariba* e o *Alouatta clamitans* as espécies mais frequentemente encontradas infectadas, no entanto, estas espécies não são encontradas na Região Amazônica (DEANE, 1992). Além disso, com a vasta destruição da Mata Atlântica, as espécies do gênero *Alouatta* são as que mais sobrevivem em fragmento de floresta, pois são animais folívoros (MILTON, 1980;

BICCA-MARQUES & CALEGARO-MARQUES, 1995), sobrevivendo bem nessas condições mesmo em grandes grupos. Em algumas regiões a sua densidade tem determinado a prevalência de malária de primatas não humanos, juntamente com a espécie *Ateles chamek* (DEANE et al., 1969; DEANE, 1976; LORENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). As únicas espécies do gênero *Alouatta* analisadas no presente estudo, foram exemplares de *Alouatta puruensis* e *Alouatta caraya*, que se mostraram negativas para infecção por *P. brasilianum*. No entanto, *Alouatta puruensis* tem sido frequentemente encontrado infectado na Amazônia Brasileira (DEANE & ALMEIDA, 1967; DEANE et al., 1969; DEANE; FERREIRA-NETO 1969).

A porcentagem de primatas não humanos infectados por *Plasmodium* em nosso estudo (10,3%) é quase a mesma daquela observada em estudos anteriores (DEANE, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). Estudos similares realizados em Florestas da Guiana Francesa relataram elevada prevalência de anticorpos contra a proteína CSP de *P. malariae/P. brasilianum* (73%) (VOLNEY et al., 2002), bem como uma elevada taxa de infecção (11,3%) obtida pela análise por PCR (FANDEUR et al., 2000) em primatas não humanos selvagens.

Nossos resultados apresentaram maior prevalência de *P. brasilianum* em animais selvagens (12,6%) do que em animais criados em cativeiro (4,1%). Wolfe et al., (2002) obtiveram resultados diferentes com orangotangos da Indonésia, sugerindo que a alta prevalência de *Plasmodium* em animais de cativeiro está relacionado ao aumento do nível de estresse causado pela mudança de comportamento do animal ao novo ambiente de cativeiro, tais como diminuição do uso de árvores, a desnutrição e a sua maior proximidade aos seres humanos, contribuindo para os níveis mais elevados de infecções. No entanto, os animais do Parque Ecológico de Porto Velho vivem em cativeiro há longo tempo e provavelmente já estão adaptados a esta condição e, os animais apreendidos pelo IBAMA foram analisados logo após a apreensão e, são principalmente animais adultos adaptados as condições de animais de estimação.

Infecções incomuns em micos, animais da família *Callitrichidae*, foram encontradas em áreas com instabilidade ambiental (construção de hidrelétricas) (DE ARRUDA, 1985; THOISY et al., 2000), o mesmo ocorreu em nossas análises na qual observamos um caso inesperado de infecção em *Aotus nigriceps* originário de áreas afetadas pela construção das usinas do Rio Madeira – Porto Velho/RO. Estas infecções podem estar associadas ao elevado

estresse de potenciais hospedeiros que passam por alterações de habitat naturais, devido à ação antrópica (ULLREY, 1993).

Infecção por *P. brasilianum* é bem comum em diversas espécies de macacos, principalmente *Cebidae* e *Atelidae*, e raramente em exemplares da família *Callitrichidae* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). Em parte, isto pode estar relacionado à morfologia do animal (tamanho do corpo), a sua socioecologia (número de indivíduos no bando) e ao seu comportamento (uso de abrigos noturnos) (DAVIES et al., 1991; NUNN & HEYMANN, 2005), o que favorece ou não o ataque por vetores da malária. Observamos 10 espécies de primatas não humanos infectados por *Plasmodium* dentre as quais a espécie com o segundo maior número de espécimes avaliadas, além da maior taxa de infecção (27,3%) foi a *Pithecia irrorata* (Família *Pitheciidae*).

A família *Pitheciidae* apresentou a maior taxa de infecção enquanto que nenhuma espécie da família *Callitrichidae* foi infectada. As espécies da família *Callitrichidae* são menos susceptíveis a infecção por *Plasmodium* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). Somente duas espécies da família *Callitrichidae* foram descritas com plasmódio, *Saguinus geoffroyi* e *Saguinus midas*, apresentando uma taxa de infecção muito baixa, entre 2 a 3% (PORTER et al., 1966; BAERG, 1971; DE ARRUDA, 1985; FANDEUR et al., 2000; THOISY et al., 2000; VOLNEY et al., 2002). No Brasil, tais espécies apresentam frequentemente resultados negativos para infecção por *Plasmodium* (DEANE, 1967, 1992). No entanto, algumas espécies da família *Callitrichidae* são experimentalmente susceptíveis tanto ao *P. simium* quanto a alguns plasmódios humanos (DEANE, 1967). Os abrigos noturnos utilizados por estes animais bem como o peso e o tamanho do bando aparentemente não favorecem o contato dessas espécies com os vetores da malária (DAVIES et al., 1991).

Em geral, as espécies de maior dimensão e que vivem em grandes grupos apresentaram elevada taxa de infecção: *Pithecia irrorata* (27,3%), *Ateles chamek* (13,6%) e *Lagothrix cana cana* (12,5%). As espécies *Chiropotes albinasus* e *Callicebus dubius* apresentaram taxa de infecção de 50%, mas apenas dois espécimes de cada espécie foram analisadas, o que resultou nesta alta taxa de infecção. Entretanto, a mesma taxa de infecção para *Chiropotes chiropotes* foi observada por Lourenço-de-Oliveira & Deane (1995) em 6 espécimes avaliadas durante a construção da UHE de Balbina em Manaus -AM. Três das quatro espécies e subespécies de *Chiropotes* (HERSHKOVITZ, 1985), foram previamente descritas infectadas no Brasil, com altas taxas de infecções: *Chiropotes albinasus* - 33,3% (DEANE, 1976), *Chiropotes s. satanas* - 11,8% (DE ARRUDA, 1985) e *Chiropotes s.*

*chiropotes* – 18,2% a 50% (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995), evidenciando que este gênero apresenta maior suscetibilidade ao *Plasmodium*.

*Sapajus apella*, antes considerada como subespécie da espécie *Cebus apella*, foi uma das espécies com maior número de espécimes avaliados. Animais dessa espécie são comumente encontrados em sua área de distribuição, além de ser uma das espécies de preferência para criação como animal de estimação. No entanto, estudos anteriores demonstraram que a espécie *Sapajus apella* apresenta uma taxa de infecção baixa para malária (DE ARRUDA, 1985; DEANE, 1992; FANDEUR et al., 2000), corroborando os nossos resultados.

Das espécies de primatas não humanos infectadas por *P. brasilianum*, registrou-se uma espécie, *Aotus nigriceps*, a qual foi descrita pela primeira vez como sendo naturalmente infectada. Embora, esta espécie seja uma das principais espécies utilizadas como modelo experimental nos estudos da malária humana e apresente suscetibilidade ao *P. brasilianum* e ao *P. simium* (COATNEY et al., 2003), o gênero *Aotus* sempre apresentou-se negativo nas pesquisas epidemiológicas, exceto um exemplar de *Aotus vociferans*, encontrado no Peru, a partir do qual Collins et al., (1985) isolaram a cepa conhecida como I/CDC de *P. brasilianum*. A razão para a ausência de infecção por *Plasmodium* deve-se ao fato de que a espécie *Aotus* é a única dentre os primatas neotropicais com hábitos noturnos (GARCIA & BRAZA, 1987), dormindo durante todo o dia em ocos de árvores e saindo apenas no período da noite. Esta característica diminui o contato com os vetores da malária (DUDLEY & MILTON, 1990), os quais tem o hábito de se alimentar de seus hospedeiros no período noturno quando estes estão em repouso (DAVIES et al., 1991).

Ao contrário do *P. brasilianum*, a infecção por *P. simium* está restrita a três espécies de macacos da Mata Atlântica. No entanto, nunca foi descartada a possibilidade deste parasita infectar outras espécies de primatas não humanos bem como de ser encontrada em outras regiões do Brasil (DEANE, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & DEANE, 1995). Dentre essas três espécies de primatas não humanos, uma esta presente na Amazônia, *Alouatta caraya*. No presente estudo apenas quatro exemplares desta espécie foram analisados, e nenhum caso de infecção por *P. simium* em primatas não humanos foi encontrado. Deane (1992) indicou que o *P. simium*, só foi encontrado em regiões em que o mosquito *An. cruzii* estava presente.

*An. cruzii* tem sido descrito como o transmissor da malária de primatas não humanos no Brasil, encontrando-se naturalmente infectado por *P. brasilianum* e *P. simium* (DEANE et

al., 1970). Além disso, é descrito como o potencial vetor que transmite a malária de primatas não humanos aos humanos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil devido ao seu comportamento acrodendrofílico e dispersão vertical (DEANE, 1992). Esse vetor é ausente na Região Amazônica e o *P. simium* também, fatos confirmados por nossas análises. No entanto, confirmamos igualmente que a circulação de *P. brasilianum* em primatas não humanos é comum na Região Amazônica. O vetor que transmite *P. brasilianum* na região Amazônica ainda não está definitivamente determinado. Lourenço-de-Oliveira & Luz (1996) sugerem 5 espécies de mosquitos vetores, *An. mediopunctatus*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus* e *An. shannoni*, por serem as espécies mais abundantes e de maior presença na copa das árvores durante as pesquisas entomológicas realizadas nas áreas das UHEs de Samuel (Porto Velho) e Balbina (Manaus).

O *An. darlingi*, principal vetor da malária humana na Região Amazônica (TADEI & THATCHER, 2000; FORATTINI, 2002), não possui relação com a transmissão da malária de primatas não humanos na região, segundo Lourenço-de-Oliveira & Luz (1996). No entanto, estudos anteriores não descartam a participação do *An. darlingi* na transmissão da malária de primatas não humanos, uma vez que esta espécie apresenta a capacidade de alimentar-se não apenas próximo ao solo, mas também na copa das árvores (DEANE et al., 1953), além de apresentar-se positivo ao *P. brasilianum/P. malariae* (DE ARRUDA et al., 1989). Similarmente, registramos o fato de o *An. darlingi* ter apresentado susceptibilidade a infecção ao *P. brasilianum* evidenciada por meio do xenodiagnóstico, cuja taxa de infecção foi de 17,5% associada a presença de oocistos nos estômagos de *An. darlingi*.

Alterações ambientais podem afetar o comportamento natural dos animais e vetores e facilitar o contato entre o homem e os primatas não humanos (FANDEUR et al., 2000). A densidade de *Anopheles* tende a aumentar e alguns vetores exibem uma conversão de hábitos essencialmente zoofílicos à antropofílicos (PATZ et al., 2000). Além disso, dos 5 anofelinos considerados possíveis vetores da malária de primatas não humanos na Região Amazônica (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & LUZ 1996), quatro deles (*An. mediopunctatus*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi* e *An. triannulatus*) também são considerados vetores secundários ou ocasionais da malária humana (DE ARRUDA et al., 1986; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1990; BRANQUINHO et al., 1993), de modo que não se pode descartar a possível situação zoonótica em nossa região. Embora os ciclos de transmissão da malária humana e dos primatas não humanos sejam aparentemente independentes uns dos outros, infecções humanas

esporádicas atribuídas ao parasita da malária de primatas não humanos podem ocorrer em áreas com alterações ambientais (FANDEUR et al., 2000, VOLNEY et al., 2002).

A alta taxa de infecção por *Plasmodium* sugere elevada circulação de *P. brasilianum* em primatas locais, o que pode manter a malária humana residual na região. Casos de infecção por *P. malariae* em humanos apresentam taxas anuais de incidência de menos de 1% na Amazônia (WHO, 2005). No entanto, essa taxa pode ser subestimada devido aos problemas de diagnóstico microscópico discutido anteriormente. Cavasini et al., (2000) observaram taxas subestimadas de infecção por *P. malariae* em populações do Estado de Rondônia. Da mesma maneira observamos uma taxa de infecção de 3,3% por *P. malariae* nas amostras de origem humana na região de Porto Velho, nunca antes registrada. Além disso, estudos sorológicos encontraram níveis elevados de prevalência de anticorpos contra *P. brasilianum/P. malariae* em tribos indígenas na Bacia Amazônica do Brasil (DE ARRUDA et al., 1989). Os autores consideraram que estas taxas de infecção por *P. malariae* em humanos estavam relacionadas à presença de primatas não humanos mantidos pelos índios como animais de estimação. Ciclos enzoóticos silvestres envolvendo primatas não humanos na região Amazônica já foram identificados tanto para a dengue como para febre amarela (GUBLER, 2002; WHO, 2012) e um processo similar pode estar ocorrendo com *P. malariae/P. brasilianum*.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que a circulação de *P. malariae* e *P. brasilianum* em humanos e primatas não humanos existe em nossa região apesar do seu negligenciamento devido a diagnósticos errôneos dos casos humanos, os quais dificultam a compreensão da participação dos primatas não humanos na dinâmica de transmissão da malária humana na região.

Dados genéticos sugerem que a transferência entre o hospedeiro humano e primatas não humanos de *P. malariae* e *P. brasilianum* ocorreu recentemente, mas a direção, ainda é desconhecida devido à escassez de sequências de amostras de primatas não humanos (TAZI & AYALA, 2011). Com base nos dados disponíveis atualmente, existe a possibilidade de *P. malariae* ter derivado de *P. brasilianum*, sendo, desta forma, considerada uma zoonose (TAZI & AYALA, 2011; GUIMARÃES et al., 2012). A transferência de espécies de *Plasmodium* entre os hospedeiros pode ser comum em áreas onde os dois coexistem com potenciais vetores.

O presente trabalho relata o caso inédito de DNA positivo para *P. falciparum* em primatas não humanos na Amazônia. Apesar de não encontrar infecção por *P. brasilianum* em

*Alouatta puruensis*, este apresentou uma infecção por *P. falciparum*, além das espécies *Callicebus brunneus* e *Lagothrix cana cana*, as quais apresentaram infecções mistas (*P. falciparum* + *P. brasilianum*). O primeiro caso de *P. falciparum* em primatas não humanos no Brasil foi descrito em duas espécies de *Alouatta* (*Alouatta guariba* e *Alouatta caraya*) da Mata Atlântica por Duarte et al., (2008). Estudos anteriores sempre apresentaram dados sorológicos com alta prevalência de anticorpos contra *P. falciparum*, sugerindo que estes animais tiveram contato com este parasito (VOLNEY et al., 2002; DUARTE et al., 2006).

A espécie *P. falciparum* nunca tinha sido encontrada naturalmente em primatas não humanos silvestres, e foi considerada por décadas, espécie exclusiva de humanos, apesar de serem susceptíveis ao *P. falciparum* sob condições experimentais (CADIGAN et al., 1966; PORTER & YOUNG, 1967; COLLINS et al., 1968; CONTACOS & COLLINS, 1968; YOUNG & BAERG, 1969). No entanto, este conceito histórico foi contestado recentemente, desde a detecção de *P. falciparum* em chimpanzés, bonobos e gorilas na África (LIU et al., 2010; RAYNER et al., 2011). Além disso, esses primatas não humanos apresentam uma diversidade de espécies de *Plasmodium* filogeneticamente semelhantes ao *P. falciparum* e *P. reichenowi* (ESCALANTE & AYALA, 1994; ESCALANTE et al., 1995; JEFFARES et al., 2007). Isto indica que por longo tempo os macacos africanos tenham sido um reservatório de *P. falciparum* comprometendo as medidas de controle aplicadas até hoje.

Com o achado do presente trabalho, e a possibilidade do *P. falciparum* infectar outras espécies de macacos do Novo Mundo, o cenário epidemiológico da malária na América do Sul se torna preocupante. A taxa de infecção por *P. falciparum* nos primatas não humanos em nossos estudos em Rondônia foi superior ao encontrado por Duarte et al., (2008). Esses dados sugerem que este tipo de infecção pode não ser uma raridade como questionado por Cormier (2010) e a possibilidade de primatas não humanos serem reservatório de *P. falciparum* não pode ser descartada.

Nos últimos anos, a malária falciparum vem apresentando um declínio significativo, desde a adoção de terapia combinada com artemisinina pelo Ministério da Saúde e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A partir de 2006, o Brasil vislumbra uma redução na proporção de casos de malária falciparum significativa, quando nesse ano apresentou aproximadamente 26% de lâminas positivas para *P. falciparum*, e em 2012 essa proporção caiu para 14%. Em Rondônia, essa diferença foi ainda maior, 24% e 3,9%, respectivamente (BRASIL, 2013).

Nesse cenário, e admitindo que os primatas não humanos possam albergar o *P. falciparum* podemos questionar se a malária falciparum residual, que é observada em muitas áreas do estado de Rondônia, possui uma relação com a malária falciparum dos primatas não humanos, principalmente em áreas de florestas com variados graus de intervenção humana.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos e os fatos originais observados no presente estudo vem somar-se a outras indicações da existência de interações entre a malária humana e a de primatas não humanos. Entretanto, não permitiu o esclarecimento de fatores no sentido em que ocorre a infecção, se do homem para o animal, ao animal para o homem, ou em ambos os sentidos, da sua dinâmica, frequência de ocorrência, e dos processos ecológicos envolvidos.

Dessa forma, podemos concluir que:

- ✓ o presente estudo confirma resultados de estudos anteriores de Deane e colaboradores sobre a extensa distribuição de infecções naturais pelo *P. brasilianum* em numerosas espécies de primatas não humanos da Região Amazônica e inclui infecção de uma espécie (*Aotus nigriceps*) não descrita anteriormente, mostrando que a lista de hospedeiro natural de *Plasmodium* ainda esta incompleta;
- ✓ infecções por *P. simium* não detectadas nas amostras de sangue de primatas não humanos, não exclui a possibilidade da existência de circulação de *P. simium* na região, já que a amostragem de primatas não humanos susceptíveis naturalmente a esta espécie de *Plasmodium* foi muito pequena;
- ✓ infecções humanas por *P. malariae* existe na região em localidades onde populações de primatas não humanos vivem próximos as áreas de habitação humana;
- ✓ DNA positivo para *P. falciparum* em primatas não humanos de diferentes espécies em diferentes localidades de Rondônia pode esta relacionado com a manutenção da malária falciparum residual mantida em algumas regiões do Estado.
- ✓ estes resultados mostram a importância da ação constante dos órgãos responsáveis pelo controle da malária, já que a possibilidade de um reservatório de malária de difícil inclusão nas medidas atualmente utilizadas para o controle da doença, possa ser responsável por focos de epidemias, manutenção da malária residual e o reaparecimento da malária em áreas já controladas.

O esclarecimento de fatores intervindo na interação entre malária humana e de primatas não humanos exigem aprofundamento das análises moleculares, em número e em extensão genômica de parasitas de origem humana e simiana, possíveis preliminarmente, a partir do material obtido de ambos hospedeiros neste estudo.

É positivo assinalar que os resultados obtidos no presente estudo indicam que o Estado de Rondônia com suas peculiaridades ambientais, provocadas ou não pelo ser humano, é um local em que pesquisas desse tipo devem ter continuidade e podem levar a resultados esclarecedores da inter-relação da malária de primatas humanos e não humanos.

**REFERÊNCIAS**

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215(3): 403-410.
- ALVES, F. P.; DURLACHER, R. R.; MENEZES, M. J.; KRIEGER, H.; SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(6): 641-648.
- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. M. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010; 9: 13-20.
- ARAÚJO, M. S.; GIL, L. H.; SILVA, A. A. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malar J.* 2012;11: 261- 270.
- ÁVILA, J. G. Sensitivity of malaria diagnosis in blood samples by PCT assay: A comparison with microscopy. United States Army Center for Health Promotion and Prevention – West, Fort Lewis Division 2005.
- AYALA, S. C.; LEE, C. Saurian malaria: development of sporozoites in two species of phlebotomine sandflies. *Science.* 1970; 167(3919): 891-892.
- BAERG, D. C. A naturally acquired infection of *Plasmodium brasilianum* in the marmoset, *Saguinus geoffroyi*. *J Parasitol.* 1971; 57(1): 8.
- BAIRD, J. K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 2007; 23(11): 533-539.
- BICCA-MARQUES, J. C.; CALEGARO-MARQUES, C. Locomotion of black howlers in a habitat with discontinuous canopy. *Folia Primatol (Basel).* 1995; 64(1-2): 55-61.
- BRANQUINHO, M. S.; LAGOS, C. B.; ROCHA, R. M.; NATAL, D.; et al. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87(4): 391-394.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A: Normas e Manuais Técnicos. 2ª ed. Brasília, DF. 2009.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - SIVEP\_Malária. Disponível em: <[http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)>. Acesso em 31 jan 2013.
- BRAY, R. S. Studies on malaria in chimpanzees. V. The sporogonous cycle and mosquito transmission of *Plasmodium vivax schwetzi*. *J Parasitol.* 1958; 44(1): 46-51.

- BRUCE, M. C.; MACHESO, A.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. Characterization and application of multiple genetic markers for *Plasmodium malariae*. *Parasitology*. 2007; 134(5): 637-650.
- CADIGAN, F. C. JR.; SPERTZEL, R. O.; CHAICUMPAN, V.; PUHOMCHAREON, S. *Plasmodium falciparum* in non-human primates (Macaque monkeys). *Mil Med*. 1966; 131: 959-960.
- CAVASINI, M. T.; RIBEIRO, W. L.; KAWAMOTO, F.; FERREIRA, M. U. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(5): 489-492.
- CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; et al. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101(10): 1042-1044.
- CERUTTI, C. JR.; BOULOS, M.; COUTINHO, A. F.; HATAB, M. L. D.; et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J*. 2007; 6: 33-45.
- CHADEE, D. D.; TILLUCKDHARRY, C. C.; MAHARAJ, P.; SINANAN, C. Reactivation of *Plasmodium malariae* infection in a Trinidadian man after neurosurgery. *N Engl J Med*. 2000; 342(25): 1924.
- CHIN, W.; CONTACOS, P. G.; COATNEY, G. R.; KIMBALL, H. R. A naturally acquitted quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*. 1965; 149(3686): 865.
- COATNEY, G. R. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg*. 1971; 20(6): 795-803.
- COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; WARREN, M.; CONTACOS, P. G. CD-ROM. The primate malarias [original book published 1971]. Atlanta (GA): CDC 2003.
- COCHRANE, A. H.; COLLINS, W. E.; NUSSENZWEIG, R. S. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite protein of *Plasmodium malariae* and detects a common epitope on *Plasmodium brasilianum* sporozoites. *Infect Immun*. 1984; 45(3): 592-595.
- COCHRANE, A. H.; BARNWELL, J. W.; COLLINS, W. E.; NUSSENZWEIG, R. S. Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasilianum*. *Infect Immun*. 1985; 50(1): 58-61.
- COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5(1): 26-35.
- COLLINS, W. E.; CONTACOS, P. G.; GUINN, E. G.; JETER, M. H.; SODEMAN, T. M. Monkeys to man transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles freeborni* mosquitoes. *J Parasitol*. 1968; 54(6): 1166-1170.

- COLLINS, W. E.; SKINNER, J. C.; HUONG, A. Y.; BRODERSON, J. R.; SUTTON, B. B.; MEHAFFEY, P. Studies on a newly isolated strain of *Plasmodium brasilianum* in *Aotus* and *Saimiri* monkeys and different anophelines. *J Parasitol.* 1985; 71(6): 767-770.
- COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(3): 570-581.
- COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Ver.* 2007; 20(4): 579-592.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1994. 228p.
- CONTACOS, P. G.; COLLINS, W. E. Falciparum malaria transmissible from monkey to man by mosquito bite. *Science.* 1968; 161(3836): 56.
- CORMIER, L. A. The Historical ecology of euman and wild primate malarias in the New World. *Diversity.* 2010; 2(2): 256-280.
- CORMIER, L. A. The Ten-thousand year fever: Rethinking human and wild-primate malaria. Walnut Creek, California, 2011.
- COX-SINGH, J.; SINGH, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* 2008; 24(9): 406-410.
- CURADO, I.; DUARTE, A. M.; LAL, A.A.; OLIVEIRA, S.G.; KLOETZEL, J. K. 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.* 1997; 92: 235-243.
- DAVIES, C. R.; AYRES, J. M.; DYE, C.; DEANE, L. M. Malaria infection rate of Amazonian primates increases with body weight and group size. *Functional Ecol.* 1991; 5(5): 655-662.
- DAY, K. P.; HAYWARD, R. E.; DYER, M. The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology.* 1998; 116 Suppl: S95-109.
- DEANE, L. M.; DAMASCENO, R. G.; AROUCK, R. Distribuição vertical de mosquitos em uma floresta dos arredores de Belém, Pará. *Folia Clin Biol.* 1953; 20(2): 101-110.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; FERREIRA NETO, J. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull WHO.* 1966; 35(5): 805-808.
- DEANE, L. M. Monkey malaria in Brazil. A summary of studies performed in 1964-1966. *Rev Brasil Biol.* 1967; 27: 213-228.
- DEANE, L. M.; DE ALMEIDA, F. B. Natural infection of red Howler-monkeys, *Alouatta seniculus straminea*, with *Plasmodium brasilianum*, in the State of Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1967; 9(5): 359-360.

- DEANE, L. M. Plasmodia of monkeys and malaria eradication in Brazil. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex)*. 1969; 11(2): 69-73.
- DEANE, L. M.; FERREIRA-NETO, J. A. Encontro do *Plasmodium brasilianum* em macacos do Território Federal do Amapá, Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 1969; 11: 199-202.
- DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; OKUMURA, M.; FERREIRA, M. O. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1969; 11(2): 71-86.
- DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; DEANE, S. P.; SILVEIRA, I. P. *Anopheles (Kerteszia) cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1970; 64(4): 647.
- DEANE, L. M. Epidemiology of simian malaria in the American continent. *Panamer Hlth Org Scientific Publ*. 1976; (317): 144-163.
- DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87(Suppl.III): 1-20.
- DE ARRUDA, M. E. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985; 68(3): 367- 369.
- DE ARRUDA, M.; CARVALHO, M. B.; NUSSENZWEIG, R. S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A. W.; COCHRANE, A. H. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35(5): 873-881.
- DE ARRUDA, M. E.; NARDIN, E. H.; NUSSENZWEIG, R. S.; COCHRANE, A. H. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 41(4): 379-385.
- DUARTE, A. M.; PORTO, M. A.; CURADO, I.; MALAFRONTTE, R. S.; HOFFMANN, E. H.; et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against bloodfords of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol*. 2006; 35(2): 87-96.
- DUARTE, A. M.; MALAFRONTTE, R. S.; CERUTTI, C. Jr.; CURADO, I.; et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008; 107(2): 179-185.
- DUDLEY, R.; MILTON, K. Parasite deterrence and the energetic costs of slapping in howler monkeys, *Alouatta palliata*. *J Mammal*. 1990; 71: 463-465
- DUNN, F. L. On the antiquity of malaria in the western hemisphere. *Hum Biol*. 1965; 37(4): 385-393.
- DUVAL, L.; ARIEY, F. Ape *Plasmodium* parasites as a source of human outbreaks. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(6): 528-532.

- EICHNER, M.; DIEBNER, H. H.; MOLINEAUX, L.; COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M.; DIETZ, K. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malaria therapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(5): 497-501.
- EMMONS, L. H.; FEER, F. Neotropical Rainforest Mammals: A field guide. 2<sup>nd</sup> ed. Chicago, The University of Chicago Press, 1997.
- ESCALANTE, A. A.; AYALA, F. J. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(24): 11373-11377.
- ESCALANTE, A. A.; BARRIO, E.; AYALA, F. J. Evolutionary origin of human and primate malarias: Evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol.* 1995; 12(4): 616-626.
- EYLES, D. E.; COATNEY, G. R.; GETZ, M. E. Vivax-type malaria parasite of macaques transmission to man. *Science.* 1960; 131(3416): 1812-1813.
- FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology.* 2000; 120(1): 11-21.
- FERRARI, S. F.; SENA, L.; SCHNEIDER, M. P. AND SILVA JR, J. S.. "Rondon's Marmoset, *Mico rondoni* sp. n., from Southwestern Brazilian Amazonia". *Int J Primatol.* 2010; 31(5): 693-714.
- FONSECA, F. Plasmódio de primatas do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1951; 49: 543-551.
- FORATTINI, O. P. *Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia.* Vol. 2. São Paulo: EDUSP, 2002, 860p.
- GARCIA, J.; BRAZA, F. Activity rhythms and use of space of a group of *Aotus azarae* in Bolivia during the rainy season. *Primates.* 1987; 28(3): 337-342
- GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002; 419(6906): 498-511.
- GARNHAM, P. C. C. *Malaria parasites and other heamosporidia.* Blackwell Scientific, Oxford 1966.
- GARNHAM, P. C. C. Relapses in malaria. *Cahiers ORSTOM Séries Entomologie Médicale et Parasitologie.* 1980; 18:103-106
- GALLAND, G. G. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. *ILAR J.* 2000; 41(1):37-43.
- GILLES, H. M. The malaria parasites. In: Gilles HM, Warrell DA (Eds). *Bruce-Chwatt's Essential Malariology.* 3rd Edition, London, Edward Arnold 1993: 12-34.

- GOLDMAN, I. F.; QARI, S. H.; MILLET, P. G.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 57(1): 177-180.
- GOMAN, M.; MONS, B.; SCAIFE J. The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSUrRNA gene and its comparison to other plasmodial SSUrRNA genes. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 45(2): 281-288.
- GONDER, R.; VON BERENBERG-GOSSLER, H. Untersuchungen ueber Malaria plasmodien der affen. *Malaria Intern Archiv*. (Leipzig). 1908; 1: 47-50.
- GRASSI, B.; FELETTI, R. Parasites malariques chez lês oiseaux. *Arch Ital Biol*. 1890; 13: 297-300.
- GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, A. D.; KYLE, D. E.; KAPPE, S. H. I.; et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 2008; 118(4): 1266-1276.
- GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002; 33(4): 330-342.
- GUIMARÃES, L. O.; BAJAY, M. M.; WUNDERLICH, G.; BUENO, M. G.; et al. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop*. 2012; 124(1): 27-32.
- HAYAKAWA, T.; ARISUE, N.; UDONO, T.; HIRAI, H.; SATTABONGKOT, J.; et al. Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees. *PLOS One*. 2009; 4(10): e7412.
- HEDDINI, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. *Int J Parasitol*. 2002; 32(13): 1587-1598.
- HERSHKOVITZ, P. A preliminary taxonomic review of the South American bearded saki monkeys genus *Chiropotes* (Cebidae, Platyrrhini), with the description of a new subspecies. *Fieldiana Zool N S*. 1985; 27: 1-47.
- HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J*. 2011; 10:90-96.
- JEFFARES, D. C.; PAIN, A.; BERRY, A.; COX, A. V.; STALKER, J.; et al. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2007; 39(1): 120-125.
- KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(11): 1356-1362.
- KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. Endemic and epidemic diseases in Amazonia: malaria and other emerging diseases in riverine areas of the Madeira river. A school case. *Estud Av*. 2008; 22(64): 111-141.

- KATSURAGAWA, T. H.; CUNHA, R. P. A.; DE SOUZA, D. C. A.; GIL, L. H. S.; CRUZ, R. B.; et al. Malária e aspectos hematológicos em moradores da área de influência dos futuros reservatórios das hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau, Rondônia, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2009; 25(7): 1486-1492.
- KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; SILVA, A. A. E.; COSTA, J. D. N.; et al. The Dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *Plos One*. 2010; 5(2): 9245-9257.
- KLEIN, T. A.; LIMA, J. B.; TADA, M. S.; MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*. 1991a; 45(4): 463-470.
- KLEIN, T. A.; LIMA, J. B.; TADA, M. S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991b; 44(6): 598-603.
- KRIEF, S.; ESCALANTE, A. A.; PACHECO, M. A.; MUGISHA, L.; ANDRÉ, C.; et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS Pathog*. 2010; 6(2): e1000765.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985; 79(1): 1-11.
- LACERDA, M. V.; MOURÃO, M. P.; ALEXANDRE, M. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. M.; et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012; 11: 12-30.
- LAL, A. A.; DE LA CRUZ, V. F.; COLLINS, W. E.; CAMPBELL, G. H.; PROCELL, P. M.; MCCUTCHAN, T. F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? *J Biol Chem*. 1988; 263(12): 5495-5498.
- LANDAU, I.; CHABAUD, A. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. *Adv Parasitol*. 1994; 33: 49-90.
- LAVERAN, A. Note sur un nouveau parasite trouve dans le sang de plusieurs maladies atteints de fièvre palustre. *Bull Acad Med*. 1880; 9: 1235-1236.
- LECLERC, M. C.; HUGOT, J. P.; DURAND, P.; RENAUD, F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology*. 2004; 129(Pt 6): 677-684.
- LEE, C. E.; ADEEBA, K.; FREIGANG, G. Human *Plasmodium knowlesi* infections in Klang Valley, Peninsula Malaysia: a case series. *Med J Malaysia*. 2010; 65(1): 63-65.

- LI, J.; COLLINS, W. E.; WIRTZ, R. A.; RATHORE, D.; LAL, A.; MCCUTCHAN, T. F. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7(1): 35–42.
- LIU, Q.; ZHU, S.; MIZUNO, S.; KIMURA, M.; LIU, P.; ISOMURA, S.; WANG, X.; KAWAMOTO, F. 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*. 1998; 36(11): 3378-3381.
- LIU, W.; LI, Y.; LEARN, G. H.; RUDICELL, R. S.; et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010; 467(7314): 420-425.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DEANE, L. M. Simian Malaria at Two Sites in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90(3): 331-339.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LUZ, S. L. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon-II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91(6): 687-694.
- MCCUTCHAN, T. F.; DE LA CRUZ, V. F.; LAL, A. A.; GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H. J.; SOGIN, M. L. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988; 28(1): 63-68.
- MEHLOTRA, R. K.; LORRY, K.; KASTENS, W.; MILLER, S. M.; ALPERS, M. P.; BOCKARIE, M.; KAZURA, J. W.; ZIMMERMAN, P. A. Radom distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62(2): 225-231.
- MENDES, C.; DIAS F.; FIGUEIREDO, J.; MORA, V. G.; CANO, J.; DE SOUSA, B.; DO ROSÁRIO, V. E.; BENITO, A.; BERZOSA, P.; AREZ, A. P. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6): e1192.
- MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976; 295(6):302-304.
- MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002; 415(6872): 673-679.
- MILTON, K. *The Foraging Strategy of Howler Monkeys, a study in primate economics*. Columbia University Press, New York, 165pp. 1980.
- MOHAPATRA, P. K.; PRAKASH, A.; BHATTACHARYYA, D. R.; GOSWAMI, B. K.; AHMED, A.; SARMAH, B.; MAHANTA, J. Detection & molecular confirmation of a focus of *P. malariae* in Aranachal Pradesh, India. *Indian J Med Res*. 2008; 128(1): 52-56.

- MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2007; 23(6): 278-283.
- MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9(9): 555-566.
- NUNN, C. L.; HEYMANN, E. W. Malaria infection and host behavior: a comparative study of Neotropical primates. *Behav Ecol Sociobiol.* 2005; 59(1): 30-37.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TEVA, A.; DEANE, L. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43(1): 6-10.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil : an overview Review. *Mal J.* 2010; 9(1): 115-130.
- OLLOMO, B.; DURAND, P.; PRUGNOLLE, F.; DOUZERY, E.; ARNATHAU, C.; NKOGHE, D.; LEROY, E.; RENAUD, F. A new malaria agent in African hominids. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5): e1000446.
- OZWARA, H.; LANGERMANS, J. A.; MAAMUN, J.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; WEILER, H.; THOMAS, A. W. Experimental infection of the olive baboon (*Papio anubis*) with *Plasmodium knowlesi*: severe disease accompanied by cerebral involvement. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(2): 188-194.
- PARAENSE, W. L. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo endotélio. *Méd Cirúr Farmácia.* 1945; 108: 1-26.
- PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13): 1395-1405.
- PERKINS, S. L.; AUSTIN, C. C. Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: integrating morphology and molecules. *J Parasitol.* 2009; 95(2): 424-433.
- PORTER, J. A., JR.; JOHNSON, C. M.; DE SOUSA, L. Prevalence of malaria in Panamanian primates. *J Parasitol.* 1966; 52(4): 669-670.
- PORTER, J. A. JR.; YOUNG, M. D. The transfer of *Plasmodium falciparum* from man to the marmoset, *Saguinus geoffroyi*. *J Parasitol.* 1967; 53(4): 845-846.
- PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22(5): 430-435.
- RAYNER, J. C.; LIU, W.; PEETERS, M.; SHARP, P. M.; HAHN, B. H. A plethora of *Plasmodium* species in wild apes: a source of human infection? *Trends Parasitol.* 2011; 27(5): 222-229.

- RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; et al.  
Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duddy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(4): 575-581.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMIEER, R. A. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy – Chapter 2. In: *South American Primates*. New York: Springer. 2009. 564 pp.
- SCOPEL, K. K.; FONTES, C.J.; NUNES, A. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, E. M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2004; 90(1): 61-64.
- SERMWITTAYAWONG, N.; SINGH, B.; NISHIBUCHI, M.; SAWANGJAROEN, N.; VUDDHAKUL, V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malar J.* 2012; 11: 36-42.
- SIALA, E.; KHALFAOUI, M.; BOURATBINE, A.; HAMDI, S.; HILI, K.; AOUN, K. Relapse of *Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area. *Presse Med.* 2005; 34(5): 371-272.
- SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D. J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* 2004; 363(9414): 1017-1024.
- SINTON, J. A.; MULLIGAN, H. W. A critical review of the literature relating to the identification of the malarial parasites recorded from monkeys of the families Cercopithecidae and Colobidae. *Rec Malar Surv India.* 1932; 3: 357-380.
- SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K. N. 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.* 1993; 58(2):283-292.
- STEPHENS, J. W. W. A new malaria parasite of man. *Ann Trop Med Parasitol.* 1922; 16: 383-388.
- STURM, A.; AMIDO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006; 313: 1287-1290.
- TADEI, W. P.; THATCHER, D. B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2000; 42(2): 87-94.
- TALIAFERRO, W. H. Experimental studies on the malaria of monkeys. *Am J Epidemiol.* 1932; 16(2): 429-449.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8):1596-1599.
- TAZI, L.; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(1): 209-221.
- THOISY, B.; MICHEL, J. C.; VOGEL, I.; VIÉ, J. C. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. *J Parasitol.* 2000; 86(5): 1035-1040.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673-4680.
- TSUCHIDA, H.; YAMAGUCHI, K.; YAMAMOTO, S.; EBISAWA, I. Quartan malaria following splenectomy 36 years after infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31(1): 163-165.
- TUTEJA, R. Malaria - an overview. *FEBS J.* 2007; 274(18): 4670-4679.
- ULLREY, D. E. Nutrition and predisposition to infectious diseases. *J Zoo Wildlife Med.* 1993; 24(3): 304-314.
- VALKIUNAS, G. Avian malaria parasites and other haemosporidia, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2005.
- VINETZ, J. M.; LI, J.; MCCUTCHAN, T. F.; KASLOW, D. C. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N Engl J Med.* 1998; 338(6): 367-371.
- VOLNEY, B.; POULIQUEN, J. F.; THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Trop.* 2002; 82(1): 11-23.
- WARREN, M.; WHARTON, R. H. The vectors of simian malaria: identity, biology, and geographical distribution. *J Parasitol.* 1963; 49: 892-904.
- WATERS, A. P.; MCCUTCHAN, T. F. Partial sequence of the asexually expressed SU rRNA gene of *Plasmodium vivax*. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(5): 2135.
- WATERS, A. P.; HIGGINS, D. G.; MCCUTCHAN, T. F. Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Mol Biol Evol.* 1993; 10(4): 914-923.
- WELCH, W. H. Malaria: definition, synonyms, history, and parasitology; In Loomis and Thompson, Lea Bros. & Co., New York, Syst. Practice Med. 1897; 1: 17-76.
- WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Editorial Commentary. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2): 172-3.

- 
- WHO. World Malaria Report 2005. Prepared by Roll Back Malaria, World Health Organization, and UNICEF: Geneva, Switzerland, 2005.
- WHO. World malaria report 2011. Geneva, Switzerland 2011.
- WHO. World malaria report 2012. Geneva, Switzerland 2012.
- WOLFE, N. D.; KARESH, W. B.; KILBOURN, A. M.; COX-SINGH, J.; BOSI, E. J.; et al. The impact of ecological conditions on the prevalence of malaria among orangutans. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002; 2(2): 97-103.
- YAKOB, L.; BONSALE, M. B.; YAN, G. Modelling *knowlesi* malaria transmission in humans: vector preference and host competence. *Malar J.* 2010; 9: 329- 336.
- YAMASAKI, T.; DUARTE, A. M.; CURADO, I.; SUMMA, M. E.; NEVES, D. V.; WUNDERLICH, G.,; MALAFRONTTE, R. S. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forest, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol.* 2011; 40(6): 392-400.
- YOUNG, M. D.; BAERG, D. C. Experimental infections of *Plasmodium falciparum* in *Cebus capucinus* (white faced capuchin) monkeys. *Mil Med.* 1969; 134(10): 767-771.
- YOUNG, M. D. Natural and induced malarias in western hemisphere monkeys. *Lab Anim Care.* 1970; 20(2): 361-7.
- ZILVERSMIT, M.; PERKINS, S. *Plasmodium*. *Malaria Parasites.* 05 May 2008. Disponível em: <<http://tolweb.org/Plasmodium/68071/2008.05.05>>. Acesso em 12/02/2013.

## **ANEXOS**

**Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS**

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo projeto 2009/1 registrado sob no 2009/1 na folha 5 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade do Ms. Luiz Herman Soares Gil coordenador do projeto intitulado “Estudos sobre a malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Vale do Rio Madeira”, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 11 de setembro de 2009.

Porto Velho, 11 de setembro de 2009.

**Relatores:**

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

- Dra. Izaltina Silva Jardim

-Ms. Luiz Herman Soares Gil

## Anexo 2: Autorização para atividades com finalidade científica



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

<b>Número: 14081-3</b>	<b>Data da Emissão: 30/04/2010 15:37</b>
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Maise da Silva Araújo	CPF: 740.785.002-00
Título do Projeto: Estudos sobre a malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Vale do Rio Madeira – Porto Velho/Rondônia	
Nome da Instituição : Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais	CNPJ: 03.460.975/0001-90

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de sangue e xenodiagnóstico dos primatas do parque ecológico e área de São Antônio	03/2009	03/2011
2	Coleta de mosquitos vetores no parque ecológico e na área de São Antônio	03/2009	03/2011

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 a pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. 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.
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.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

## Outras ressalvas

1	Esta autorização não contempla a manutenção temporária em cativeiro de espécimes da Ordem Primates capturados in situ.
---	--

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Rafael Mesquita Bastos Cruz	Biólogo	730.429.602-00	577812 SSP-RO	
2	Marivaldo Rodrigues Figueiro	Veterinário	471.152.112-72	05985 cmv-RO	Brasileira
3	Luiz Hildebrando Pereira da Silva	parasitologista	026.767.888-68	1138048 ssp sp-SP	
4	CDR JESUS FERNANDES FONTES	Médico	199.889.476-34	M743181 SSP/MG-MG	Brasileira
5	Luiz Herman Soares Gil	entomologista	341.344.502-25	356263 ssp-RO	
6	Joana D'Arc Neves Costa	Biomédica	071.724.528-44	184485589 SSP/SP-SP	Brasileira
7	Marihué Rezende Messias	Mastozoologista	661.296.646-72	M4 584 137 SSP MG-MG	Brasileira
8	Mauro Shugiro Tada	Médico	457.869.251-53	6892377 ssp-SP	

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PORTO VELHO	RO	Parque Natural Municipal de Porto Velho	UC Municipal
2	PORTO VELHO	RO	Área de construção da Usina de São Antônio	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 99784695



Página 1/3

### Anexo 3: Licença permanente para coleta de material zoológico



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

#### Licença permanente para coleta de material zoológico

<b>Número: 17302-1</b>	<b>Data da Emissão: 16/08/2010 17:49</b>
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Mariluce Rezende Messias	CPF: 661.296.646-72
Nome da Instituição : Fundação Universidade Federal Rondônia	CNPJ: 04.418.943/0001-90

#### 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	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exige o seu titular 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.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	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.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	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 subsidiaram 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.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Outras ressalvas

1	- ressalvamos à solicitante que, pelo disposto no Inciso I do Artigo 12 da IN 154/07, a Licença Permanente não é válida para coleta/transporte de espécies que constem nas listas oficiais de animais ameaçados de extinção.
---	--

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Cebidae, Pitheciidae, Amphisbaenidae, Boidae, Colubridae, Elapidae, Gekkonidae, Gymnophthalmidae, Iguanidae, Lacertidae, Loxocemidae, Scincidae, Teiidae, Tropiduridae, Callithrichidae, Viperidae, Aotidae, Atelidae
2	ORDEM	Caudata, Anura, Gymnophiona
3		

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Fundação Universidade Federal Rondônia	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) 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: 73117242**



Página 1/2

**Anexo 4: Parecer Consubstanciado do CEP**

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL - CEPEM

**PROJETO DE PESQUISA****Título:** ESTUDOS SOBRE A MALÁRIA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS E SUA RELAÇÃO COM A MALÁRIA HUMANA NO VALE DO RIO MADEIRA, PORTO VELHO/RONDÔNIA**Área Temática:****Pesquisador:** Maisa da Silva Araújo**Versão:** 1**Instituição:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ NOROESTE**CAAE:** 05373012.6.0000.0011**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****Número do Parecer:** 77561**Data da Relatoria:** 10/08/2012**Apresentação do Projeto:**

O presente projeto pretende estudar a correlação genética entre as cepas de plasmódio infectando primatas não humanos e a população humana local. Indicando o importante fator ainda não bem estudado do papel de primatas não humanos como reservatório zoonótico.

O *P. brasilianum* e o *P. simium* são muito diferentes, mas ambos são infectantes ao homem. Sendo o primeiro idêntico ao *P. malarie* responsável por infecções em humanos e o *P. simium* com o *P. vivax*, responsável pela maior parte de infecções em humanos, são indistinguíveis morfológicamente e molecularmente.

O reaparecimento repentino do *P. malarie* na região Amazônica, sugere ser resultado do contato do homem com primatas não humanos, principalmente populações indígenas, pessoas ligadas às indústrias madeiras, garimpo e pesca. Esta especulação tem relevância importante no controle da doença, pois levanta a hipótese de que primatas não humanos são possíveis reservatórios de malária humana.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar a malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Vale do Rio Madeira, Porto Velho-RO

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O presente projeto não apresenta risco, pois as amostras humanas já foram obtidas dos pacientes pelos projetos anteriores

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto tem extrema relevância para o controle da doença, respeitando a ética em pesquisa uma vez que as amostras humanas que serão utilizadas são de projetos já aprovados pelo CEP/CEPEM com previsão para estudos posteriores.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação encontram-se dentro da resolução 196/96

**Recomendações:**

Todos os pesquisadores responsáveis pelas amostras devem regularizar sua situação quanto ao biorrepositório conforme a resolução 441/2011.

**Anexo 5:** Alinhamento completo das sequências obtidas de *P. brasilianum* de primatas foram comparadas com sequências de referência para espécies depositadas no *GenBank*.

		10	20	30	40	50	60
Pm Uganda 1		ATAttaaaaattggttgagttataaacgCTCGTAGTTGAATTTCAAGGAATCAATATTTTAA					
Pm PNG		---.....					
Pb		---.....					
S39		T.....					
S69		T.....					
S141		TTA.....					
Pf		ATAttaaaaattggttgagttataaacg.....A.....G.....-					
Pv		ATAttaaaaattggttgagttataaacg.....A.....G.....A					
		70	80	90	100	110	120
Pm Uganda 1		GTAATGCTTTGTATATTTATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGCCAAGGCTTATAT					
Pm PNG		.....A.....A.....CG.....					
Pb		.....A.....A.....CG.....					
S39		.....A.....C.....A.....CG.....					
S69		.....A.....A.....CG.....					
S141		.....A.....A.....CG.....					
Pf		-----TAACTATT-----CTAGGGGAAC.AT					
Pv		GCAACGCT.CT-----AGCTTA---A-----TCCACATAAC.GA					
		130	140	150	160	170	180
Pm Uganda 1		TTTTTCTGTTACATTTTGTATTTTATTAATATATATATGCGTTCTTATTATAAAAATGATTC					
Pm PNG		.....					
Pb		.....					
S39		.....					
S69		.....					
S141		.....					
Pf		...AG..T..GGCT..AA.ACGC..CC.C..TAT.AT...TAA...C..A.....					
Pv		.AC...GTA.CGAC....GCGCA.TT.GCTAT...GT...T.A..T.....					
		190	200	210	220	230	240
Pm Uganda 1		TTTTTAAAATTCTTTTGTATAATTTTATGTCATGGAATTTTGTACTTTGAGTAAATT					
Pm PNG		.....					
Pb		.....					
S39		.....					
S69		.....					
S141		.....					
Pf		.....C.CCACT.T.GC...GCT.TTT...G.....					
Pv		.....GGACT..C.T.GC-----CGGCTTG.AAGTCC.....					
		250	260	270	280	290	300
Pm Uganda 1		AGAGTGTTCAAAGCAAACAGTTAAAACAGTTTCTGTGTTTGAATACTACAGCATGGAATA					
Pm PNG		.....					
Pb		.....					
S39		.....					
S69		.....					
S141		.....					
Pf		.....G..T..A.....T.....					
Pv		.....A..T.G..-..G.GCC.....					

		310	320	330	340	350	360
Pm Uganda 1		ACAAAATGAACAAGTCAGAAGTTT--GTTCTTTTTTCTTATTTTGGCTTAGTTACGATT					
Pm PNG		.....	T..--	.....			
Pb		.....	T..--	.....			
S39		.....	T..--	.....			
S69		.....	T..--	.....			
S141		.....	T..--	.....			
Pf		.....	CT.A..T..TT	.....			
Pv		.....	-.....T..T-C	.....			
		370	380	390	400	410	420
Pm Uganda 1		AATAGGAGTAGCTTGGGGGCATTTGTATTTCAGATGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTTC					
Pm PNG		.....					
Pb		.....					
S39		.....					
S69		.....					
S141		.....					
Pf		.....	A..C	.....			
Pv		.....					
		430	440	450	460	470	480
Pm Uganda 1		TGGAGACAAGCAACTGCGAAAGCATATGCCTAAAATACTTCCATTAATCAAGAACGAAAG					
Pm PNG		.....	T	.....			
Pb		.....	T	.....			
S39		.....	T	.....			
S69		.....	T	.....			
S141		.....	T	.....			
Pf		.....	G.A	.....	T..T	.....	
Pv		.....	A	.....	T	.....	
		490	500	510	520	530	540
Pm Uganda 1		TTAAGGGAGTGAAGACGATCAGATACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG					
Pm PNG		.....					
Pb		.....					
S39		.....					
S69		.....					
S141		.....					G
Pf		.....					
Pv		.....					A
		550	560	570	580	590	600
Pm Uganda 1		GTGTTGGATGATAGTGTAATAAATAAAGAGACATTCTTATATATGAGTGTTCCTTTTAG					
Pm PNG		.....	A	.....	A	.....	
Pb		.....	A	.....	G..A	.....	
S39		.....	A	.....	G..A..G	.....	
S69		.....	A	.....	G..A	.....	
S141		.....	A	.....	G..A	.....	
Pf		.....	A..T	.....	-----C..C.T.CGAG..GA..T	.....	
Pv		.....	CT	.....	A..AT..TT	.....	G.A-----T..C.C.TC.GAGT..AT.C

	610	620	630	640	650	660
Pm Uganda 1	ATAGCTTCCTTCAGTACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGCGAGTATTCG					
Pm PNG	.....					
Pb	.....					
S39	C.....					
S69	.....					
S141	C.....					
Pf	.T.....					
Pv	.T.....G.....					

	670	680	690	700	710	720
Pm Uganda 1	CGCAAGCGAGAAAGTTAAAAGAACCGACGGAAGGGGAC--ACAGGCGTGGAGCTTGCGGC					
Pm PNG	.....TT.....CA.....					
Pb	.....TT.....CA.....					
S39	.....TT.....CA.....					
S69	.....TT.....CA.....					
S141	.....G.TT.....CA.....					
Pf	.....TT.....CA.....					
Pv	.....TT--.....CA.....					

	730	740	750	760	770	780
Pm Uganda 1	TTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACTAGTTTAAGACAAGAGTAGGATTGACAGATT					
Pm PNG	.....					T
Pb	.....					T
S39	.....					A
S69	.....					A
S141	.....					A
Pf	.....					T
Pv	.....A.....					T