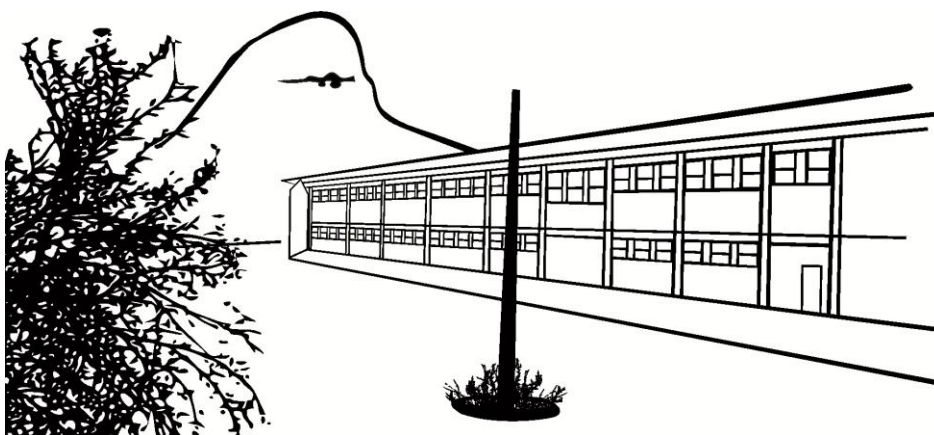


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
CINTIA FURIERI

**PESQUISA DE DNA DE *PLASMODIUM* EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SÍMIOS
MORTOS**



VITÓRIA

2020

CINTIA FURIERI

**PESQUISA DE DNA DE *PLASMODIUM* EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE SÍMIOS
MORTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo , como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior
Coorientadora: Profa. Dra. Blima Fux

VITÓRIA

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F984p FURIERI, CINTIA, 1980-
Pesquisa de DNA de Plasmodium em amostras de fígado de
símios mortos / CINTIA FURIERI. - 2020.
89 f. : il.

Orientador: Crispim Cerutti Junior.

Coorientadora: Blima Fux.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Pesquisa. 2. DNA. 3. Malária. 4. Macacos. I. Cerutti
Junior, Crispim. II. Fux, Blima. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

O(a) mestrando(a) Cintia Furieri apresentou a dissertação intitulada “Pesquisa de DNA de *Plasmodium* em amostras de fígado de símios mortos” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu aprovar () reprovando a dissertação habilitando Cintia Furieri a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 07 de abril de 2020.

Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Externo

Profa. Dra. Monalessa Fábila Pereira
Universidade do Estado de Minas Gerais – Titular Externo

DEDICATÓRIA

A Deus, força motriz que move tudo e todas as coisas, o grande incentivador por trás de todas as conquistas, quaisquer que sejam elas. Nossas mentes e corações dão vida às sementes de nossos sonhos, mas Deus é a água e a terra que os nutre e alimenta, fazendo-os germinar e crescer fortes.

A minha família. Se Deus é força motriz, a família é o pilar de sustentação que nos ampara, nos mantendo fortes e firmes diante dos desafios e dificuldades que nos cercam. Nada em minha vida seria possível sem o apoio da minha perfeita família imperfeita.

A minha filha Sophia. Sophia é a luz e o brilho capazes de iluminar qualquer escuridão. Ela é fonte constante de riso, felicidade e orgulho. Ser mãe é, com certeza absoluta, a coisa mais desafiadora que qualquer mulher pode se dispor a fazer em sua vida, mas eu não abriria mão disso por nada nesse mundo.

A meu marido Weglton. Seu apoio incondicional e seu amor me mantiveram firme e segura nos momentos difíceis e escuros. Eu o amo desde os meus distantes 14 anos de idade e espero que permaneçamos sempre juntos.

Obrigada a todos!

“ Se você deseja mudar o mundo, vá para casa e ame sua família.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior, por toda paciência e dedicação que demonstrou ao conviver comigo e me orientar durante esses dois anos passados. Eu cheguei até ele como uma estudante inexperiente e sei que fui um desafio em muitos momentos. Não existem muitas palavras que eu possa usar para descrever o quanto me sinto grata por toda orientação e sabedoria que ele me transmitiu.

À Prof. Blima Fux, pela amizade e dedicação, pelas aulas incríveis e inspiradoras, por todo carinho que ela dedicou a mim.

À Dra Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte. Eu ainda não acredito na recepção generosa e carinhosa que ela me dedicou quando estive sob seus cuidados no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Obrigada Ana, pelo passeio na Av. Paulista e na Livraria Cultura, pela pizza e por todo conhecimento compartilhado.

A toda a equipe do Laboratório de Protozoologia do IMT/USP, em especial a Fabi, pela paciência infinita e pelos rios de conhecimentos que vocês me passaram com tanto carinho.

Aos amigos que fiz na UFES. Quer sejam mestrandos ou doutorandos, vocês foram espelhos das minhas próprias dúvidas e medos, assim como das minhas alegrias e vitórias. Obrigada pelas risadas, pelos lanches corridos e todas as mensagens de apoio.

Às amigas irmãs da Toca dos Livros. Vocês foram alento e calma quando meus dias eram cheios de loucura e estresse. Há um pouco de vocês em cada palavra dessa dissertação.

A minha melhor amiga, Karina, que souou, se estressou, se indignou e se alegrou comigo em quase todos os dias nos últimos dois anos enquanto esse trabalho se formava. Sua amizade e paciência foram fundamentais para que eu não enlouquesse durante esse período.

A minha irmã Elaine, que tanto me apoiou e ajudou em todos os dias de minha vida. Você é a melhor irmã, tia e madrinha que qualquer pessoa poderia ter.

À CAPES, pelo apoio financeiro, sem o qual essa dissertação nunca teria sido possível.

Muito obrigada a todos!

Combati o bom combate.

Terminei a corrida.

Mantive a fé.

Timóteo 2, 4:7

“Sempre me sinto feliz, sabes por quê?

Porque não espero nada de ninguém, esperar sempre doi.

Os problemas não são eternos, sempre têm solução, o único que não se resolve é a
morte.

A vida é curta, por isso ame-a.

Viva intensamente e recorde.

Antes de falar, escute.

Antes de escrever, pense.

Antes de criticar, examine.

Antes de ferir, sinta.

Antes de orar, perdoe.

Antes de gastar, ganhe.

Antes de se render, tente de novo.

Antes de morrer, viva”.

William Shakespeare

RESUMO

Furieri C. ***Pesquisa de DNA de Plasmodium em amostras de fígado de símios mortos***. Dissertação (Mestrado). Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2020. 88 p.

A malária é um dos principais problemas de saúde pública mundial. Apesar de notória pela distribuição de casos na região Amazônica, nas florestas densas do sudeste brasileiro é sabidamente endêmica e, nessas áreas, a infecção é denominada malária residual de sistemas de Mata Atlântica. Nessa região, também é comprovada a presença de malária símia. Dada a possibilidade da doença ser uma zoonose nesse contexto, é necessário compreender a sua dinâmica nas populações de primatas não-humanos, para que se possa prever o risco zoonótico. Além disso, a transferência do *Plasmodium* entre os símios e os seres humanos merece ser investigada. O objetivo desse trabalho foi identificar a presença de DNA de *Plasmodium* em amostras de fígado de símios mortos pela febre amarela nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo. A última epizootia de febre amarela registrada no estado resultou na morte de muitos símios. Tal fato possibilitou a coleta de fragmentos de fígado dos corpos dos primatas não humanos que puderam ser localizados. Por meio da extração de DNA dessas amostras e amplificação por RT-qPCR, foi investigada a presença de DNA de *Plasmodium spp.* Foram analisados 70 fragmentos de fígado de símios oriundos dos municípios de Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins, Santa Teresa, Marechal Floriano, Vila Velha, Sooretama, São Mateus, Afonso Cláudio e Itaguaçu, no estado do Espírito Santo, e de Caratinga, em Minas Gerais. Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial da empresa Qiagen (*DNeasy Blood and Tissue Kit*), segundo protocolo do fabricante (*Spin-Column Protocol*). A amplificação por PCR realizada foi quantitativa em tempo real (*RT-qPCR*) no sistema *Taqman*. Os experimentos foram conduzidos no Instituto de Medicina Tropical, na Universidade de São Paulo (IMT-USP), em colaboração técnica com a equipe do Laboratório de Protozoologia. Nas 70 amostras de fígado analisadas, foi verificada uma frequência de 15 positivas (21,43%): sete para *Plasmodium falciparum*, quatro para *Plasmodium malariae*, uma para *Plasmodium vivax*, uma para *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* concomitantemente e duas para o gênero *Plasmodium*. Das amostras positivas,

cinco foram coletadas de símios encontrados em Domingos Martins, quatro em Santa Maria de Jetibá, uma em Santa Teresa, uma em Marechal Floriano, uma em Caratinga/MG e três em localizações desconhecidas. Com relação à espécie dos símios cujos fragmentos foram positivos, todos eram *Alouatta guariba*. Dada a importância dos símios como hospedeiros de doenças zoonóticas e sua atuação como reservatório de várias doenças infecciosas emergentes, a comprovação da presença de *Plasmodium spp.* neles pode indicar um papel para as populações de primatas não-humanos na manutenção da transmissão da malária em regiões próximas de áreas de Mata Atlântica.

Palavras-chave: Malária; DNA; *Plasmodium*; primatas.

ABSTRACT

Malaria is a major global public health problem. Although notorious for the distribution of cases in the Amazon region, it is also known to be endemic in the dense forests of southeastern Brazil. The infection is called residual malaria from Atlantic Forest systems in these areas. In the region as a whole, the presence of simian malaria is also proven. Given the possibility of the disease being a zoonosis in these regions, it is necessary to understand its behavior in non-human primate populations, in order to predict the zoonotic risk. In addition, the transfer of *Plasmodium* between apes and humans deserves to be investigated. The objective of this work was to identify the presence of *Plasmodium* DNA in liver samples from apes killed by yellow fever in the municipalities of the mountainous region of Espírito Santo. The last epidemic of yellow fever recorded in Espírito Santo resulted in the death of many apes. This enabled the collection of liver fragments from the bodies of non-human primates that could be located. DNA of *Plasmodium* spp. was extracted from these samples and amplified by RT-qPCR. Seventy liver fragments of apes from the municipalities of Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins, Santa Teresa, Marechal Floriano, Vila Velha, Sooretama, São Mateus, Afonso Cláudio and Itaguaçu, in the state of Espírito Santo, and from Caratinga, in Minas Gerais, were analyzed. The commercial kit of the company Qiagen (*DNeasy Blood and Tissue Kit*) was used for the extraction of DNA, according to the manufacturer's protocol (*Spin-Column Protocol*). PCR amplification was performed in real time quantitative (*RT-qPCR*) in the Taqman system. The experiments were conducted at the Institute of Tropical Medicine, at the University of São Paulo (IMT-USP), in technical collaboration with the team at the Protozoology Laboratory. Of the 70 liver samples analyzed, a frequency of 15 positive samples (21.43%) was found: seven for *Plasmodium falciparum*, four for *Plasmodium malariae*, one for *Plasmodium vivax*, one for *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* concomitantly and two for the *Plasmodium* genus. Of the positive samples, five were collected from apes found in Domingos Martins, four in Santa Maria de Jetibá, one in Santa Teresa, one in Marechal Floriano, one in Caratinga/MG and three in unknown locations. Regarding the species of apes whose fragments were positive, all were of the species *Alouatta guariba*. Given the importance of apes as hosts for zoonotic diseases and their role as a reservoir for several emerging infectious diseases, the evidence of the presence of *Plasmodium* spp. Infecting these

apes can indicate the possible role of non-human primate populations in maintaining malaria transmission in regions close to areas of the Atlantic Forest.

Keywords: Malaria; DNA; *Plasmodium*; primates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do gênero <i>Plasmodium</i> no homem e no vetor.....	23
Figura 2 - Risco de transmissão da malária no Brasil em 2018.....	28
Figura 3 - Municípios participantes do estudo, localizados na região serrana do estado do Espírito Santo.	43
Figura 4 - O município de Caratinga, no estado de Minas Gerais.	45
Figura 5 - Sistema Step One Plus utilizado nas reações de RT-qPCR, no Laboratório de Protozoologia do IMT/USP.	49
Figura 6 - Representação gráfica da distribuição das amostras de fígado coletadas de símios mortos por febre amarela nos anos de 2014 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG de acordo com a sua procedência.	56
Figura 7 - Casos de malária autóctone residual no estado do Espírito Santo nos anos de 2014 a 2019.....	61
Figura 8 - Ocorrência da malária símia, segundo positividade das amostras de fígado dos símios mortos coletados nos municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG e os casos de malária autóctone residual registrados no Espírito Santo de 2014 a 2019.....	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das amostras de fígado por espécie de símio morto por febre amarela nos anos de 2016 a 2018, obtidos em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG.....52
- Tabela 2** - Distribuição das amostras de fígado de símios mortos por febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG de acordo com a sua procedência.53
- Tabela 3** - Resultados encontrados nas amostras de fígado obtidas de símios mortos por febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do ES e em Caratinga/MG.....54
- Tabela 4** - Municípios do Espírito Santo com casos registrados de malária autóctone residual nos anos de 2014 a 2019 e com amostras de fígado positivas para DNA de Plasmodium.....62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: “Primers” e sondas utilizadas para amplificação de 18S ssrRNA de *Plasmodium* em amostras de DNA obtido de fígado de símios por RT-qPCR no sistema TaqMan.....**49**

Quadro 2: “Primers” utilizados para amplificação de fragmentos de citocromo b de *Plasmodium* em amostras de DNA obtido de fígado de símios por PCR convencional *nested*.....**50**

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Detalhamento das amostras positivas para DNA de *Plasmodium* obtidas de símios mortos por surto de febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG, incluindo frequência relativa (FR) por município.....**55**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CEM - Campanha de Erradicação da Malária

Cyb – Cytochrome b

CSP - Circumsporozoite protein

DARC - Duffy antigen receptor for chemokines

DDT - Diclorodifeniltricloreto

DNA - Deoxyribonucleic acid

EUA - Estados Unidos da América

FA - Febre Amarela

FR - Frequência Relativa

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgM - Imunoglobulina da classe M

IgG - Imunoglobulina da classe G

IMT - Instituto de Medicina Tropical

Kb - kilobase

Mb - Megabase

MG - Minas Gerais

Msp-1 - Malaria merozoite surface protein

OMS - Organização Mundial de Saúde

PIACM - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

PfEMP1 - *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1

RPPN - Reserva Particular de Patrimônio Natural

RT-qPCR - Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time

SNP - Single nucleotide polymorphism

SUS - Sistema Único de Saúde

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações Históricas Sobre a Malária	18
1.2 O <i>Plasmodium</i>.....	21
1.3 Quadro Clínico	24
1.4 A Epidemiologia da Malária	26
1.5 A Malária Símia	28
1.6 A Malária como Zoonose	31
1.7 O Genoma do <i>Plasmodium</i> e as Técnicas de Diagnóstico Molecular.....	35
1.8 One Health.....	36
1.9 A Febre Amarela e o Surto de 2016 a 2018.....	37
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Área de Estudo	42
4.1.1 O Estado do Espírito Santo.....	42
4.1.2 O Estado De Minas Gerais.....	43
4.2 Amostragem	45
4.3 Comunicação, Transporte e Acondicionamento das Amostras	46
4.4 Diagnóstico Molecular.....	46
4.4.1 Extração de DNA de <i>Plasmodium</i>	46
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) para a detecção de <i>Plasmodium</i>	48
4.5 Considerações Éticas.....	51

4.6 Análise Dos Dados	51
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9. ANEXO.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS SOBRE A MALÁRIA

Apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A doença foi primeiramente citada na era pré-Cristã, por Hipócrates, que descreveu suas características de ocorrência sazonal e sua febre com padrão paroxístico e intermitente, associando-a com o meio ambiente e afirmando que os casos ocorriam com mais frequência em regiões pantanosas^{1,2}. A relação entre malária e água parada é, portanto, muito antiga, anterior ao conhecimento de que a doença é transmitida por mosquitos: os romanos já realizavam esse controle nos arredores de Roma, por meio da drenagem dos pântanos. O termo paludismo, uma denominação antiga da malária, vem do latim *palus*, que significa água parada ou pântano, e foi criado pelos franceses³. Personagens históricos importantes sofreram com o que hoje se acredita tratar-se de malária, como Santo Agostinho e Dante Alighieri, falecidos em 597 e 1321, respectivamente².

Historicamente, a infecção malárica foi amplamente relatada ao redor do mundo, ocorrendo na Inglaterra, na Holanda, na Alemanha, em grande parte da Europa e Ásia, na Índia, na China e em quase todos os países das Américas, incluindo grandes porções dos Estados Unidos da América (EUA)⁴. Segundo relatos, durante a guerra civil norte-americana, a posse de quinino pelas tropas foi essencial, já que o seu uso garantiu que muitos soldados não sucumbissem à infecção⁵.

Considerada incurável no passado, muitos pesquisadores buscaram suas causas, ainda que por motivos diferentes. Franceses e britânicos viam a malária como uma doença tropical que assolava suas colônias ao redor do mundo, diminuindo seus lucros econômicos. Para os italianos, ao contrário, a doença era considerada endêmica, um flagelo que atingia seu país e impedia o desenvolvimento de muitas áreas que poderiam ser prósperas⁶.

No Brasil, a doença cobria grande parte do território até a década de 1940. Era um desafio frente à colonização, não somente na região Amazônica, mas em áreas litorâneas, principalmente da região Sudeste. Na ausência de registros confiáveis, estimava-se que o número de casos era de aproximadamente quatro a cinco

milhões por ano⁷. As ações de combate à malária eram, no início, restritas às áreas limítrofes das capitais dos estados brasileiros afetados pela doença, às cidades de maior importância e às instalações militares, já que o Brasil entrara na segunda Guerra Mundial e era de extrema importância manter os soldados saudáveis e livres da infecção malárica⁸.

As estratégias de erradicação implementadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e adotadas pela CEM (Campanha de Erradicação da Malária) nos anos seguintes, baseadas no uso de inseticidas de ação residual, como por exemplo, o DDT e das novas drogas antimaláricas, foram extremamente efetivas, conseguindo eliminar a malária de extensas e significativas áreas do Brasil, principalmente das áreas litorâneas afetadas⁶.

Nos primeiros anos da década de 60, os casos de malária caíram drasticamente para cerca de 40 mil por ano, reunidos na região Amazônica. Durante muito tempo, tentou-se aplicar, nessa região, as mesmas ações que foram efetivas em outras áreas do território brasileiro. No entanto, a extensão do território, as dificuldades de acesso e o tipo das habitações precárias e sem superfícies borrifáveis as tornaram muito menos efetivas⁹. Além disso, a presença de floresta tropical úmida, favorável à proliferação dos vetores da doença, o início da resistência do *P. falciparum* à droga cloroquina, grupos de pessoas particularmente exposta aos vetores (garimpeiros, madeireiros e agricultores) e serviços de saúde precários e insuficientes contribuíram para reduzir a eficácia das medidas de controle^{9,10}.

Nos anos posteriores, a política de desenvolvimento e ocupação da região Amazônica estabeleceu um grande deslocamento migratório de pessoas, principalmente das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país, a maioria sem qualquer imunidade adquirida contra a malária. Entre 1970 e 1980, mais de um milhão de pessoas migraram para áreas que compunham a região Amazônica¹¹. Deane¹² afirmou, em 1985, em debate realizado no Centro de Estudos da Escola Nacional de Saúde Pública, que a ecologia humana nessa região, ou seja, a imigração desordenada e quase incontrolável que ocorreu ali, seria um fator determinante para o número elevado e constante de casos de malária¹². Em 1990, foram registrados, no Brasil, cerca de 500.000 casos da infecção malárica, o que representou um novo crescimento no número de ocorrências da doença¹³.

Em 1992, ocorreu, em Amsterdã, a Conferência Interministerial da OMS, que estabeleceu, como principal meta, prevenir a mortalidade e reduzir a gravidade da malária. Um plano de ação mundial foi anunciado com elementos que visavam a mudar, profunda e globalmente, as estratégias de controle da doença¹⁴. Essa mudança global ocorreu concomitantemente à implantação do controle das endemias no Sistema Único de Saúde (SUS), com ações que seriam realizadas pelo Governo Federal e por todas as Unidades Federativas brasileiras, assim como por seus municípios¹⁵.

Apesar dos esforços empregados, o número de casos de malária voltou a subir em 1999, com um aumento de 35% em relação àqueles registrados no ano anterior. Desses, 99,7% foram registrados nos estados que compõem a Amazônia legal¹⁰. O Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) foi elaborado, então, por técnicos do que hoje é a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, bem como por professores e pesquisadores em doenças tropicais das principais instituições brasileiras¹⁶. O lançamento desse plano de ação contou com a participação do Presidente da República, de ministros, de governadores e de secretários estaduais de saúde, o que demonstrou que o controle da malária precisaria de ações conjuntas dos mais diversos níveis dos setores político, social e econômico¹³.

A partir do PIACM, os estados e municípios puderam contar com o apoio de uma equipe externa técnica e capacitada em suas ações de controle da malária. Acredita-se que a implementação do PIACM impulsionou a descentralização das ações de Vigilância em Saúde que se veria posteriormente¹⁷.

As estratégias de controle da transmissão da malária precisam reconhecer que a doença é causa importante de morbidade e mortalidade. Geralmente, essas estratégias envolvem tratamento apropriado do paciente e controle vetorial, que, aplicados juntos e adequadamente, têm impacto fundamental na morbidade e mortalidade da doença e podem ser eficazes na maioria das condições epidemiológicas. É necessário que haja também a atuação de uma equipe multiprofissional, com alto nível de conhecimento em epidemiologia e controle de vetores, assim como em mapeamento, planejamento e comunicação, para coordenar as ações de controle da infecção⁵.

1.2 O PLASMODIUM

A malária é causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium* e é transmitida de uma pessoa para a outra por meio da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*¹⁸. A transmissão indireta também é possível, por seringas compartilhadas ou por transfusão de sangue de um doador infectado^{19,20}.

Mais de 250 espécies de *Plasmodium* já foram descritas parasitando répteis, aves e mamíferos, sendo que 26 espécies parasitam primatas não humanos^{21,22}. Atualmente, existem cinco espécies que parasitam naturalmente humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. A infecção em humanos por esse último foi confirmada em 2004^{23,24}. Evidências recentes classificam o *P. ovale* em duas espécies, o *P. ovale walikeri* e o *P. ovale curtisi*. Diferenciadas por seis genes, ambas circulam na África e na Ásia e não conseguem se recombinar geneticamente^{25,26}.

A evolução da malária baseia-se em uma transição mosquito-humano-mosquito quase perfeita e, apesar do impacto que é visto em um indivíduo, em um país ou mesmo em todo o mundo, o que mais se vê, frequentemente, são pacientes com pouca ou nenhuma manifestação clínica. Outro ponto importante a ser citado é que o *Plasmodium* sofreu milhares de anos de evolução, exposto a barreiras físicas, imunológicas e, mais recentemente, quimioterápicas, em mosquitos e humanos, o que garantiu uma enorme pressão de seleção sobre esses parasitos²⁷.

A infecção começa quando uma pessoa é picada por mosquitos *Anopheles* fêmeas infectados e o parasito é então inoculado na corrente sanguínea na forma de esporozoítos, formas infectantes e móveis, que se deslocam para o fígado, onde vão se multiplicar assexuadamente por aproximadamente sete a quinze dias, sem que a pessoa infectada manifeste qualquer sintoma^{28,29}. Essa fase é chamada de ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual e é nela em que ocorre, em *P. vivax* e *P. ovale*, o desenvolvimento lento e diferenciado de alguns esporozoítos, que dão origem aos hipnozoítos, formas latentes do protozoário responsáveis pelas recaídas observadas meses ou até mesmo anos depois²⁹. Ainda no fígado, os esporozoítos se tornam trofozoítos e estes, após várias divisões por esquizogonia, se diferenciam em

esquizontes. Eles rompem os hepatócitos, liberando a nova forma do parasito, os merozoítos, na corrente sanguínea. Os merozoítos então invadem os eritrócitos, iniciando a fase eritrocitária. Plasmódios podem infectar eritrócitos em diferentes fases de maturação. O *P. vivax* invade preferencialmente eritrócitos jovens, enquanto o *P. falciparum* invade eritrócitos em qualquer fase de maturação^{28,30}. A quantidade de merozoítos liberados depende da espécie de *Plasmodium* infectante, variando entre 12 e 16 por eritrócito infectado. Essa fase de multiplicação assexuada descrita acima depende da espécie do parasito, sendo sua duração de 24 horas para *P. knowlesi*, 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e 72 horas para *P. malariae*^{30,31}.

Depois de alguns ciclos de reprodução assexuada, os merozoítos se tornam formas sexuadas, chamadas gametócitos, que circulam pela corrente sanguínea e representam as formas infectantes para os mosquitos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Nos mosquitos, os gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, células sexuais maduras que, após fecundação, vão dar origem ao zigoto^{29,32}. Em seguida, o zigoto se desenvolve em uma forma móvel, o oocineto, que, no intestino dos mosquitos, se diferencia em oocisto, no interior do qual se desenvolvem milhares de esporozoítos, que se alojam em suas glândulas salivares. A partir daí, o ciclo de infecção da malária se reinicia^{28,29,30,33}. A figura 1 ilustra o ciclo biológico do gênero *Plasmodium* no homem e no mosquito vetor.

DARC na superfície dos eritrócitos são geralmente refratários à infecção por *P. vivax*³⁴. A ausência do antígeno Duffy na população da África Central e Ocidental, por exemplo, é um evento marcante que parece conferir aos africanos proteção contra o *P. vivax*^{35,36}. Estudos sugerem que a interação do antígeno Duffy e seu receptor é breve e que, por isso, sua exposição ao sistema imune seria rápida, o que reduziria a imunogenicidade natural do parasito ao hospedeiro. Assim, em áreas com endemicidade baixa, uma alta proporção de indivíduos não apresenta imunidade humoral contra o receptor DARC. Alternativamente, no Brasil, em áreas da região Amazônica onde a transmissão da malária era elevada e as pessoas eram expostas por longos períodos de tempo à doença, uma elevada proporção de indivíduos desenvolveu essa imunidade³⁴.

Outro fator de virulência do *Plasmodium* são as roptrias, as micronemas e os grânulos densos, organelas secretoras especializadas localizadas no ápice dos merozoítos. Essas organelas permitem que o *Plasmodium* possa aderir à célula hospedeira, invadindo-a e estabelecendo o vacúolo parasitóforo, onde ocorrerá a replicação intracelular³⁷.

O *P. falciparum*, responsável pela grande maioria dos casos de malária grave, possui a capacidade de provocar a aderência dos eritrócitos infectados ao endotélio do hospedeiro – citoaderência – e aos eritrócitos não infectados – formação de rosetas, o que levaria à oclusão dos vasos de diversos órgãos e tecidos e provocaria a sintomatologia observada nos casos de malária grave. PfEMP₁ (Proteína de membrana eritrocitária 1 do *P. falciparum*) é um complexo protéico presente na superfície dos eritrócitos e que tem sido sugerido como o principal responsável por essa aderência³⁷.

1.3 QUADRO CLÍNICO

A tríade malárica, grupo de sintomas frequentes durante o episódio clínico e composto por febre (92% dos casos), calafrios (79% dos casos) e cefaleia (70% dos casos), é a sintomatologia mais clássica, juntamente com sudorese (64%)³⁸. Por vezes, a sintomatologia é semelhante a das infecções virais comuns, o que pode dificultar o diagnóstico³⁹. A febre, em geral acima dos 38 graus centígrados, tem padrão temporal variável, dependendo da espécie de plasmódio infectante^{1,37}.

Outros sinais e sintomas podem estar presentes, como astenia intensa, artralgia, insônia, mialgia, tosse, diarreia, náusea, dor abdominal, vômitos, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia^{40,41}.

A gravidade da malária, no entanto, depende da relação entre hospedeiro, principalmente no que diz respeito ao seu estado imunológico, e a espécie de *Plasmodium* envolvida, bem como a sua densidade parasitária. Os hospedeiros mais vulneráveis são primoinfectados, gestantes, pacientes com mais de 65 anos e crianças e as infecções mais graves geralmente são as causadas pelo *P. falciparum*, que representam 24% dos casos de malária nas Américas^{42,43}. Doenças e agravos pré-existentes, ausência de profilaxia antimalárica e atraso no tratamento são fatores apontados também como influenciadores da gravidade da malária^{42,43,44,45,46}.

Um estudo prospectivo realizado nos EUA apontou etnia negra, parasitemia menor que 2% e presença de histórico de malária anterior como fatores diretamente relacionados à menor gravidade da doença causada por *P. falciparum* em pacientes adultos. Pacientes negros tiveram, inclusive, tempo de internação 34% menor que pacientes asiáticos e 46% menor que pacientes brancos⁴³. Pacientes de áreas endêmicas, expostos a infecções repetidas, costumam ter melhor imunidade adquirida. Assim, pacientes de regiões onde a transmissão da malária é intensa e constante desenvolvem alta imunidade e costumam ter sintomatologia mais branda, com menos casos graves e significativa proporção de casos assintomáticos ou oligossintomáticos^{47,48,49}.

Em 1990, a OMS estabeleceu normas e critérios para melhor identificar e classificar os casos de malária grave, a fim de orientar futuros estudos clínicos e epidemiológicos e proporcionar um melhor atendimento aos pacientes infectados. Em 2000, a OMS revisou essas normativas para incluir alterações clínicas e laboratoriais que pressagassem um prognóstico desfavorável^{50,51}. Ainda de acordo com a OMS, a malária grave ocorre quando pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas está presente: perda de consciência ou confusão mental, colapso circulatório, insuficiência renal aguda (creatinina sérica maior que 3 mg/dL), anemia grave (hemoglobina menor que 7g/dL), icterícia associada a disfunção de órgãos vitais, edema pulmonar, hiperparasitemia (maior que 5%) ou morte⁵².

Na malária grave, existem alterações laboratoriais e clínicas variáveis, com distúrbios em vários órgãos e sistemas, sendo acometido inclusive o sistema nervoso central, que é afetado em 0,01% a 16% dos casos. Alterações neurológicas incluem distúrbios de comportamento, desorientação, convulsões e coma. Outras alterações da malária grave incluem prostração, anemia grave, insuficiência renal e respiratória, choque, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia, acidose metabólica e disfunção hepática^{41,50,51,53}.

1.4 A EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A teoria mais aceita afirma que o gênero *Plasmodium* é recente no Continente Americano⁴⁸. O *P. falciparum* foi trazido, provavelmente, por meio do trabalho escravo implantado pelos colonizadores europeus entre os anos de 1500 e 1800, o que resultou na migração forçada de milhões de africanos⁵⁴. Relatos médicos antigos dos países de origem dos colonizadores recém-chegados testemunham a presença endêmica da malária na região de suas terras natais⁵⁵. A chegada do *P. vivax* nas Américas permanece incerta: era considerado endêmico na Europa até meados do século XX, em países como Portugal, Espanha, França, Holanda e Inglaterra, mas de ocorrência eventual na África Central e Ocidental, berço de grande parte dos escravos trazidos para o Continente Americano^{56,57,58}. É possível também, no entanto, que esta espécie de *Plasmodium* tenha chegado às Américas nos períodos pré e pós colombianos com imigrantes da Ásia e do Pacífico Ocidental^{58,59,60}.

Ainda hoje, a malária é considerada um grave problema de saúde pública mundial. As estimativas atualizadas indicam que ocorreram, em 2018, 228 milhões de casos da doença no mundo, levando a 405 mil mortes, a maioria de crianças africanas menores de cinco anos (67%)⁶¹. A doença se distribui por extensas regiões tropicais e subtropicais, atingindo um grande número de pessoas, sobretudo em nações em desenvolvimento ou subdesenvolvidas. Após décadas de controle sistemático e tentativas de erradicação, a doença tem-se mantido constante e endêmica em 18 países nas Américas: Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, República Dominicana, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname e Venezuela⁶¹. Segundo a Organização Mundial de Saúde, foram relatados, em 2018, 753.700 casos da

doença nesses países, com 338 mortes. É possível, no entanto, que esses números estejam subestimados, já que eles derivam de relatórios anuais dos Ministérios da Saúde e estão sujeitos a limitações na cobertura das notificações e diagnósticos em muitas áreas de ocorrência da doença⁶².

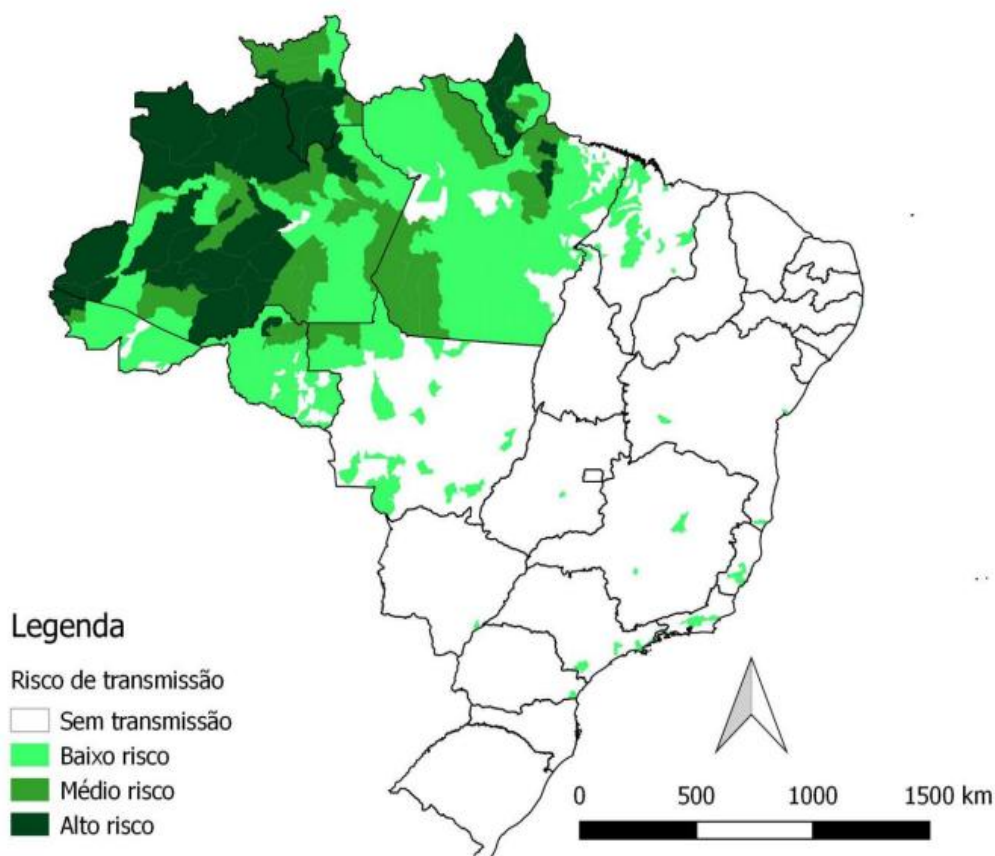
Em 2018, três países do Continente Americano, Venezuela (51%), Brasil (23%) e Colômbia (10%), registraram aproximadamente 84% dos casos de malária na região⁶¹. Também em 2018, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, México, Nicarágua, Panamá e Venezuela registraram aumento significativo no número de casos. Em 2017, foram registrados 174.522 casos da doença nos nove estados brasileiros que compõem a região da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), um aumento de 48% em relação ao ano de 2016, segundo a Organização Mundial de Saúde⁶¹. Esse aumento espantoso e alarmante aponta para a vulnerabilidade dos programas de controle da malária e pode estar relacionado à mudança de foco para o controle de outras doenças, como zika, dengue e chikungunya^{63,64,65}. Outra possibilidade que deve ser considerada é a seca persistente e intensa que assolou a região Amazônica devido ao fenômeno El Niño em 2015-2016⁶⁶.

Em sua grande maioria, os casos de malária no Brasil estão restritos às áreas da região Amazônica, onde ela é endêmica, sendo transmitida, principalmente, pelo mosquito *Anopheles darlingi*. A transmissão nessa região também pode ser influenciada pela malária importada de países vizinhos, transmissão essa que pode ser importante e não deve ser ignorada: no estado do Maranhão, por exemplo, os casos importados da Guiana Francesa, Guiana e Venezuela em 2014 e 2015 equipararam-se em número aos casos autóctones e àqueles importados do estado do Pará, juntos⁶⁷.

No entanto, casos residuais de malária também são notificados fora da região Amazônica, nas regiões Sul e Sudeste do país, em áreas com ecossistemas típicos e com cobertura de Mata Atlântica^{68,69}. Em meados do século XX, cerca de metade dos casos de malária no Brasil (quatro a seis milhões de casos por ano) ocorriam na região Amazônica^{70,71,72,73}. Hoje, essa frequência oscila em torno de 99%^{61,70,74,75,76}. Na região extra-Amazônica, foram notificados, em 2016, 499 casos de malária, aproximadamente 0,4% do número total de casos no Brasil. Destes, 82 (16%) foram

autóctones, segundo o Ministério da Saúde^{77,78}.

Na figura 2, é possível observar as áreas de risco de transmissão de malária no Brasil.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

Figura 2 - Risco de transmissão da malária no Brasil em 2018.

1.5 A MALÁRIA SÍMIA

Em 1907, Halberstaedter e Prowazek e, posteriormente, Mayer, identificaram o *Plasmodium* pela primeira vez em primatas não humanos, em estudos realizados em Berlim, na Indonésia e em Bórneu^{79,80,81}. No ano seguinte, o parasito foi identificado em um símio da espécie *Cacajao calvus*, vulgarmente conhecido como Uacari-branco, no estado do Amazonas, e chamado então de *Plasmodium brasilianum*. Até 1951, essa foi a única espécie de *Plasmodium* de primatas não humanos conhecida no continente Americano⁸². Nesse mesmo ano, uma nova espécie do parasito foi

identificada pelo Prof. Flávio da Fonseca, do Instituto Butantã, ao reexaminar o sangue de um símio da espécie *Alouatta fusca* (atualmente denominado *Alouatta guariba*), que havia sido objeto de um estudo sobre a febre amarela, recebendo o nome de *Plasmodium simium*⁸³.

O *P. brasilianum* se distribui largamente pelas Américas do Sul e Central, sendo encontrado no Brasil, na Colômbia, na Venezuela, no Panamá e no Peru, causando infecções naturais em aproximadamente 11 gêneros das cinco famílias de primatas não humanos neotropicais: Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae^{82,84,85}. O *P. simium* foi encontrado infectando naturalmente primatas não humanos das famílias Atelidae e Cebidae, dos gêneros *Cebus*, *Sapajus*, *Alouatta* e *Brachyteles*^{82,86,87,88,89}.

No Brasil, enquanto o *P. simium* está restrito à floresta Atlântica nas regiões Sul e Sudeste, o *P. brasilianum* é encontrado em quase todo o território nacional, excetuando-se porções áridas do Nordeste e das savanas no Sudeste^{82,86}. Com relação aos símios infectados nas regiões Sul e Sudeste do país, temos os dos gêneros *Alouatta* e *Brachyteles*^{82,86,89}.

Símios do gênero *Alouatta* podem ser encontrados em quase todos os biomas da América do Sul e Central, mas infecções desses símios por *P. simium* parecem se limitar à Mata Atlântica das regiões Sudeste e Sul⁸². Deane⁹⁰, depois de oito anos de pesquisa sobre a malária símia no Brasil, examinou 1.900 animais de 48 espécies e encontrou 368 positivos, sendo 223 para *P. brasilianum*, 114 para *P. simium* e 31 parasitados por ambas as espécies⁹⁰. Em outro compilado de pesquisas publicado por Deane em 1992, 4.585 primatas foram analisados de 118 locais diferentes em quase todos o território nacional brasileiro, excetuando - se os estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba. As taxas de infecção para malária encontradas variaram nas diferentes regiões do país, tendo a região Sudeste revelado a maior taxa, 35,6%, seguida da região Sul (17,9%). Na região Nordeste, onde florestas e primatas são escassos, nenhum animal foi positivo para malária, assim como na região Centro-Oeste. Na região Sudeste, 46,3% dos resultados foram positivos para *P. brasilianum*, enquanto, na Sul, a grande maioria (42,4%) foi positiva para *P. simium*⁸².

Um estudo de 2019, de Abreu *et al*, realizado na Mata Atlântica do Rio de Janeiro e de seus estados vizinhos (Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo), analisou sangue e vísceras de primatas não humanos em busca de DNA de *Plasmodium*. Cento e quarenta e seis animais foram analisados, de seis espécies, em 30 municípios⁹¹. A única espécie de símio encontrada infectada por *Plasmodium* foi o macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*). No Rio de Janeiro, 26% dos bugios analisados foram positivos para DNA de *Plasmodium*. Dentre eles, 11,9% estavam infectados por *P. simium* e 9,5% por *P. brasilianum* e 4,7% por *P. simium* e *P. brasilianum* concomitantemente. Todas as amostras, no entanto, foram negativas para *P. falciparum*⁹¹.

Deane realizou muitos estudos referentes à malária símia, alguns com o objetivo específico de comprovar o papel do mosquito *Anopheles cruzi* como vetor de sua cadeia de transmissão. O estudo publicado em 1966 apresentava o resultado de experimentos com captura de mosquitos em plataformas situadas a alturas de 10 a 15 metros, assim como no solo, já que os símios do gênero *Alouatta*, sabidamente suscetíveis à infecção por *Plasmodium*, são arbóreos e raramente vão ao solo. Dos mosquitos capturados nas plataformas, 81.2% eram *Anopheles cruzi*, enquanto dos mosquitos capturados no solo, 30% eram desta espécie. Dos 698 mosquitos analisados, 12 eram portadores de esporozoítos. Esse estudo foi conduzido no Parque Estadual da Cantareira, em São Paulo, e no estado de Santa Catarina, locais onde existia um grande número de símios da espécie *Alouatta guariba*, bem como um número menor de símios das espécies *Cebus apella* e *Callithrix aurita*. Curiosamente, *P. simium* e *P. brasilianum* eram encontrados com frequência causando infecção nos símios *Alouatta guariba*, mas nunca nos outros símios mencionados acima⁸⁷.

Em um experimento realizado em 1970 por Deane e colaboradores com o mesmo objetivo, um símio da espécie *Alouatta belzebul* foi trazido da Região Amazônica e levado para o Parque Estadual da Cantareira, onde foi mantido em jaula içada a 15 metros por alguns dias. Ele foi submetido aos repastos de mosquitos *Anopheles cruzi* e, algumas semanas depois, *P. simium* foi detectado em amostras de seu sangue, bem como *P. brasilianum*, posteriormente. Como esse animal tinha sido examinado 19 vezes nos dois meses anteriores ao experimento, com resultados

sempre negativos para malária, e o *P. simium* não ocorre na região Amazônica, os realizadores desse experimento consideraram suficientemente consistente a evidência da importância do *Anopheles cruzi* na transmissão da malária símia⁹².

Estudos realizados até o momento em populações de primatas não humanos selvagens demonstram que os grandes símios, como chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) e gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*), não se constituem em reservatórios de *Plasmodium* para seres humanos^{93,94,95}.

1.6 A MALÁRIA COMO ZONOSE

Nas áreas com densas florestas de Mata Atlântica, a malária se mantém resistente às medidas de controle implementadas pelos órgãos de saúde pública, permanecendo de modo residual. Essas áreas são chamadas de região extra-Amazônica, que é composta por 18 estados brasileiros e contempla cerca de 40% do território nacional⁷⁴. De 1996 a 2006, 26.418 casos de malária foram registrados no Brasil na região extra-Amazônica, em sua maioria causados por *P. vivax*⁷⁴. A maioria dos casos autóctones nessa região, no período de 2007 a 2016, foi registrada no Espírito Santo, onde ocorreram cerca de 400 casos. Um grande número de casos autóctones foi registrado também, nesse mesmo período, no Rio de Janeiro (80), São Paulo (180) e Paraná (160)⁶⁷.

Nessas regiões, a malária possui características particulares, como grande distância temporal e geográfica entre os casos, sinais e sintomas mais discretos e baixa parasitemia à microscopia. Tal comportamento peculiar dificilmente pode ser explicado pela dispersão pessoa a pessoa⁶⁸. Essa endemia é chamada de malária residual de sistemas de Mata Atlântica da região extra-Amazônica ou, mais simplesmente, de malária bromélia, termo criado pela primeira vez por Dows e Pittendrigh, por causa da grande quantidade dessas plantas existentes nas florestas de Mata Atlântica e dos vetores transmissores que se reproduzem nas águas que nelas se acumulam⁹⁶.

As características citadas acima sugerem a existência de um reservatório para o parasito e essa é uma questão ainda a ser esclarecida. Uma das hipóteses consideradas é a possibilidade dos primatas não humanos infectados existentes nesses locais serem esses reservatórios, já que os casos humanos autóctones são

encontrados onde também existem relatos de macacos infectados^{68,87,97}.

Os primatas não humanos são importantes hospedeiros de doenças zoonóticas. Eles podem compartilhar patógenos com seres humanos e atuar como reservatórios para várias doenças infecciosas, haja vista sua proximidade evolutiva e as características filogenéticas semelhantes às do homem⁹⁸. Vários são os exemplos que podem comprovar esse fato, alguns graves e até mesmo fatais, como os vírus da raiva, da herpes B e das hepatites virais. O mesmo ocorre com alguns protozoários, como o *Toxoplasma gondii* e a *Leishmania*, este último transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Lutzomyia*⁹⁹. Além disso, os primatas não humanos são suscetíveis a agentes patogênicos humanos que podem ter impacto de grau variável em suas populações^{100,101,102,103,104}.

Assim sendo, plasmódios infectando primatas não humanos despertam grande interesse porque podem ser também, eventualmente, transmitidos para humanos. Em 2004, na Malásia, o *P. knowlesi*, espécie até então associada à infecção malárica em símios, foi identificado como causador de cerca de 57% dos casos humanos diagnosticados naquela região^{23,24}. Primeiramente descrito em símios em 1932, o *P. knowlesi* tem sido responsabilizado por um número crescente de casos de malária no Sudeste da Ásia, incluindo países como Malásia, Tailândia, Indonésia, Cingapura, Filipinas e Vietnã^{105,106,107,108,109,110,111}. Outro *Plasmodium* com potencial zoonótico é o *Plasmodium cynomolgi*, cuja primeira situação de infecção natural em humanos foi descrita em 2014, em uma mulher de 39 anos residente na costa leste da Malásia¹¹².

Outro ponto importante em relação à malária zoonótica é o fato de que há uma inegável similaridade genética entre algumas espécies de *Plasmodium*, como é observado entre o *P. vivax*, responsável pela grande maioria de casos de malária humana relatados nas áreas de Mata Atlântica, e o *P. simium*. Análises filogenéticas por meio de sequenciamento de citocromo b e Msp-1, assim como outros estudos realizados ao longo dos anos com a proteína CSP e com polimorfismos de microssatélites, têm estabelecido a identidade entre essas espécies inúmeras vezes^{113,114,115,116,117}. O mesmo tem ocorrido com a similaridade genética entre *P. malariae* e *P. brasilianum*, já que estudos recentes obtiveram 100% de correspondência entre amostras humanas e símias ao realizar o sequenciamento do

gene da subunidade ribossomial 18S RNAr e do gene CSP^{118,119}.

Por outro lado, estudos recentes têm apontado diferenças morfológicas e genéticas – dois SNP's, em inglês *single nucleotide polymorphism* - entre as espécies *P. vivax* e *P. simium* e apontam este último como o agente etiológico de grande parte dos casos humanos descritos nas áreas de Mata Atlântica, em vez do *P. vivax*, como é comumente aceito hoje^{120,121}. No entanto, segundo Buery e colaboradores, as diferenças encontradas nos estudos acima citados são insuficientes para configurar *P. simium* e *P. vivax* como duas espécies diferentes. A diversidade de haplótipos encontrados indicam heterogeneidade entre as amostras analisadas e reforçam a ideia antes proposta de que *P. vivax* e *P. simium* são a mesma espécie, com pequenas variações genéticas¹²⁰. No entanto, os resultados obtidos em ambos os estudos ficam prejudicados pelo pequeno número de amostras de primatas não humanos coletadas, em tempos e locais diversos^{120,121}.

Devido ao caráter singular de transmissão da malária residual de sistemas de Mata Atlântica da região extra-Amazônica e sua possível relação com a malária em primatas não humanos, pode ser particularmente difícil impedir sua continuidade nas áreas de intensa cobertura florestal, já que estes ecossistemas são comumente reconhecidos por facilitar a transmissão da doença¹²².

Além disso, o movimento das populações humanas se constitui em obstáculo importante ao combate da transmissão da malária no Brasil. Esse movimento pode ser transitório, associado a negócios, férias ou visitas sociais, o que pode acarretar surtos de pequena intensidade, geralmente em áreas livres de malária. A dispersão de pessoas a longo prazo e de forma continuada, no entanto, pode influenciar de modo significativo uma dinâmica de transmissão já estabelecida. Essa dispersão está mais ligada à malária por *P. vivax* e a movimentos de curta distância, como a mudança para cidades vizinhas, que está relacionada principalmente à pobreza e à busca por condições melhores de vida¹².

Têm havido ainda extenso desmatamento devido ao aumento populacional em áreas de intensa cobertura vegetal, acrescido de maior demanda por terras. O homem também tem se aventurado mais nas florestas, seja devido a mineração, a extração de madeira ou mesmo à procura por lazer¹²³. Acrescido a isso, temos o fato de que

tem havido uma diminuição nas populações de macacos selvagens em todo o mundo e que os vetores anofelinos provavelmente têm encontrado um número menor de hospedeiros símios, enquanto o número potencial de hospedeiros humanos aumenta. Esse fato é relevante, haja vista o conhecimento de que esses vetores são altamente versáteis em adaptações devidas a mudanças ambientais²².

A forte perspectiva de que os primatas não humanos atuem como reservatório para a malária residual de sistemas de Mata Atlântica também foi levantada por outros estudos e pesquisas. Duarte *et al.* realizaram um levantamento sobre os anticorpos da malária em 777 amostras de sangue de macacos selvagens em três locais diferentes no estado de São Paulo onde a malária residual está presente, analisando a prevalência de anticorpos contra CSP e formas assexuadas de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. O grande predomínio de anticorpos contra CSP nas três áreas estudadas mostra que os símios foram expostos a esporozoítos provenientes dos vetores anofelinos e, portanto, desenvolveram infecção¹²⁴.

Outras evidências foram oferecidas pelos estudos de Buery *et al.*, que investigaram a transmissão da malária residual no estado do Espírito Santo realizando análise do DNA de *Plasmodium* extraído de seres humanos, de um símio do gênero *Alouatta* e de mosquitos *Anopheles*, todos infectados pelo protozoário. O genoma mitocondrial encontrado nessas análises foi então sequenciado e os resultados encontrados corroboraram a possibilidade da transmissão entre espécies, já que a análise dos haplótipos indica que seres humanos e primatas não humanos das áreas de Mata Atlântica são infectados pelos mesmos haplótipos¹²⁰.

Em outro estudo realizado na Amazônia Venezuelana em 2015, onde casos de malária de comunidades indígenas Yanomamis foram identificados, o sequenciamento do gene 18S rRNA do DNA de *Plasmodium* extraído foi 100% idêntico ao do *P. brasilianum* encontrado em símios da espécie *Alouatta seniculus*. Os autores do estudo acreditam que os parasitas são facilmente compartilhados entre seres humanos e primatas não humanos, possivelmente pela baixa especificidade do *Plasmodium* entre mamíferos¹²⁵.

1.7 O GENOMA DO *PLASMODIUM* E AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Desde a década de 1990, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou Reação em Cadeia da Polimerase começou a ser utilizada para o diagnóstico da malária como uma possível alternativa à microscopia, sendo muito superior em eficácia e desempenho. Essa técnica permite a amplificação de sequências específicas de DNA para visualização posterior, por meio de reações cíclicas com variações de temperatura ao longo de períodos de tempo pré-determinados. Na PCR em tempo real, é possível o monitoramento contínuo de todo o processo ao longo dos ciclos de amplificação mediante um sinal fluorescente que é convertido em valor numérico. É uma técnica relativamente simples e que não requer manuseio depois da reação, como ocorre na técnica convencional, o que diminui o risco de contaminação e os custos. Além disso, é mais eficiente, reduzindo o tempo de resposta em pelo menos duas horas. As reações de PCR possuem, ainda, grande sensibilidade e por esse motivo, não é necessário uma grande quantidade de amostra para serem realizadas. No entanto, sua eficácia está intimamente ligada à pureza do DNA extraído^{126,127}.

Todos os métodos de extração de DNA possuem três etapas em comum: degradação das membranas celulares ou lise, purificação e recuperação do DNA. O DNA pode ser obtido de forma convencional, com a utilização de diversos produtos químicos que devem ser devidamente preparados antes da extração, ou mediante o uso de kits comerciais. Essa alternativa é mais fácil e rápida, mas mais cara que a forma convencional. A extração de DNA perfeita deve ser sensível, reprodutível, rápida, de fácil realização, com menor risco de contaminação das amostras e acessível financeiramente¹²⁸. No caso da extração de DNA de *Plasmodium*, geralmente são utilizados kits comerciais e protocolos já estabelecidos, implementando-se alterações de acordo com as necessidades do estudo que está sendo realizado¹²⁹.

O gênero *Plasmodium* possui três genomas: o nuclear, com 14 cromossomos haplóides e 23 megabases (Mb), e duas moléculas de DNA extra-cromossômico, o circular, com 35 kilobases (kb), e o mitocondrial, com seis kilobases. O genoma mitocondrial é o material genético encontrado dentro das mitocôndrias e, por causa disso, possui estabilidade superior. Ele evolui por transmissão genética direta, sem

qualquer forma de rearranjo ou recombinação. Sua evolução ocorre bem mais rapidamente do que aquela do genoma nuclear (5 a 10 vezes) e ele está presente em um grande número de cópias. Além disso, tem herança materna e poucos genes: citocromo c oxidase - subunidade 1 (CoI), citocromo c oxidase-subunidade 3 (CoIII) e citocromo b (Cyb). Possui também 13 genes codificadores de RNA ribossômico e uma variedade de características que o tornam ideal para estudos filogenéticos e populacionais^{130,131,132,133}. Além disso, todas as espécies de *Plasmodium*, assim como plantas e algas vermelhas, possuem um plasmídeo não fotossintético, o apicoplasto, que é essencial para vias metabólicas e biossintéticas. Ele é circular, de herança materna e com DNA conservado^{134,135}.

Há alguns anos, técnicas moleculares como a extração de DNA e a PCR têm sido utilizadas para detectar e caracterizar as espécies de *Plasmodium*, seja em amostras de sangue ou de tecidos. A princípio, a PCR em tempo real tem como alvo o genoma nuclear, por meio da subunidade menor (18S) do RNA ribossômico (rRNA), presente no genoma dos *Plasmodium*. Mais recentemente, no entanto, para superar algumas limitações encontradas, como a frequente recombinação genética, os genomas extra-nucleares, representados pelo genoma mitocondrial e pelo apicoplasto, vêm sendo cada vez mais explorados¹³⁶.

1.8 ONE HEALTH

One Health, ou Saúde Única, consiste no empenho interdisciplinar que atua local, nacional e mundialmente com o intuito de alcançar a saúde ideal para seres humanos, animais e meio ambiente¹³⁷.

Na era pré-moderna, os animais eram estudados mais profundamente com o objetivo de se entender melhor a medicina humana. As primeiras faculdades de medicina veterinária foram criadas no século XIX, mas o estudo da medicina humana e animal ainda não era estritamente separado. De fato, os aprendizes eram incentivados a estudar as duas medicinas. Além disso, os professores dessas primeiras faculdades eram, em sua maioria, médicos da medicina humana¹³⁸.

Na era moderna, William Foege, epidemiologista e colaborador na erradicação da varíola, afirmou que não se podia contar a história da saúde humana separada da animal e da ambiental¹³⁹.

Nos últimos anos, a necessidade de se abordar e compreender questões referentes à saúde por meio da conexão entre saúde humana, animal e ambiental tornou-se urgente, já que 61% dos patógenos infecciosos que afetam os seres humanos são zoonóticos, ou seja, podem ser transmitidos entre humanos e animais. Patógenos como os vírus Influenza, Ebola e Zika estão entre as 175 espécies consideradas emergentes. Dessas, 132 são zoonóticas¹⁴⁰.

Do mesmo modo, a dinâmica da malária residual de sistemas de Mata Atlântica da região extra-Amazônica e todas as suas complexidades também serão melhor abordadas e analisadas sob a visão de *One Health*, haja vista o seu possível caráter zoonótico, bem como a forte influência de fatores ambientais sobre as variantes aqui discutidas.

1.9 A FEBRE AMARELA E O SURTO DE 2016 A 2018

A febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda, não contagiosa, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*. É endêmica e zoonótica em diversos países dos continentes americano e africano onde, eventualmente, são registrados surtos de intensidade variável^{141,142,143}.

Existem hoje dois ciclos conhecidos de febre amarela (FA), urbano e silvestre. No ciclo urbano, a doença é uma antroponose e a transmissão é do tipo homem-mosquito-homem, tendo como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*. Já no ciclo silvestre, várias espécies de mosquitos podem estar envolvidas como vetores. Os primatas não humanos, principalmente dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Atelles* e *Callithrix*, participam como hospedeiros e amplificadores da doença, tornando-a uma zoonose¹⁴⁴.

No Brasil, a febre amarela possui um padrão sazonal, com maior transmissão entre dezembro e março. Entretanto, as epizootias registradas ao longo do ano de 2018 mostraram que a transmissão da doença continuou de junho a novembro. Além disso, nos últimos três anos, houve uma expansão da área de abrangência da doença¹⁴⁵.

Do final de 2016 a junho de 2017, iniciou-se um surto de grandes proporções, principalmente na região Sudeste do Brasil, contabilizando 778 casos de FA, com

262 mortes humanas e 1.655 óbitos de primatas não humanos registrados. Uma segunda onda de transmissão foi registrada do final de 2017 até junho de 2018, novamente na região Sudeste, mas com maior intensidade no estado de São Paulo. Foram registrados 1.376 casos, 483 óbitos humanos e 864 mortes de primatas não humanos. O número total de casos registrados durante os dois períodos de tempo descritos acima foi superior aos totais de surtos registrados nos últimos 50 anos¹⁴⁶.

2. JUSTIFICATIVA

A malária residual de sistemas de Mata Atlântica de região extra-Amazônica é constantemente registrada nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo desde 1976 e sempre preocupou os serviços competentes em virtude de seu mecanismo não habitual de transmissão e do número de casos, que, apesar de baixo, costuma ser constante. É causada principalmente por *P. vivax* e não parece se sustentar por meio da clássica cadeia de transmissão da malária, já que os casos normalmente são isolados e não existem vetores reconhecidamente competentes ou capazes na região.

Os municípios onde a malária bromélia (residual) comumente é registrada incluem Santa Teresa, São Roque do Canaã, Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, Marechal Floriano, Viana e Vargem Alta, os municípios-alvo deste estudo. Houve 24 registros de casos confirmados em 2017, segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, nos municípios da região serrana acima citados, e seis em 2018, ocorridos em Domingos Martins (três casos), Santa Leopoldina (dois casos) e Viana (um caso). Esses municípios têm reconhecido potencial turístico, recebendo, em conjunto, milhares de pessoas todos os anos, principalmente em função do ecoturismo, do turismo religioso e do turismo histórico, muito presentes em toda a região montanhosa do Espírito Santo. Casos constantes de uma doença considerada grave e potencialmente fatal podem ter impacto negativo nos empreendimentos na região, com perdas econômicas óbvias e alarmantes.

Este tipo específico de malária é uma condição mórbida potencialmente prevenível, necessitando de intervenção no âmbito da saúde coletiva. No entanto, as medidas usualmente utilizadas em casos de malária endêmica, que consistem na busca ativa de casos e em medidas de combate ao vetor, com frequência se mostram caras e ineficazes neste contexto em particular. Há outro ponto importante a ser considerado: se esses casos de malária autóctone começassem a surgir com maior intensidade e gravidade, originando surtos e provocando mortes, como os serviços de saúde e vigilância poderiam intervir? Quais medidas preventivas deveriam ser tomadas?

Ainda são poucos os dados disponíveis sobre a cadeia de transmissão da malária autóctone residual e muitos estudos têm sido realizados para elucidá-la. Há evidências de que a malária residual de sistemas de Mata Atlântica ocorra como zoonose, tendo em vista a presença da infecção por *Plasmodium* em primatas não humanos presentes em áreas de Mata Atlântica. Concomitantemente, observa-se uma grande variedade de espécies símias nas florestas desses municípios e constata-se a proximidade de muitas habitações humanas desses locais.

Tudo o que foi descrito acima torna o entendimento da dinâmica e da epidemiologia da malária residual de sistemas de Mata Atlântica e sua ligação com a malária em primatas não humanos de extrema importância, assim como a realização desse estudo, que pretende fornecer novas evidências e contribuir na elucidação das questões pendentes sobre o possível carácter zoonótico da malária.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de DNA de *Plasmodium* em amostras de fígado de símios mortos pela febre amarela nos municípios montanhosos do estado do Espírito Santo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a frequência de amostras de fígado positivas para as espécies de *Plasmodium* analisadas.
- Determinar os diversos locais de ocorrência da malária símia por meio da procedência do símio morto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

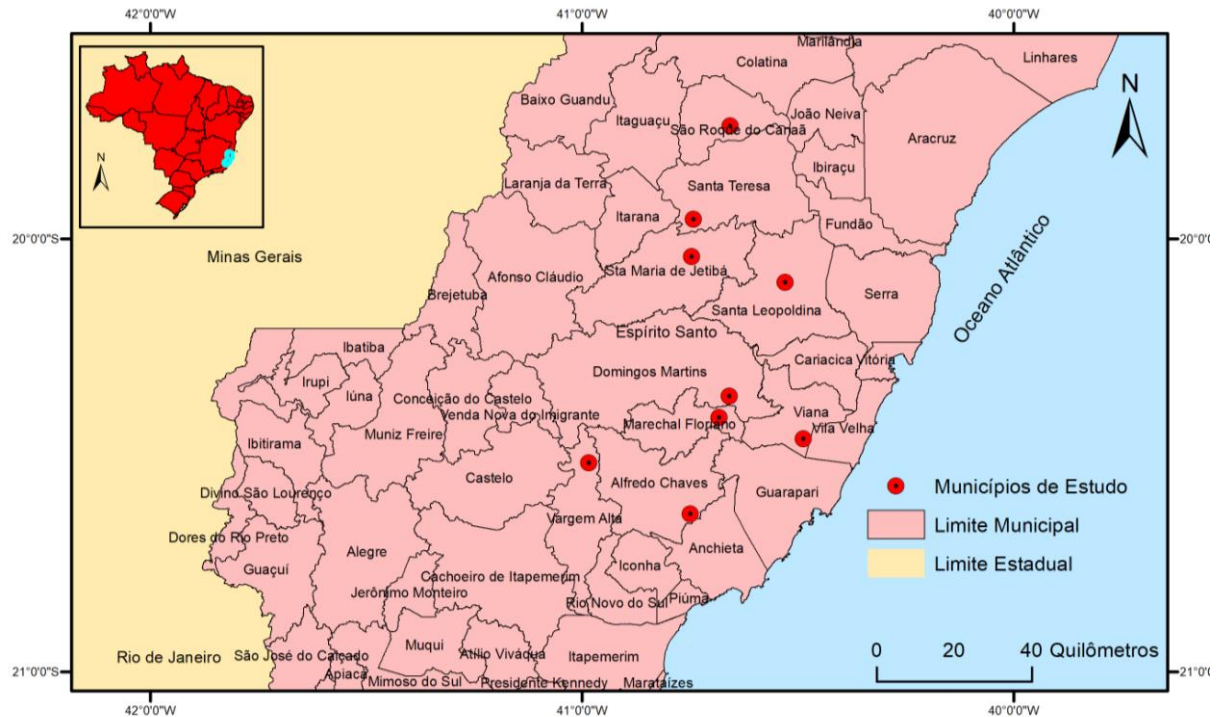
4.1 ÁREA DE ESTUDO

4.1.1 O ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

O estado do Espírito Santo está localizado na região Sudeste do Brasil, entre as latitudes 17° 53' 29" S e 21° 18' 03" S e as longitudes 39°41' 18" W e 41° 52' 45" W. Possui uma extensão territorial de 46.089 km², equivalente a 0,53% do território nacional. Tem, como limites, o estado da Bahia ao norte, o Oceano Atlântico a leste, o estado do Rio de Janeiro ao sul e o estado de Minas Gerais a oeste. Sua população, segundo dados do IBGE de 2018, é de 3.972.388 habitantes. Seu território compreende duas regiões naturais distintas: o litoral, que se estende por 400 km, e o planalto. Ao longo da costa Atlântica, existe uma faixa de planície que representa 40% da área total do estado. O clima é tropical úmido, com temperaturas médias anuais de 23 graus centígrados. A vegetação do estado é composta por floresta tropical, assim como por porções de restinga e manguezais nas áreas litorâneas¹⁴⁷.

A região serrana do Espírito Santo, dona de uma das mais ricas paisagens do estado, abrange um conjunto composto de vales, montanhas, cachoeiras, corredeiras e expressivas Unidades de Conservação. Seu relevo possui uma grande variação de altitude, com maciços que chegam a 1.900 metros, como o Pico da Pedra Azul, em Domingos Martins. Os maiores índices pluviométricos pertencem a Marechal Floriano, com precipitação variando de 1.200 a 1.700 mm¹⁴⁷.

Os nove municípios da região montanhosa do sul do estado que fazem parte deste estudo são Santa Teresa, São Roque do Canaã, Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins, Santa Leopoldina, Alfredo Chaves, Marechal Floriano, Viana e Vargem Alta, situados entre as latitudes 19,6° e 20,6° Sul e as longitudes 40,6° e 41° Oeste. Eles estão dispostos na figura 3.



Elaborado pelo programa ArcGis 10.3.1, 2019.

Figura 3 - Municípios participantes do estudo, localizados na região serrana do estado do Espírito Santo.

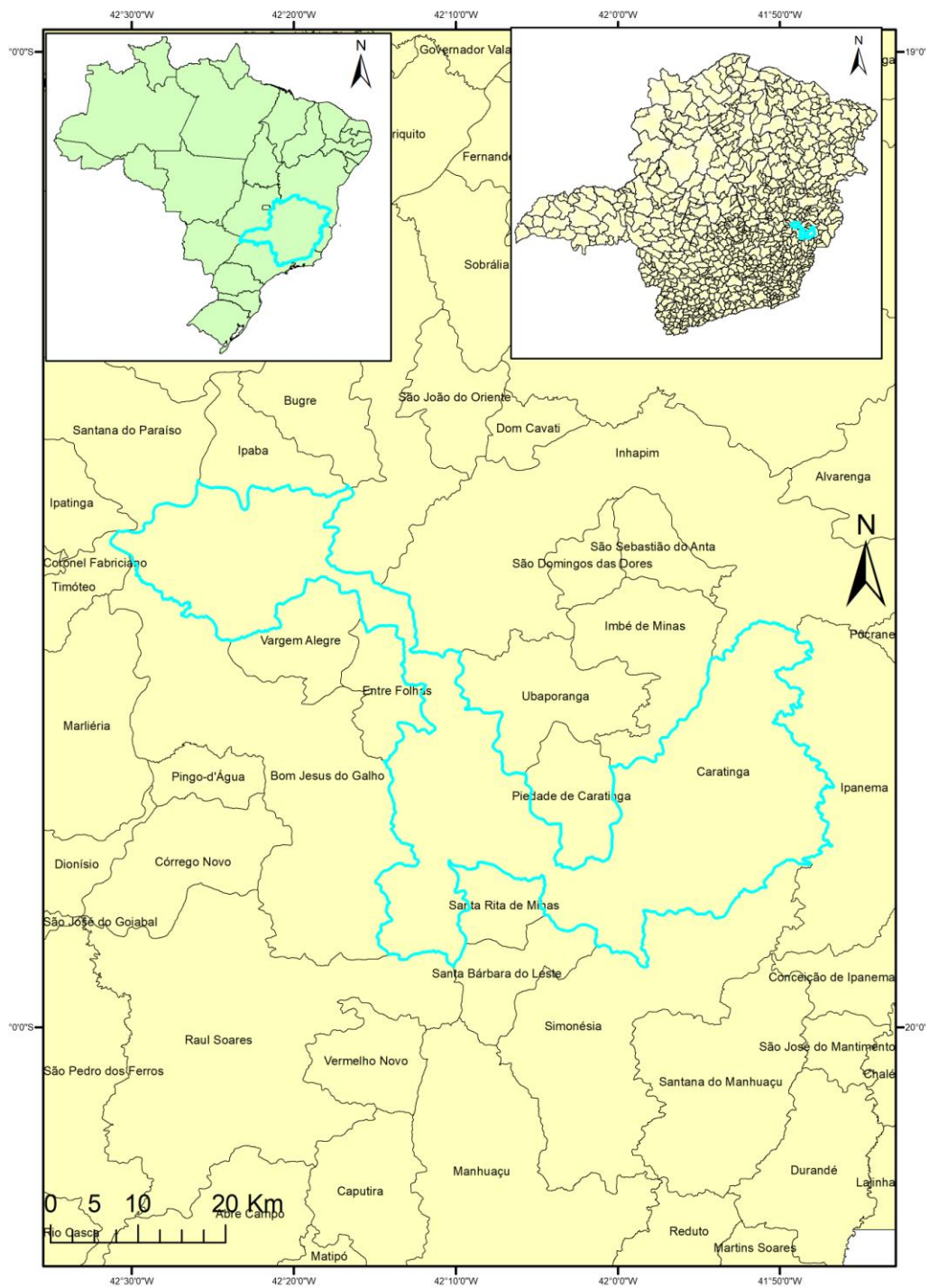
A região, que era considerada indene até 1976, possui aproximadamente 215.000 habitantes em uma área em torno de 5.343 km². Existem bolsões preservados de Mata Atlântica nestes municípios, geralmente em encostas de morros, próximas às habitações humanas. A maior parte dos moradores descende de italianos e alemães, que migraram para o Espírito Santo no século XIX. A fauna silvestre local é constituída de pássaros, répteis e pequenos mamíferos, incluindo símios das famílias Cebidae e Atelidae, com destaque para o gênero *Alouatta*, que é frequentemente encontrado infectado por plasmódios e é suscetível ao vírus da febre amarela^{148,149}.

4.1.2 O ESTADO DE MINAS GERAIS

Minas Gerais é um estado da Região Sudeste do Brasil, possuindo 586.521,121 km² e uma população estimada de 21.168.791 habitantes¹⁵⁰. O clima é tropical, com subdivisões regionais por causa da altitude, e as temperaturas médias anuais são superiores a 18 graus centígrados, com excessão dos planaltos mais elevados do centro-sul do estado, onde as temperaturas podem ser bem inferiores no inverno. A

cobertura vegetal do estado de Minas Gerais pode ser dividida em quatro biomas principais: Mata Atlântica, Cerrado, Campos de Altitude e Mata Seca. As regiões de Mata Atlântica são o segundo maior bioma do estado, possuindo elevado índice pluviométrico. A vegetação nessas áreas é densa e o ecossistema é ocupado por bromélias, samambaias e orquídeas. A biodiversidade animal nas áreas de Mata Atlântica é composta por mamíferos, aves, répteis, anfíbios e invertebrados, assim como por primatas não humanos¹⁵¹.

Três amostras coletadas eram de símios provenientes do município de Caratinga, em Minas Gerais. A região possui 1.258,479 km² e uma população estimada de 92.062 habitantes¹⁵². Localizada a 19°47'24" de latitude sul e 42°08'20" de longitude oeste, Caratinga pertence à microrregião Ocidental do Caparaó e situa-se na região da Serra da Mantiqueira. A sede do município está a 578 metros acima do nível do mar e a geografia é composta por "mares de morros", ou seja, uma área acidentada de planaltos coberta por florestas estacionais semi-decíduas e por montanhas¹⁵³. A vegetação nativa predominante é a Mata Atlântica e o município possui duas Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN), a RPPN estadual Lagoa Silvana e a RPPN federal Feliciano Miguel Abdala. Apresenta notável biodiversidade, com presença de primatas e diversos felinos, além de capivaras, veados, cutias, quatis e aves, como macuco e gaviões¹⁵⁴.



Elaborado pelo programa ArcGis 10.3.1, 2019.

Figura 4 - O município de Caratinga, no estado de Minas Gerais.

4.2 AMOSTRAGEM

Epizootias em áreas montanhosas, como as dos municípios da região serrana do Espírito Santo e de outros estados brasileiros, não são raras. Acometem primatas não humanos, que participam como hospedeiros e agem permitindo a disseminação

do agente patogênico em questão, como ocorre no ciclo de transmissão silvestre do vírus da FA. Essas epizootias acabam por possibilitar a obtenção de vísceras de símios mortos que são utilizadas para pesquisa de patógenos, como no caso do presente projeto, por meio de extração do DNA e amplificação por PCR.

Devido ao grande número de óbitos de símios no mais recente surto de FA que acometeu o estado do Espírito Santo e outros estados brasileiros nos anos de 2016 a 2018, foi possível a obtenção de amostras de fígado para a realização das já referidas técnicas de diagnóstico molecular necessárias nesse estudo.

No total, foram coletadas e analisadas 70 amostras de fígado de símios mortos, sendo as coletas oriundas de necropsias realizadas por médico veterinário pertencente à equipe de Primatologia da UFES.

4.3 COMUNICAÇÃO, TRANSPORTE E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Depois de coletadas, as amostras foram acondicionadas inicialmente em freezer – 20 °C no laboratório do Departamento de Ciências Biológicas da UFES, no *campus* de Goiabeiras, em Vitória/ES, e mantidas em embalagens plásticas impermeáveis e hermeticamente fechadas tipo *zip lock*, tamanho 4 x 4 cm. Elas foram posteriormente transportadas em caixas térmicas, devidamente climatizadas, até o laboratório do Setor de Parasitologia da UFES, no *campus* de Maruípe, também em Vitória, onde foram acondicionadas em freezer – 80 ° C. Por fim, as amostras foram enviadas por transporte aéreo, em gelo seco, para a Universidade de São Paulo (USP), onde foram mantidas em freezer – 20 ° C, no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT), até serem processadas e analisadas.

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE *PLASMODIUM*

A extração de DNA das amostras de fígado dos símios mortos foi realizada por meio do “DNeasy Blood and Tissue Kit” (Qiagen), segundo protocolo do fabricante (Spin-Column Protocol), descrito abaixo:

- 1- Espécimes de até 25 mg de tecido (fígados) foram cortados em pedaços pequenos que foram colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram

- adicionados 180 µl de tampão ATL.
- 2- Foram adicionados 20 µl de proteinase K, misturados completamente por vórtex e incubados a 56 °C até a lise completa do tecido. A mistura foi agitada ocasionalmente em vórtex durante a incubação para dispersar a amostra. A lise completa ocorreu em aproximadamente três horas.
 - 3- Seguiu-se agitação durante 15 segundos. Foram adicionados 200 µl de tampão de lise (AL) à amostra e foi realizada mistura completa por vórtex. Foram adicionados, em seguida, 200 µl de etanol (96-100%) e realizada nova mistura por vórtex. A amostra, o tampão AL e o etanol foram misturados completa e imediatamente para se obter uma solução homogênea
 - 4- A mistura do passo três foi completamente pipetada para a coluna de centrifugação DNeasy Mini e colocada em um tubo de recolha de 2 ml, que é fornecido pelo kit. A mistura foi centrifugada a 6.000 x g (8.000 rpm) durante um minuto. O filtrado e o tubo utilizado foram descartados.
 - 5- A coluna de centrifugação DNeasy Mini foi colocada em um novo tubo de 2 ml fornecido pelo kit. Foram adicionados 500 µl de tampão de lavagem 1 (AW1) e o produto foi centrifugado durante um minuto a 6000 x g (8.000 rpm). O filtrado e o tubo utilizado foram novamente descartados.
 - 6- A coluna de rotação DNeasy Mini foi colocada em um novo tubo de recolha de 2 ml que é fornecido pelo kit. Foram adicionados 500 µl de tampão de lavagem 2 (AW2) e o produto foi centrifugado durante três minutos a 20.000 x g (14.000 rpm) para secar a membrana da coluna de rotação do DNeasy Mini, uma vez que o etanol pode interferir com as reações subsequentes. A coluna de rotação Dneasy Mini foi, então, retirada cuidadosamente para não haver contaminação por etanol. O tubo de coleta foi descartado novamente.
 - 7- A coluna de centrifugação DNeasy Mini foi colocada em um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml e 200 µl de tampão de eluição (AE) foram pipetados diretamente sobre a membrana DNeasy. O produto foi incubado a temperatura ambiente por um minuto e depois foi centrifugado por mais um minuto a 6.000 x g (8.000 rpm) para eluir.
 - 8- A eluição realizada no passo acima foi repetida para obtenção de máxima concentração do DNA. Foi utilizado um novo tubo de microcentrífuga.

Todos os passos de centrifugação foram realizados a temperatura ambiente

(aproximadamente 24 °C). As agitações por vórtice foram efetuadas por vórtex pulsado durante dez segundos. Como todas as amostras de tecido utilizadas estavam congeladas a – 20 °C, a sua temperatura foi equilibrada até a temperatura ambiente antes das extrações de DNA.

4.4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO DE *PLASMODIUM*

Neste estudo, foi feita a opção por um protocolo de RT-qPCR, utilizando o sistema “TaqMan”, uma vez que ele possui maior sensibilidade e especificidade, além de não precisar de pós-processamento do produto da RT-qPCR, diminuindo o risco de contaminação, e de ser também reprodutível. Outra vantagem desse protocolo é a possibilidade de utilização de “primers” e sonda para amplificação de fragmento correspondente ao gênero *Plasmodium*, além dos primers e sonda espécie-específicos.

As reações foram realizadas segundo protocolo descrito por Bickersmith *et al.*¹⁵⁵ para amplificação de fragmentos do gene 18S rRNA, com cerca de 100 pares de bases, para o gênero *Plasmodium* e para as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*. Foi utilizado o TaqMan Triplex Universal Master Mix II com UNG e as reações para cada espécie e para gênero foram realizadas separadamente^{155,156} As mesmas condições foram utilizadas para a detecção de *P. malariae*, porém foram empregados “primers” e sonda descritos por Rougemont *et al.*¹⁵⁶, como apresentado no quadro 1.

Todas as reações foram realizadas com controle positivo e negativo. Como controles positivos das reações, foi utilizado DNA extraído de amostra de indivíduo infectado por *P. vivax*, sangue de macaco *Rhesus* infectado por *P. brasilianum* (confirmado por lâmina de imunofluorescência) e sangue de paciente com malária causada por *P. falciparum*. Como controle negativo, foi utilizada água estéril.

Para a reação de amplificação, foram utilizados 5,0 µl de DNA e 12,5 µl de TaqMan Universal Master Mix II com UNG (*Applied Biosystems*) (2X), 0,75 µl de Plasm2 - R e para cada respectiva reação, 0,75 µl (10 uM) de “primer” e 0,25 µl (10 uM) de sonda correspondentes, acrescentando-se água estéril para completar o volume de 25 µl.

As reações foram realizadas no equipamento Step One Plus (*Applied Biosystems*), no Laboratório de Protozoologia do IMT/USP, com a supervisão da equipe técnica colaboradora. Os parâmetros empregados foram: desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos e posteriormente, 50 ciclos de 95°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto.



Acervo Pessoal, 2018.

Figura 5 - Sistema Step One Plus utilizado nas reações de RT-qPCR, no Laboratório de Protozoologia do IMT/USP.

Quadro 1 - “Primers” e sondas (100 pb) utilizadas para amplificação de 18S rRNA de *Plasmodium* em amostras de DNA obtido de fígado de símios por RT-qPCR no sistema TaqMan®

"Primers" e Sondas	Sequência 5' - 3'	Ref
Plasmo1-F	GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA	155
Plasmo2-R	AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA	155
Plasprobe	FAM -TCGTAATCTTAACCATAAAC- MGBNFQ	155
Falc-F	GACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAAA	155
Falciprobe	VIC - TGAAGGAAGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGA -QSY	155
Vivax-F	GACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTAA	155
Vivaxprobe	NED - ATAACTCCGAAGAGAAAA – MGBNFQ	155
Mal-F	CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A	156
Malaprobe	FAM - CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT –MGBNFQ	156

Posteriormente, após as reações de amplificação por RT-qPCR no sistema “TaqMan”, todas as amostras foram reexaminadas em reações de amplificação por PCR convencional *Nested* utilizando primers para cyt b, genoma mitocondrial mais

específico e com estabilidade superior, a fim de amplificar fragmentos maiores (402 pb), utilizando, dessa vez, protocolos descritos por Siregar *et al* e De Nys *et al*^{187,188}. Com isso, tentou-se encontrar amostras positivas que as reações anteriores, que só puderam amplificar fragmentos de no máximo 150 pb, não detectaram. Portanto, através de técnicas moleculares distintas, aumentou-se consideravelmente a possibilidade de detectar DNA de *Plasmodium*.

As reações para amplificação de fragmento de citocromo b (*cyt b*) utilizaram os primers **PfF3700 /PfR4615**, que produziram um fragmento de 915 pb na primeira reação. A segunda reação de PCR utilizou o primeiro produto em conjunto com **Pff 3700 / PfR4102** e produziu um fragmento de **402 pb**. A primeira reação de PCR foi realizada com 2 µl de DNA, enquanto a segunda foi executada com 1 µl de produto da primeira reação, como descrito no Quadro 2, abaixo.

Quadro 2: “Primers” utilizados para amplificação de fragmentos de citocromo b de *Plasmodium* em amostras de DNA obtido de fígado de símios por PCR convencional *nested*.

Gene	"Primers"	Sequência	Pb	Reação
cytb1	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	915	Nest 1a 187
	PfR4615	GTTTGCTTGGGAGCTGTAATC		
	PfF3700	TGGATGGTGTTTTAGATACATGC	402	Nest 2a 188
	PfR4102	GCTGTATCATACCCTAAAG		

As reações de PCR foram executadas com uma mistura de PCR de 25 µl: 2 µl de molde, 2,5 µl de 10X tampão de PCR Taq, 10 pmol de cada primer, 100 µM de dNTP, 0,5 U de Taq Polimerase (Platinum Taq – Invitrogen).

Os ciclos de amplificação da primeira reação consistiram em: desnaturação - 94 ° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, sendo desnaturação - 94 ° C, por 15 segundos, alinhamento - 50 ° C por 15 segundos, extensão - 72 ° C por 45 segundos, com extensão final de 72 ° C por 5 minutos. Na segunda reação foram feitos 20 ciclos, e a temperatura de alinhamento foi aumentada para 53° C. Todas as reações foram conduzidas com controles negativos e positivos.

Todas as amostras positivas para DNA de *Plasmodium* foram enviadas para a Universidade Nova de Lisboa, em Portugal, onde, possivelmente, o sequenciamento do seu genoma será realizado.

4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Neste estudo, foram utilizados fragmentos de fígado de símios mortos em decorrência do surto de febre amarela no Espírito Santo e nenhum dano ao meio ambiente ocorreu em decorrência dele. Todas as medidas de biossegurança necessárias foram devidamente adotadas. Como nenhuma amostra biológica foi obtida de animais vivos, não houve eutanásia de animais e o estudo não envolve seres humanos, não se fez necessária apreciação ética de qualquer natureza.

As amostras de fígado de símios mortos na epizootia de febre amarela no Espírito Santo foram obtidas por meio de colaboração estabelecida entre o Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior e o Prof. Dr. Sérgio Lucena Mendes, ambos da Universidade Federal do Espírito Santo. A autorização para a coleta de campo foi obtida da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (autorização para coleta 38/2017 – CEUA/CCS/UFES) e está em anexo (Anexo 1).

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

O presente estudo tem delineamento descritivo, já que se dispôs a determinar a frequência do DNA de *Plasmodium* nas amostras de fígado coletadas e analisadas, além de permitir o mapeamento da ocorrência da malária símia nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo. Para organização dos dados, foi construída uma planilha com todas as informações referentes às amostras de fígado dos símios no programa *Microsoft Excel* (2013). Os dados foram tratados com base em suas frequências absolutas e relativas.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 70 amostras de fígado de primatas não humanos obtidas a partir do surto de febre amarela que atingiu o estado do Espírito Santo, assim como outros estados brasileiros, nos anos de 2016 a 2018. Na Tabela 1, abaixo, pode-se observar a distribuição das amostras de fígado de acordo com a espécie de símio afetado.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de fígado por espécie de símio morto por febre amarela nos anos de 2016 a 2018, obtidos em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG.

Espécie	Quantidade	Porcentagem
<i>Alouatta guariba</i>	54	77,14
<i>Callicebus personatus</i>	6	8,57
<i>Callithrix geoffroyi</i>	5	7,14
<i>Sapajus robustus</i>	1	1,43
Ignorado	4	5,71
Total	70	100,00

Acervo Pessoal, 2018.

Na tabela 2, abaixo, pode-se observar a distribuição das amostras de fígado de acordo com o município de origem do símio recolhido.

Tabela 2 - Distribuição das amostras de fígado de símios mortos por febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG de acordo com a sua procedência.

Município	Quantidade	Porcentagem
Domingos Martins	21	30
Santa Maria Jetibá	18	25,71
Santa Teresa	9	12,86
Marechal Floriano	6	8,57
Caratinga/MG	3	4,28
Vila Velha	2	2,86
Sooretama	1	1,43
São Mateus	1	1,43
Afonso Cláudio	1	1,43
Itaguaçu	1	1,43
Ignorado	7	10
TOTAL	70	100

Acervo Pessoal, 2018.

Entre as 70 amostras de fígado analisadas, uma foi positiva para *P. vivax*, quatro para *P. malariae*, sete para *P. falciparum* e uma amostra foi positiva tanto para *P. vivax* quanto para *P. falciparum*. Duas outras amostras foram positivas para o gênero *Plasmodium* nas reações de PCR utilizando marcador Cyt b. As espécies de *Plasmodium* dessas duas amostras só poderão ser especificadas posteriormente no seu sequenciamento. No total, 15 amostras foram positivas para DNA de *Plasmodium*, encontrando-se, portanto, uma frequência relativa de 21,43%.

A amostra positiva para *P. vivax* era de Santa Maria de Jetibá. Com relação às amostras positivas para *P. malariae*, uma era de Santa Teresa, uma de Domingos Martins e duas eram de origem desconhecida. Das amostras positivas para *P. falciparum*, quatro eram de Domingos Martins, uma de Santa Maria de Jetibá, uma de Caratinga/MG e uma de origem desconhecida. A amostra positiva concomitantemente para *P. vivax* e *P. falciparum* era do município de Marechal Floriano. As duas amostras positivas para o gênero *Plasmodium* eram de Santa Maria de Jetibá. Todas as amostras positivas eram de símios da espécie *Alouatta guariba* (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados encontrados nas amostras de fígado obtidas de símios mortos por febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG.

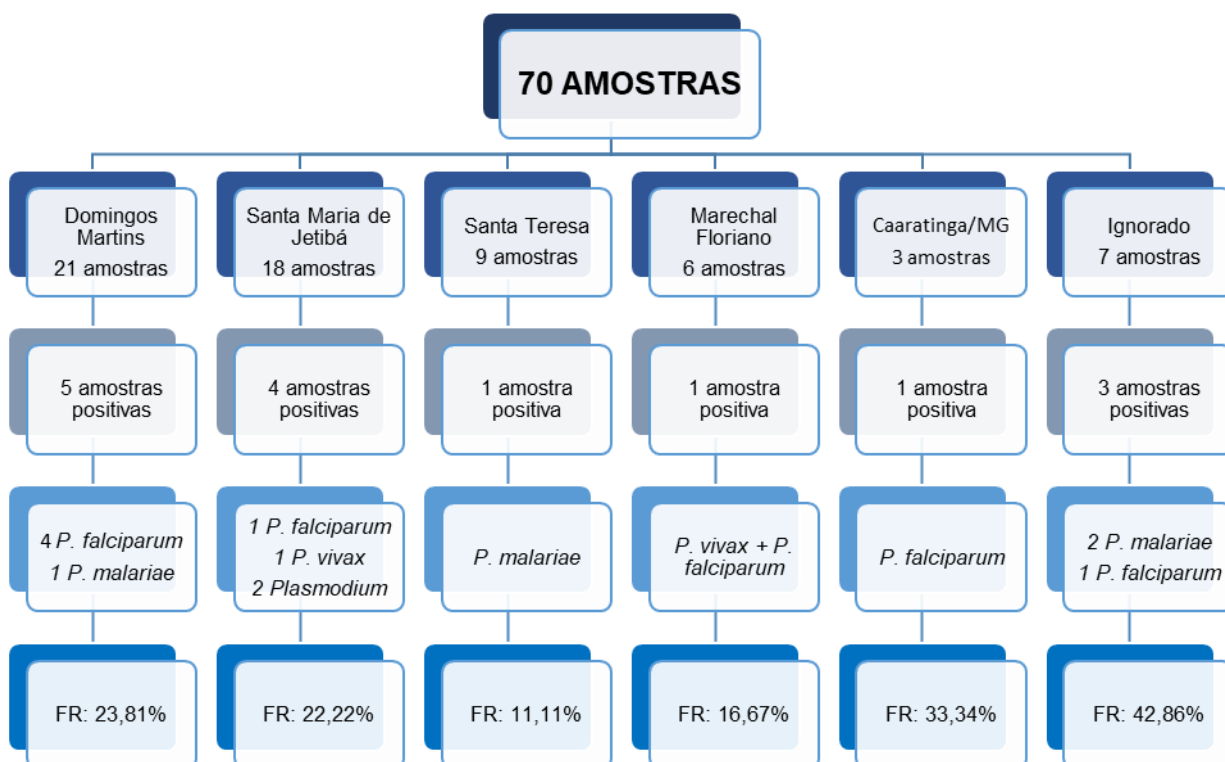
Código da Amostra	Espécie do <i>Plasmodium</i>	Município de Origem	Espécie do Símio
20170127CA01/F3	<i>P. falciparum</i>	Caratinga/MG	<i>Alouatta guariba</i>
20170309RFS05/F47	<i>P. falciparum</i>	Santa Maria de Jetibá	<i>Alouatta guariba</i>
20180111JMF03/F56	<i>P. falciparum</i>	Domingos Martins	<i>Alouatta guariba</i>
20180112MT01/F58	<i>P. falciparum</i>	Domingos Martins	<i>Alouatta guariba</i>
20180116MT03/F62	<i>P. falciparum</i>	Domingos Martins	<i>Alouatta guariba</i>
20180111JMF02/F63	<i>P. falciparum</i>	Domingos Martins	<i>Alouatta guariba</i>
20180116MT02/F64	<i>P. falciparum</i>	Ignorado	<i>Alouatta guariba</i>
20180121JMF01/F25	<i>P. malariae</i>	Ignorado	<i>Alouatta guariba</i>
20180105JMF02/F31	<i>P. malariae</i>	Domingos Martins	<i>Alouatta guariba</i>
20180121MT03/F33	<i>P. malariae</i>	Ignorado	<i>Alouatta guariba</i>
20170127RR04/F65	<i>P. malariae</i>	Santa Teresa	<i>Alouatta guariba</i>
20170207AFS02/F57	<i>P. vivax</i>	Santa Maria de Jetibá	<i>Alouatta guariba</i>
20180117JMF01/F59	<i>P. vivax e P. falciparum</i>	Marechal Floriano	<i>Alouatta guariba</i>
20170321BP01/F4	<i>Plasmodium sp</i>	Santa Maria de Jetibá	<i>Alouatta guariba</i>
20170321JBS01/F9	<i>Plasmodium sp</i>	Santa Maria de Jetibá	<i>Alouatta guariba</i>
TOTAL	15	15	15

Acervo Pessoal, 2018.

Assim, ao ser considerada a espécie *Alouatta guariba* como origem de todas as amostras positivas, das 15 amostras resultantes, sete o foram para *P. falciparum* (46,67%), quatro para *P. malariae* (26,67%), uma para *P. vivax* (6,67%), uma para *P. falciparum e P. vivax* (6,67%) concomitantemente e duas para o gênero *Plasmodium* (13,33%).

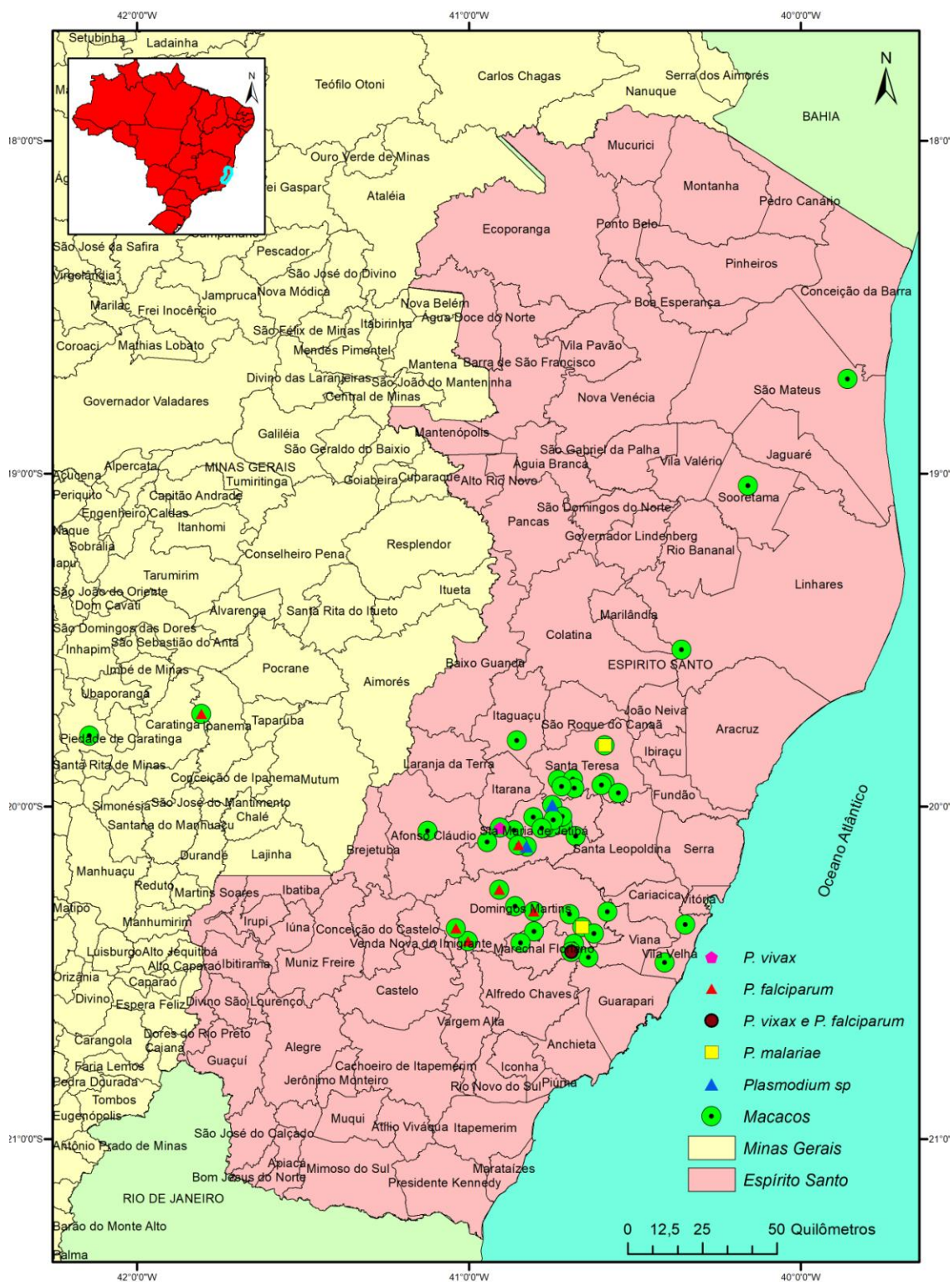
Das 70 amostras, 21 eram de Domingos Martins, 18 eram de Santa Maria de Jetibá, nove eram de Santa Teresa, seis eram de Marechal Floriano e três eram de Caratinga/MG. O número de amostras positivas para cada município acima citado está descrito no fluxograma 1, abaixo. As frequências relativas dos resultados positivos, tomando-se como denominador o número total de amostras em cada município, foram de 23,81% para Domingos Martins, 22,22% para Santa Maria de Jetibá, 11,11% para Santa Teresa, 16,67% para Marechal Floriano e 33,34% para Caratinga/MG.

Fluxograma 1 – Detalhamento das amostras positivas para DNA de *Plasmodium* obtidas de símios mortos por surto de febre amarela nos anos de 2016 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG, incluindo frequência relativa (FR) por município.



Acervo Pessoal, 2018.

O mapa abaixo é a representação geográfica de 63 amostras de fígado coletadas e analisadas, já que as outras sete tinham município de procedência ignorado. Dada a grande quantidade de amostras representadas no mapa, houve uma inevitável sobreposição dos pontos.



Elaborado pelo programa ArcGis 10.3.1, 2019.

Figura 6 - Representação gráfica da distribuição das amostras de fígado coletadas de símios mortos por febre amarela nos anos de 2014 a 2018 em municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG de acordo com a sua procedência.

6. DISCUSSÃO

Este estudo representa um importante passo em busca de um melhor entendimento sobre a dinâmica da malária residual de sistemas de Mata Atlântica e sua relação com a malária que infecta primatas não humanos. Os estudos mais recentes apontam os símios como um provável reservatório da doença, o que tornaria possível a sua condição de zoonose^{91,97,120,121}.

A positividade encontrada por meio da extração de DNA de *Plasmodium* e amplificação por PCR realizados nas amostras de fígado de símios mortos sugere que a ocorrência de casos de malária humana nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo, assim como em outras áreas de Mata Atlântica, pode estar relacionada à malária símia.

A positividade encontrada nesse estudo encontra similaridade com aquela do estudo publicado por Abreu *et al*⁹¹, que realizaram avaliação análoga nas áreas de Mata Atlântica do Rio de Janeiro e estados vizinhos em 2019. Seus resultados foram positivos em 25% das amostras de DNA de *Plasmodium*, sendo todas de símios do gênero *Alouatta* (*Alouatta guariba clamitans*)⁹¹. Deane, por sua vez, conforme o que foi registrado em artigo publicado em 1992, ao examinar 4.585 primatas não humanos, encontrou o parasito no sangue de 655 animais (14,3%)⁸².

As únicas duas amostras positivas para *P. vivax* encontradas no presente estudo (13,33%) contrastam com a frequência em que a espécie foi detectada por Abreu *et al* (50%), sendo, ainda, inferior a encontrada nas regiões Sul e Sudeste, que têm porcentagens de 42,4% e 37,5%, respectivamente^{82,91,157,158}. A positividade para *P. malariae* observada foi de 26,67%, valor também inferior àquele de Abreu *et al* (50%)⁹¹. A discrepância observada nesses resultados pode ser devida ao tipo de amostra utilizada, já que, no presente estudo, foram utilizadas amostras de fígado apenas, enquanto Abreu *et al* utilizaram amostras de sangue de primatas não humanos vivos ou recentemente mortos, além de amostras hepáticas e de baço daqueles encontrados mortos em sua área de estudo⁹¹. Isso permitiu, possivelmente, a detecção do *Plasmodium* em diferentes estágios do seu ciclo biológico.

Um ponto importante a ser citado, no entanto, é que, diferentemente do estudo realizado por Abreu *et al*, que não encontrou qualquer amostra positiva para *P. falciparum*, o presente estudo identificou, surpreendentemente, a presença de sete amostras com presença isolada desta espécie e uma amostra com infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*. Isso pode significar que tem ocorrido, ao contrário do que se imaginava, circulação de *P. falciparum* nas áreas de Mata Atlântica, uma questão que precisará ser estudada e analisada melhor posteriormente, pelo sequenciamento do DNA de *Plasmodium* encontrado nessas amostras.

Os estudos realizados sobre a malária símia ao longo dos últimos anos têm demonstrado que os espécimes do gênero *Alouatta* são os primatas não humanos mais parasitados pelos *P. simium* e *P. brasilianum* nas regiões Sul e Sudeste^{82,91}. O mesmo foi observado no presente estudo, já que todas as 15 amostras positivas foram de primatas da espécie *Alouatta guariba*. Além da clara susceptibilidade à infecção malárica, os macacos bugios têm comportamento acrodendrofilico, ou seja, têm preferência por viver nas copas das árvores, além de possuírem corpos relativamente grandes e apresentar maior lentidão para se movimentar, fatores que podem torna-los mais expostos aos vetores da doença^{82,159}.

Recentemente, DNA de *P. simium* foi encontrado também em primatas não humanos dos gêneros *Cebus* e *Sapajus*, no Sudeste, e DNA de *P. brasilianum* foi identificado em símios dos gêneros *Cebus*, *Callicebus* e *Callithrix*, pertencentes às famílias *Callitrichidae* e *Cebidae*, no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, também no Sudeste^{84,86}. O papel desses símios como reservatório para a malária residual ainda precisa ser melhor esclarecido, sobretudo porque estudos anteriores não os encontraram infectados ou não conseguiram promover a infecção malárica experimentalmente neles^{82,88,157}. Portanto, é possível que a participação desses primatas não humanos na cadeia de transmissão da malária residual seja pequena.

A positividade para *P. malariae* (26,67%) encontrada no presente estudo foi superior à de *P. vivax* (13,33%). Abreu *et al* encontraram positivities idênticas para essas duas espécies de *Plasmodium* (50%) em suas coletas, identificando seis amostras para *P. vivax* e seis para *P. malariae* em 12 positivas⁹¹. Esses resultados divergem em relação ao fato de que os casos humanos de malária no Espírito Santo, bem como nos outros estados da região Sudeste, têm sido sempre atribuídos ao *P. vivax*

por tantos anos^{68,69,74,160,161}. No entanto, Cerutti *et al* identificaram, em um estudo conduzido na região montanhosa do Espírito Santo, região extra-Amazônica endêmica para malária, residentes assintomáticos com porcentagens de anticorpos IgM e IgG para *P. malariae* de 30,1% e 56,5%, respectivamente⁶⁸. Nas reações de PCR multiplex, 15 de 48 amostras analisadas foram positivas para *P. malariae*⁶⁸. Em outro estudo conduzido no Espírito Santo, Alencar *et al* encontraram incidência idêntica (1,25 infecções por 100 pessoas-ano) para ambas as espécies de *Plasmodium* (*P. vivax* e *P. malariae*)¹⁶². Em um estudo conduzido em Guapimirim, no estado do Rio de Janeiro, seis casos de infecção em seres humanos sem sintomatologia foram positivos para *P. malariae* e 30,9% dos residentes locais possuíam anticorpos contra antígeno de superfície eritrocitária de *P. malariae*¹⁶³. A possibilidade dessas infecções terem origem nos símios é sugerida pelo fato de não haver qualquer caso de malária humana importada que pudesse servir como introdutor em Guapimirim. Além disso, essas infecções ocorreram em locais próximos a regiões de Mata Atlântica¹⁶³.

Na região Amazônica, casos de malária símia causados por *P. brasilianum* ocorrem comumente^{82,85,164,165}. Além disso, pessoas que estão frequentemente em contato com as florestas da Amazônia no Brasil, na Venezuela e na Guiana Francesa têm alta frequência de anticorpos contra *P. malariae*, outro fato que apoia a hipótese da transmissão desse *Plasmodium* de primatas não humanos para o homem^{125,164}.

Um dos fatores que tornam complexa a cadeia de transmissão da malária extra-Amazônica é a participação dos portadores assintomáticos. Eles representam os personagens principais de uma teoria alternativa à possibilidade da sustentação de tal transmissão por meio do reservatório símio. A constante ocorrência de indivíduos assintomáticos na infecção malárica é bem conhecida e documentada, assim como seu papel na cadeia de transmissão da doença. Sua frequência, no entanto, vai depender do nível de endemicidade^{68,69,71,162,166,167,168,169}. Muitas vezes, a parasitemia desses pacientes é tão baixa que só pode ser identificada por técnicas moleculares, o que dificulta a identificação dos casos e frustra os esforços para controlar a doença^{71,168}.

Cerutti *et al* analisaram, em seu estudo realizado em áreas de baixa incidência de malária no estado do Espírito Santo, o sangue de 1.527 residentes assintomáticos,

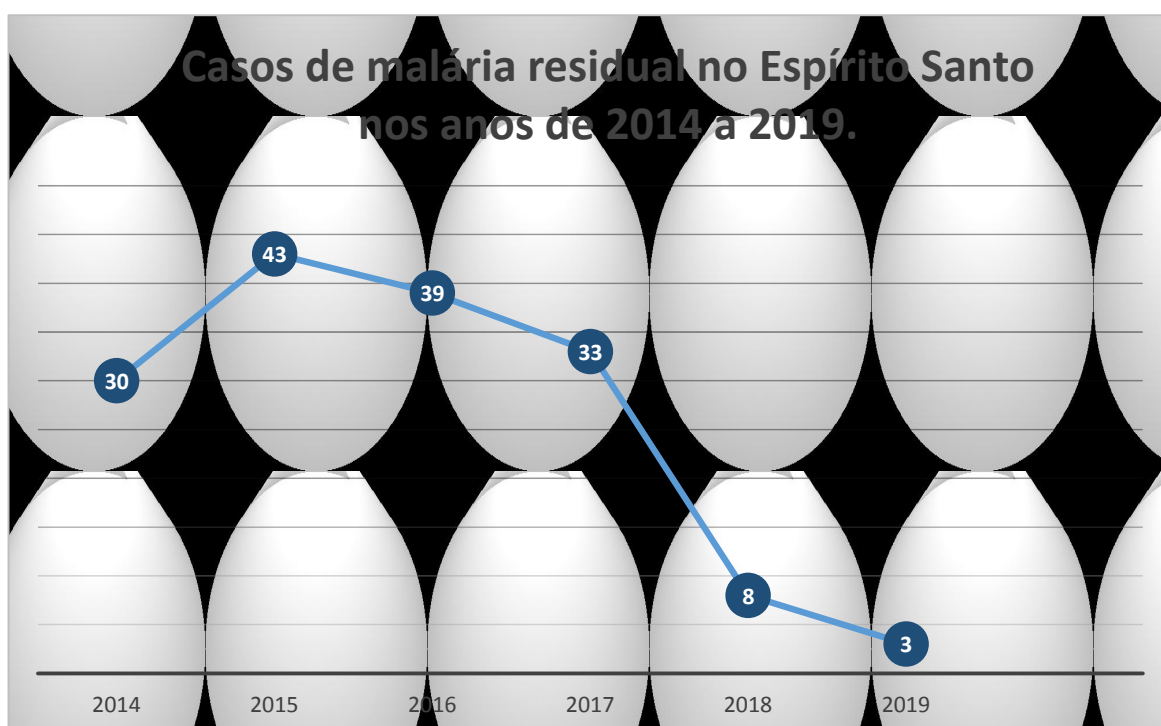
identificando DNA de *Plasmodium* em 48 deles (23 amostras positivas para *P. vivax* e 15 para *P. malariae*), o que correspondeu a uma prevalência de 3,1%⁶⁸. Em outro estudo, Alencar *et al.* encontraram, em indivíduos moradores nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo, uma prevalência inicial de residentes assintomáticos positivos para DNA de *Plasmodium* de 3,4%, frequência quase idêntica àquela encontrada por Cerutti *et al.* Na primeira avaliação de acompanhamento de tais residentes, um indivíduo foi positivo para *P. vivax*, um para *P. malariae* e um para *P. vivax* e *P. malariae* simultaneamente. Posteriormente, quatro novos casos foram registrados, dois para *P. vivax* e dois para *P. malariae*¹⁶².

Sabidamente, as infecções por *P. malariae* podem persistir por muito mais tempo do que as causadas por *P. vivax*, já que os primeiros parecem ser mais adaptados aos seus hospedeiros¹⁷⁰. Portanto, a frequência de infecção por *P. malariae* pode não ser adequadamente percebida porque dela decorre menor expressão clínica do que a que é advinda da infecção por *P. vivax*^{68,170}.

Diante do exposto, seria correto esperar, portanto, a ocorrência de casos de malária humana por *P. malariae* no Espírito Santo, bem como nos outros estados da região Sudeste, principalmente se considerarmos que o vetor de transmissão, o *Anopheles cruzii*, é o mesmo⁶⁹. Assim, é recomendado que os profissionais dos setores de Vigilância em Saúde sejam alertados para a possibilidade de ocorrência de infecções por *P. malariae*, bem como residentes e visitantes dos municípios próximos de áreas de Mata Atlântica, para que se possa avaliar sua participação na cadeia de transmissão da malária residual de sistemas de Mata Atlântica, no sul e no sudeste do Brasil.

As amostras de fígado utilizadas nesse estudo foram obtidas de símios mortos no surto de febre amarela registrado nos estados da região Sudeste do Brasil nos anos de 2016 a 2018. Essas epizootias atingiram amplamente os primatas não humanos desses estados, principalmente os do gênero *Alouatta*, matando centenas de animais e causando impacto considerável em suas populações¹⁷¹. É plausível supor, então, que esses óbitos acabem por influenciar a dinâmica da transmissão da malária residual na região, possivelmente a médio ou a longo prazo. Abreu *et al* apontam, em seu estudo, uma diminuição significativa de casos autóctones de malária nos anos de 2018 e 2019 em relação aos anos de 2006 a 2014^{74,91,172}. O

número de casos de malária autóctone residual no Espírito Santo parece seguir o mesmo padrão de declínio. Em 2015, houve a notificação de 43 casos de infecção malárica autóctone residual no estado e, em 2016, 39 casos. No ano de 2017, ocorreram 33 casos de malária residual, enquanto em 2018, oito casos ocorreram e, em 2019, apenas três casos (Figura 5)¹⁷³.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019.

Figura 7 - Casos de malária autóctone residual no estado do Espírito Santo nos anos de 2014 a 2019.

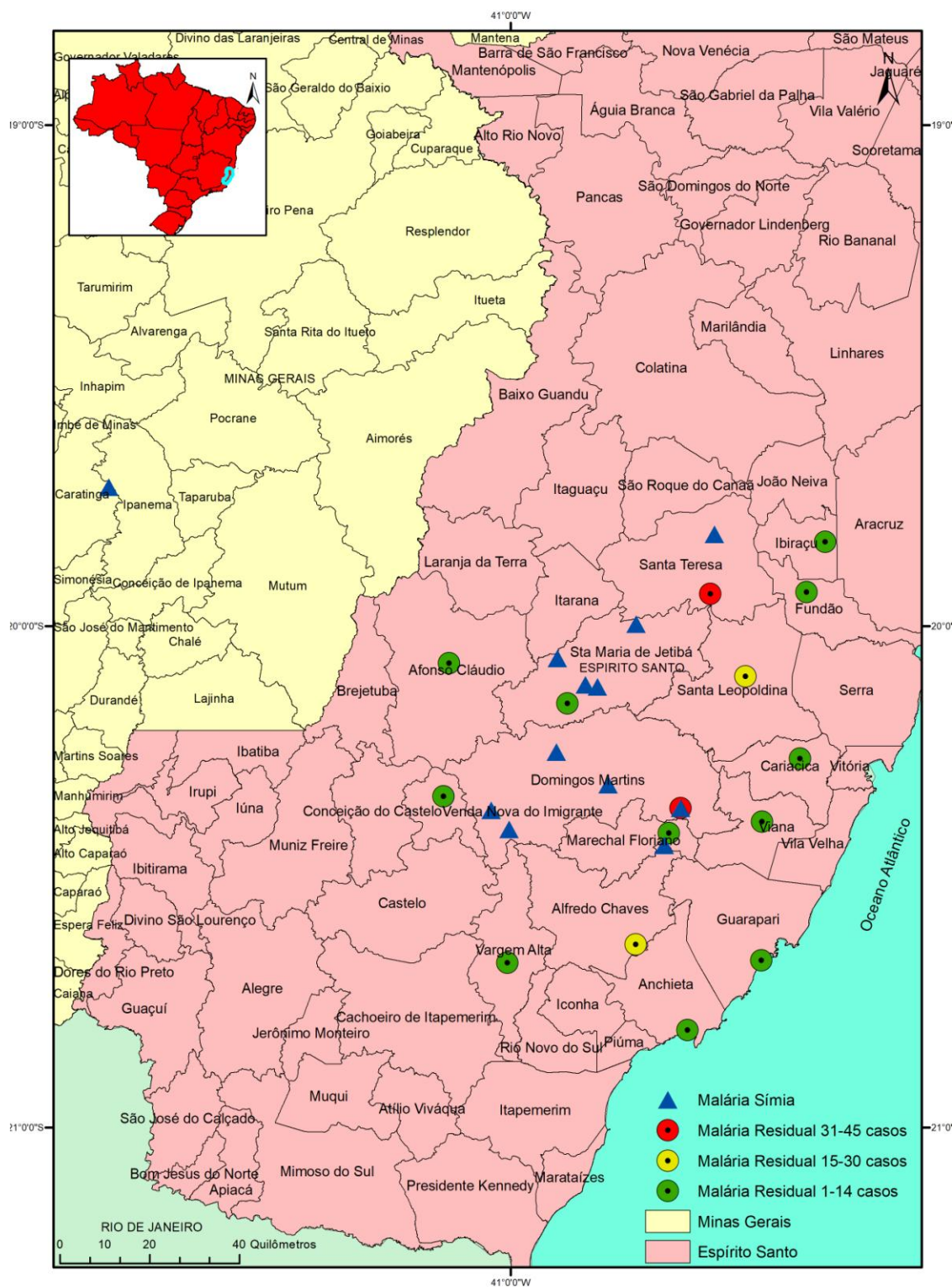
Se o número de casos de malária autóctone em regiões de Mata Atlântica depende realmente do reservatório representado pelos primatas não humanos, o seu papel na transmissão de tal malária residual será revelado a partir da redução do seu número. Serão necessárias, no entanto, análises e observações em anos posteriores para mensurar corretamente o impacto do óbito de símios ocorridos no último surto de febre amarela sobre a transmissão da malária residual e, conseqüentemente, o papel por eles desempenhado em sua dinâmica.

Outro ponto importante a ser discutido é a verificação da sobreposição da malária humana e da malária símia nos municípios com amostras de fígado positivas para DNA de *Plasmodium*. Foram encontradas amostras hepáticas positivas em símios da espécie *Alouatta guariba* em quatro dos 15 municípios do Espírito Santo que registraram casos de malária autóctone residual nos últimos seis anos (2014 a 2019)¹⁷³(Tabela 4 e Figura 5). Abreu *et al*, em 2019, observaram que, dos onze municípios que relataram casos de malária autóctone residual nos últimos anos no estado do Rio de Janeiro, em cinco foi detectado DNA de *P. vivax/simium* em símios da espécie *Alouatta g. clamitans*⁹¹. A menor sobreposição entre a malária humana residual e a malária símia observada no presente estudo em relação ao de Abreu *et al* pode ter ocorrido devido à diferença nos tipos de amostras colhidas e analisadas por eles, como já relatado anteriormente.

Tabela 4 - Municípios do Espírito Santo com casos registrados de malária autóctone residual nos anos de 2014 a 2019 e com amostras de fígado positivas para DNA de *Plasmodium*.

Municípios	Anos						Amostras Positivas
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	
Afonso Cláudio	1	0	1	0	1	0	zero
Anchieta	0	0	0	1	0	0	zero
Alfredo Chaves	4	4	5	5	0	0	zero
Cariacica	1	0	0	2	0	0	zero
Guarapari	0	1	0	1	0	0	zero
Domingos Martins	2	12	8	8	3	0	5 amostras
Fundão	2	1	1	0	0	0	Zero
Ibiraçu	0	4	0	0	1	0	Zero
Marechal Floriano	2	4	3	1	0	0	1 amostra
Santa Leopoldina	4	5	3	4	2	1	zero
Santa Teresa	11	8	18	6	0	2	1 amostra
Santa Maria de Jetibá	2	0	0	0	0	0	4 amostras
Vargem Alta	0	1	0	0	0	0	zero
Venda Nova do Imigrante	1	3	0	5	0	0	zero
Viana	0	0	0	0	1	0	zero
TOTAL	30	43	39	33	8	3	11 amostras

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde e acervo pessoal, 2019.



Elaborado pelo programa ArcGis 10.3.1, 2019.

Figura 8 - Ocorrência da malária símia, segundo positividade das amostras de fígado dos símios mortos coletados nos municípios do Espírito Santo e em Caratinga/MG e os casos de malária autóctone residual registrados no Espírito Santo de 2014 a 2019.

Curiosamente, o município de Caratinga, em Minas Gerais, apesar de fornecer três das 70 amostras de fígado de símios coletadas, sendo uma positiva para *P. falciparum*, não registrou qualquer caso de malária autóctone residual nos últimos seis anos¹⁷⁴. Além disso, Santa Maria de Jetibá, que contou com quatro amostras positivas para DNA de *Plasmodium*, não registrou qualquer caso de malária residual nos anos de 2014 a 2019¹⁷³.

Deve-se ressaltar, ainda, o fato de que, como mostra a Tabela 4, não houve coleta de símios mortos e, conseqüentemente, de amostras de fígado, em todos os municípios que registraram, nos anos de 2014 a 2019, casos de malária autóctone residual e, portanto, não é possível descartar ou confirmar a sobreposição entre malária símia e humana residual nos municípios onde não houve coleta. Estudos posteriores nesses municípios, ou mesmo em todos os municípios do Espírito Santo que registram com frequência casos de malária residual, podem auxiliar na elucidação dessas questões.

Além disso, em outros inquéritos e investigações que possam vir a ser realizados para melhorar o entendimento sobre a malária residual, onde ocorrerá, possivelmente, a coleta de material biológico de primatas não humanos, deve-se considerar, comparativamente, os diversos métodos de coleta existentes, invasivos e não invasivos, bem como suas principais características, além de suas vantagens e desvantagens.

A abordagem utilizada no presente estudo, com amostras de fígado obtidas de símios mortos, é considerada invasiva e apresenta limitações impostas pela própria condição de óbito do animal. A positividade para DNA de *Plasmodium* encontrada em amostras de tecido hepático não significa necessariamente que o parasito exista no estágio eritrocítico, pois esse DNA pode derivar de parasitos em estágios pré-eritrocíticos. Assim sendo, a técnica de PCR utilizada no presente estudo poderia amplificar o DNA do estágio pré-eritrocítico dos parasitos, em vez daquele da infecção sanguínea propriamente dita¹⁷⁵. A caracterização molecular e biológica das formas pré-eritrocíticas do parasito pela amostragem hepática invasiva *pos mortem* não implica em evidência do desenvolvimento do parasito nos eritrócitos¹⁷⁶.

Técnicas não invasivas, que permitem a detecção de infecções por *Plasmodium* a partir de amostras de fezes, urina e saliva, vêm sendo desenvolvidas ao longo dos últimos anos. Elas podem obter alta precisão, com níveis mínimos de inconveniência para os pacientes ou animais envolvidos. Nwakanma *et al* demonstraram, em 2009, que a PCR em tempo real era capaz de amplificar DNA de *P. falciparum* em diversos materiais biológicos¹⁷⁷. Embora tenha apresentado melhor desempenho no sangue, também foi bem sucedida em amostras de saliva e urina^{177,178,179,180}.

A utilização de amostras de fezes como material biológico possibilitou, recentemente, a descoberta de novas espécies de *Plasmodium* em primatas não humanos, apesar dos problemas relativos à deterioração do DNA presente nesse tipo de material biológico^{181,182,183}. A deterioração do material biológico fecal, além da amostragem repetida, torna essa técnica menos sensível do que as que utilizam sangue, urina e saliva^{93,177,184}. Esses problemas estão sendo superados pelo uso de sequências mitocondriais para amplificar o DNA do parasito, já que pequenos fragmentos de genoma podem conter informações filogenéticas suficientes para identificar as espécies de *Plasmodium*. Essa técnica é, hoje, um dos principais recursos utilizados para a detecção e análise do *Plasmodium* em primatas não humanos, tendo ainda grande potencial em investigações epidemiológicas e nos estudos de genética de populações^{93,181,185,186}.

Outra limitação do presente estudo é a coleta de amostras por conveniência, aproveitando-se da morte de símios durante uma epizootia. O aproveitamento não aleatório do símio morto para coleta de material biológico foi acrescido, em limitação, pela frequente ausência de informações sobre seus hábitos e sua procedência. Sete amostras tinham município de procedência ignorado, o que prejudicou a análise final de frequência e distribuição, bem como o mapeamento das ocorrências. Como, em algumas ocasiões, não se dispunha das coordenadas geográficas exatas dos locais de coleta dos símios mortos, optou-se, nesses casos, pelo uso das coordenadas geográficas das sedes dos municípios, para a elaboração dos mapas.

Diante do exposto, fica claro que há fortes evidências de que a malária residual de sistemas de Mata Atlântica pode ter um componente zoonótico responsável por auxiliar em sua cadeia de transmissão, tendo possivelmente os primatas não humanos, principalmente do gênero *Alouatta*, como principal reservatório da doença.

Por meio da pesquisa de DNA de *Plasmodium* em amostras hepáticas de primatas não humanos mortos no último surto de febre amarela registrado no Brasil, este trabalho contribuiu para uma melhor compreensão da malária residual e sua relação com a malária símica ao descrever a ocorrência de infecção em primatas não humanos por *Plasmodium* e relacionar esses achados com a infecção malárica em humanos nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo com proximidade de áreas de Mata Atlântica.

Por fim, é importante relacionarmos todos os importantes resultados encontrados nesse estudo com o conceito de One Health. O papel de diversos fatores ambientais e da vida animal na transmissão e na dinâmica da malária residual de sistemas de mata atlântica da região extra-Amazônica parece óbvia e indiscutível, principalmente quando consideramos a relação que parece existir entre ela e a malária em primatas não humanos.

Fica clara também a necessidade premente de novos estudos e abordagens, possivelmente de caráter não invasivo, sobre a malária residual e sua relação com a malária símica, para que sejam esclarecidas as diversas questões inevitavelmente levantadas durante a realização deste estudo.

7. CONCLUSÕES

- ❖ DNA de *Plasmodium* foi identificado em amostras de fígado de símios mortos pela febre amarela em municípios da região montanhosa do estado do Espírito Santo, bem como em Caratinga, estado de Minas Gerais, por meio da extração e amplificação de DNA por PCR.
- ❖ Das 70 amostras analisadas, sete foram positivas para *P. falciparum* (10%), quatro para *P. malariae* (5,71%), uma para *P. vivax* (1,43%), uma para *P. vivax* e *P. falciparum* concomitantemente (1,43%) e duas para o gênero *Plasmodium* (2,86%).
- ❖ Os locais de ocorrência da malária símia na região montanhosa do Espírito Santo, encontrados por meio da procedência do símio morto, foram Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa e Marechal Floriano, bem como Caratinga, no estado de Minas Gerais.
- ❖ Os símios do gênero *Alouatta* parecem ser particularmente suscetíveis ao *Plasmodium*, podendo representar o principal reservatório para a malária residual de sistemas de Mata Atlântica nos municípios da região montanhosa do Espírito Santo, já que todas as amostras positivas para DNA de *Plasmodium* eram de símios da espécie *Alouatta guariba*.
- ❖ O grande número de óbitos de primatas não humanos resultante do último surto de febre amarela ocorrido em alguns estados brasileiros parece ter tido impacto considerável sobre a frequência de casos de malária residual de sistemas de Mata Atlântica, haja vista a queda acentuada no número de casos de infecção malárica autóctone residual observada nos últimos anos analisados. Serão necessário estudos e análises posteriores para comprovar tal comportamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashley EA, Phyo AP, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018. 391(10130): 1608-1621. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).
2. Amaral EF. Malária: *Aspectos históricos e utilização da Artemisinina em seu tratamento* [Monografia]. Minas Gerais: Universidade Federal de São João Del Rei; 2015 .
3. França TCC, Santos MG, Villar-Figueiroa JD. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. *Química Nova*. 2008; 31(5): 1271-1275. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500060>.
4. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. *Infec Dis Clin North Am*. 2004; 18 (2): 189-205. DOI: 10.1016/j.idc.2004.01.002.
5. Shiff C. Integrated approach to malaria control. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15 (2): 278-293. DOI: 10.1128/CRM.15.2.278-293.2002.
6. Capana E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? *Int Microbiol*. 2006; 9 (1): 69-74.
7. Deane LM. Os grandes marcos na história do controle da malária no Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop*. 1992; 25(2): 12-22.
8. Pinotti M. The biological basis for the campaign against the malaria vectors of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1951; 44 (6): 663-682. DOI: 10.1016/0035-9203(51)90003-x.
9. Marques AC, Gutierrez HC. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. *Rev Soc Brasil Med Trop*. 1994; 27 (3) 91-108.
10. Loyola CCP, Silva CJM, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Pan Am J Public Health*. 2002; 11 (4): 235-244. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/rpsp/2002.v11n4/235-244/>.

11. Marques AC. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol.* 1987; 3:166-170. DOI: 10.1016/0169-4758(87)90170-0.
12. Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. A malária no Brasil. *Cad Saúde Pub.* 1985; 1(1): 71-111.
13. Brasil. Ministério da Saúde. *Plano de intensificação das ações de controle de malária nos estados da Amazônia Legal.* Brasília, 2004.
14. World Health Organization. *Malaria.* Washington, 2002.
15. Brasil. Organização Pan-Americana de Saúde. *Avaliação da estratégia de controle integrado da malária no Brasil.* Brasília, 2001.
16. Tauil PL. *Avaliação de uma nova estratégia de controle da malária na Amazônia Brasileira* [tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2002.
17. Ladislau JLB, Leal MC, Tauil PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. *Epidemiol Serv Saude.* 2006; 15 (2): 9-20. DOI: 10.5123/S1679-49742006000200003.
18. Abdalla SH, Pasvol G. Malaria: a hematological perspective. *Ed Imperial College Press.* 2004; 4: 1-448. DOI: 10.1142/p290.
19. O'Brien SF, Delage G, Seed CR, Pilonel J, Fabra CC, Davison K *et al.* The epidemiology of imported malária and transfusion policy in 5 nonendemic countries. *Transfus Med Rev.* 2015; 29 (3): 162–171. DOI: 10.1016/j.tmr.v.2015.03.004.
20. Abdullah S, Karunamoorthi K. Malaria and blood transfusion: major issues of blood safety in malaria-endemic countries and strategies for mitigating the risk of *Plasmodium* parasites. *Parasitol Res.* 2016; 115 (1): 35–47. DOI: 10.1007/s00436-015-4808-1.
21. Faust C, Dobson AP. Primates malarias: diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium.* *One Health.* 2015; 1: 66-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.10.001>

22. Ramasamy R. Zoonotic malária – global overview and research and policy needs. *Front Pub Health*. 2014; 2:123. DOI: <http://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00123>.
23. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004; 363: 1017-1024. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4).
24. Sabatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(3): 299-309. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702010000300019>.
25. Marcos GR, Munoz JMR, Olivencia GR, Bujalance SG, Romano RE, Diaz – Menéndez M, et al. Comparison of imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among patients in Spain, 2005-2011. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(3): 409-416. DOI 10.3201/eid2003.130745.
26. Fueher HP, Noedl H. Recent advances in detection of *P. ovale*: implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(2): 387-391. DOI 10.1128/JCM.02760-13.
27. Milner-Junior DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018; 8(1): pii: a025569. DOI: 10.1101/cshperspect.a02556.
28. Aravind L, Lyer LM, Wellems TE, Miller LH. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell*. 2003; 115 (7):771-785. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)01023-7.
29. Josling GA, Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13 (9): 573–587. DOI: 10.1038/nrmicro3519.
30. Centers for Disease Control and Prevention [<https://www.cdc.gov>]. *Malaria* [acesso em 2019 agosto 21]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/parasite/malaria/biology/life_cycle.htm].
31. White NJ, Farrar J. Malaria. *Manson's Tropical Diseases*. 23rd ed. London: Elsevier; 2013.

32. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24 (2): 377–410. DOI: 10.1128/CRM.00051-10.
33. Mawson AR. The pathogenesis of malária: a new perspective. *Pathog Glob Health.* 2013; 107 (3): 122-129. DOI: 10.1179/2047773213Y.0000000084.
34. Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Canino X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding-proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 7085-7089. DOI: 10.1073/pnas.89.15.70.85.
35. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, Van Huijsduijnen RH, Van VoorhisWC, Poços TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17050. DOI: 10.1038/nrdp.2017.50.
36. Culleton R, Carter R. African *Plasmodium vivax*: distribution and origins. *Int J Parasitol.* 2012; 42(12):1091-1097. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.08.005.
37. Mito LD, Galhardi LCF, Amarante MK. Parasitological and immunological aspects of malaria. *Biosaúde.* 2012; 14(1): 44-55.
38. Genton B, D'Acremont V. Clinical features of malaria in returning travelers and migrants. Travelers' malaria. *Schlagenhauf P.* 2001; 371-392.
39. Murphy GS, Oldfield EC. *Falciparum* malaria. *Infect Dis Clin North Am.* 1996; 10 (4): 747-775. DOI: 10.1016/s0891-5520(05)70325-1.
40. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília, 2010. *Série A. Normas e manuais técnicos.*
41. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care.* 2003; 7(4): 315-323. DOI:10.1186/cc2183.
42. Pan American Health Organization. *Report on the situation of malaria in the Americas.* Washington; 2016.
43. Phillips A, Bassett P, Zeki S, Newman S, Pasvol L. Risk factors for severe illness

in adults with malaria falciparum. *Clin Infect Dis*. 2009; 48 (7): 871-878. DOI 10.1086/597258.

44. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Bedos JP *et al*. The clinical spectrum of severe imported falciparum malaria in the ICU: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167 (5): 684-689. DOI: 10.1164/rccm.200206-631OC.

45. Blumberg L, Lee RP, Lipman J, Beards S: Predictors of mortality in severe malaria: a two year experience in a non-endemic area. *Anaesth Intensive Care*. 1996; 24 (2): 217-223. DOI: 10.1177/0310057X9602400213.

46. Schwartz E, Sadetzki S, Murad H, Raveh D. Age as a risk factor for severe *Plasmodium falciparum* malaria in nonimmune patients. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (10): 1774-1777. DOI: 10.1086/322522.

47. Camargo EP. Malária, Maleita, Paludismo. *Cienc. Cult. São Paulo*. 2003; 55 (1): 26-30.

48. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15 (4): 564-594. DOI: 10.1128/CRM.15.4.564-594.2002.

49. Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molineux CS, Obiero JO, Palmer A *et al*. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet*. 1997; 349 (7): 1650-1654. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)020038-2.

50. World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990; 84 (2): 1-65. DOI: 10.1016/0035-9203(90)90363-J.

51. World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94 (1): 1-90. DOI: 10.1016/S0035-9203(00)90300-6.

52. World Health Organization. *Management of severe malaria: a practical handbook*. 3rd ed. Geneva: WHO; 2012.

53. Gomes AP. Malária grave. *J Bras Med.* 2000; 79(5/6): 68 - 76.
54. Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ *et al.* Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (2): 511-516. DOI:1073/pnas.1119058109.
55. Russel PF. The United States and malaria: debits and credits. *Bull N Y Acad Med.* 1968; 44(6): 623-653 PMID: 4870692.
56. Bruce-Chwatt LJ, Zuleta J. The rise and fall of malaria in Europe: a historical-epidemiological study. *Oxford Univ Press.* 1980; 246 (10): 1133. DOI: 10.1001/jama.1981.0332010006704.
57. Cambournac FJ. Contribution to the history of malaria epidemiology and control in Portugal and some other places. *Parasitology.* 1994; 36 (1-2): 215-222. PMID: 7898957.
58. Carter R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in Parasitology.* 2003; 19 (5): 214-219. PMID: 12763427.
59. Li J, Collins WE, Wirtz RA, Rathore D, Lal A, McCutchan TF. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7 (1): 35-42. DOI: 10.3201/eid0701.010105.
60. Cormier LA. The historical ecology of human and wild primate malarias in the new world. *Diversity.* 2010; 2: 256-280. DOI: 10.3390/d2020256.
61. World Health Organization. *World Malaria Report 2019.* Geneva: WHO; 2019.
62. Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM *et al.* Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable controls strategies. *Acta Trop.* 2012; 121(3): 281-291. DOI 10.1016/j.actatropica.2011.10.001.
63. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Mal J.* 2016; 15:284. DOI: 10.1186/s12936-016-1335-1.

64. Cohen JM, Smith DL, Cotter C, Ward A, Yamey G, Sabot AJ et al. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. *Mal J.* 2012; 11:122. DOI: 10.1186/1475-2875-11-122.
65. Silva GS, Richards GA, Baker T, Hidalgo J, Jiménez JIS, Amim P. Zika virus: Report from the task force on tropical diseases by the world Federation of Societies of intensive and critical care medicine. *J Crit Care.* 2018; 46: 106-109. DOI: 10.1016/j.jcsrc.2018.03.030.
66. Jiménez-Munõz JC, Mattar C, Barichivich J, Santamaráa-Artigas A, Takahashi K, Malhi Y et al. Record-breaking warming and extreme drought in the Amazon rainforest during the course of El Niño 2015-2016. *Sci Rep.* 2016; 6:33130. DOI: 10.1038/srep.33130.
67. Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto JA. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogens Globl Health.* 2019; 113 (1): 1-13. DOI: 10.1080/20477724.2019.1581463.
68. Cerutti Junior C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCLD, Falqueto A, Rezende HR et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Mal J.* 2007; 6:33. DOI: 10.1186/1475-2875-6-33.
69. Curado I, Malafronte RS, Duarte AMRC, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EAB. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* 2006; 100 (1-2): 54-62. DOI: 10.1016/j.actatropica.2006.09.010.
70. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38 (2): 223-230. DOI: 10.4269/ajtmh.1988.38.223.
71. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101 (3): 229–237. DOI: 10.1590/s0074-02762006000300001.
72. Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81 (2): 5-14. DOI: 10.1590/S0074-02761986000600002.

73. Packard RM. The making of a tropical disease: a short history of malaria. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14 (10): 1679. DOI: 10.3201/eid1410.080834.
74. Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araújo MP, Súañez-Mutiz MC, Santelli ACFS. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109 (5): 618-634. DOI 10.1590/0074-0276140228.
75. Organização Pan-Americana da Saúde. Situação dos programas de malária nas Américas. *Informe 39*. Washington; 1991.
76. Barata RCB. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cad Saude Publica*. 1995; 11 (1): 128-136. DOI: 10.1590/S0102-311X1995000100019.
77. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico n^o 12/2019. Brasília, 2019. *Informes*.
78. Portal da Saúde [Homepage da Internet]. Brasília. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. *Saúde de A a Z/Malária*. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>.
79. Halberstaedter L, Prowzer S. Untersuchungen über die malarieparasiten der affen. *Arch K Gesundh*. 1907; 26: 37-43.
80. Mayer M. Ueber malaria beim affen. *Mec Klin Berl*. 1907; 3: 579-580.
81. Mayer M. Ueber malaria parasiten bei affen. *Arch F Protist*. 1908; 12: 314-321.
82. Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87 (suppl III): 1-20.
83. Fonseca F. Plasmódio de primata do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1951; 49: 543-551.
84. Alvarenga DAM, Pina-Costa A, Bianco Junior C, Moreira SB, Brasil P, Pissinatti A *et al*. New potential *Plasmodium brasilianum* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). *Mal J*. 2017; 16:71. DOI: 10.1186/s12936-017-1724-0.

85. Lourenço-de –Oliveira R, Deane LM. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon: I-The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90 (3): 331-339. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761995000300004>.
86. Alvarenga DAM, Pina – Costa A, Sousa TN, Pissinati A, Zalis MG, Suárez – Mutis MC, et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Mal J*. 2015; 14:81. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0606-6>.
87. Deane LM, Deane MP, Ferreira-Neto JA. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull W H O*. 1966; 35 (5): 805-808. PMID: 5297817.
88. Deane LM. Studies on simian malaria in Brazil. *Bull W H O*. 1964; 31 (5): 752-754. PMID: 14278011.
89. Deane LM, Neto JF, Sitônio JG. A new natural host of *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*: the woolly spider monkey. *Rev Inst Med Trop*. São Paulo. 1968; 10(5): 287-288. PMID: 4974015.
90. Deane LM. Simian malaria survey in Brasil: a brief summary of data obtained in 1964-1971. *World Health Organization*. 1972. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65640>.
91. Abreu FVS, Santos ED, Mello ARL, Gomes RL, Alvarenga DAM, Gomes MQ et al. Howler monkeys are the reservoir of malaria parasites causing zoonotic infections in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13 (12): e000796. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007906.
92. Deane LM, Neto JAF, Deane MP, Silveira IPS. *Anopheles* (Kertessia) *cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Trans R Soc Trop Med Hig*. 1970; 64 (4): 647.
93. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010; 467 (7314):

420–425. DOI: 10.1038/nature09442.

94. Kaiser M, Lova A, Ulrich M, Ellerbrok H, Goffe AS, Blasse A *et al.* Wild chimpanzees infected with five *Plasmodium* species. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (12): 1956–1959. DOI: 10.3201/eid1612.100424.

95. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C *et al.* African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (4): 1458–1463. DOI: 10.1073/pnas.0914440107.

96. Downs WG, Pittendrigh CS. Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. *Am J Trop Med Hyg.* 1946; 26:47-66.

97. Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RS, Alves IC, Lima GFMC, Guimarães LO *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera:Culicidae) in peridomestic area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2014; 56 (5): 403-409.

98. Ribeiro MC. Principais doenças de primatas não humanos. *Ed Fiocruz.* 2002; 154-160.

99. Pereira WLA, Galo KR, Silva KSM, Soares MCP, Alves MM. Viral hepatitis, helminthiasis and protozoan disease in neotropical primates raised in captivity: potentially zoonotic affections with fecal-oral transmission. *Rev Pan-Amaz Saúde.* 2010; 1(3): 57-60. DOI: 10.5123/S2176-62232010000300008.

100. Heldstab A, Rüedi D, Sonnabend W, Deinhardt F. Spontaneous generalized Herpesvirus hominis infection of a lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Med Primatol.* 1981; 10 (2-3): 129-135. DOI: 10.1159/000460063.

101. Ramsay E, Stair EL, Castro AE, Marks MI. Fatal Herpesvirus hominis encephalitis in a white-handed gibbon. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 181 (11): 1429-1430. PMID: 6294039.

102. Goldberg TL, Gillespie TRG, Rwego IB, Wheeler E, Estoff EL, Chapman CA.

Patterns of gastrointestinal bacterial exchange between chimpanzees and humans involved in research and tourism in western Uganda. *Biol Cons.* 2007; 135 (4): 511-517. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.10.048.

103. Köndgen S, Kuhl H, N'Goran PK, Walsh PD, Schenk S, Ernst N *et al.* Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Curr Biol.* 2008; 18 (4): 260-264. DOI: 10.1016/j.cub.2008.01.012.

104. Choi YK, Simon MA, Kim BY, Yoon BI, Kwon SW, Lee SW *et al.* Fatal measles virus infection in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Vet Pathol.* 1999; 36 (6): 594-600. DOI: 10.1354/vp.36-6-594.

105. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science.* 1964; 149 (3686): 865. DOI: 10.1126/science.149.3686.865.

106. Sulistyaningsih E, Fitri LE, Loscher T, Berens-Riha N. Diagnostic difficulties with *Plasmodium knowlesi* infection in humans. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (6): 1033-1034. DOI: 10.3201/eid1606.100022.

107. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S *et al.* *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infec Dis.* 2008; 46 (2): 165-171. DOI: 10.1086/524888.

108. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10 (12): 2211-2213. DOI: 10.3201/eid1012.040293.

109. Ng OT, Ooi EE, Lee CC, Lee PJ, Ng LC, Pei SW *et al.* Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14 (5): 814-816. DOI: 10.3201/eid1405.070863.

110. Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P *et al.* Human infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (5): 811-813. DOI: 10.3201/eid1405.071407.

111. Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, Hung le X *et*

- al. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Mal J.* 2009; 8: 249. DOI: 10.1186/1475-2875-8-249.
112. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Mal J.* 2014; 13:68. DOI: 10.1186 / 1475-2875-13-68.
113. Goldman IF, Qari SH, Millet PG, Collins WE, Lal AA. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. *Mol Biochem Parasit.* 1993; 57: 177-80. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90257-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90257-X).
114. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:8124–8129. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8124>.
115. Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M *et al.* Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:14455–14460. DOI: 10.1073/pnas.0405186101.
116. Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15523–8. DOI: 10.1073/pnas.0507413102.
117. Tazi L, Ayala FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol.* 2011;11:209–21. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.08.007.
118. Fuentes-Ramirez A, Jimenez-Soto M, Castro R, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. Molecular detection of *Plasmodium malariae/Plasmodium brasilianum* in non-human primates in captivity in Costa Rica. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0170704. DOI: 10.1371/journal.pone.0170704.
119. Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol.* 1995;

12(4): 616-626. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040241.

120. Buery JC, Rodrigues PT, Natal L, Salla LC, Loss AC, Vicente CR *et al.* Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simium* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? *Mal J.* 2017; 16: 437. DOI: 10.1186/s12936-017-2080-9.

121. Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Júnior C, Silva S *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health.* 2017; 5: e1038-46.

122. Guerra CA, Snow RW, Si HA. A global assessment of closed forest, deforestation and malaria risk. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100(3):189-204. DOI: 10.1179/136485906X91512.

123. Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology.* 1993; 106(S1): S55-S75. DOI: 10.1017/s0031182000086121.

124. Duarte AM, Porto AM, Curado I, Malafronte RS, Hoffmam EH, Oliveiro SG *et al.* Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol.* 2006; 35 (2): 87-96. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x.

125. Lalremruata A, Magris M, Vivaz-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *Ebiomedicine.* 2015; 2 (9): 10.1016/j.ebiom.2015.07.033. eCollection 2015 Sep.

126. Farrugia C, Cabaret O, Boterell F, Bories C, Foulet F, Costa JM *et al.* Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in travelers. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (6): 2191-2195. DOI: 10.1128/JCM.02156-10.

127. Almeida-de-Oliveira NK, Moreira OC, Lavigne AR, Mendonça-Lima L, Werneck GL, Daniel-Ribeiro CT *et al.* Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 14: e180350.
128. Mann R, Sharma S, Mishara N, Valecha N, Anvikar AR. Comparative assessment of genomic DNA extraction. *J Vector Borne Dis.* 2015; 52(4): 273–280 PMID: 26714505.
129. Ebrahimzadeh A, Mohammadi S, Polshekan Mir A. Nested polymerase chain reaction (PCR) on fixed stained slides in comparison to whole blood as a source of DNA in southeast of Iran. *J Trop Dis.* 2014; 2(3): 136. DOI: 10.4172/2329-891X.1000136.
130. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health.* 2015; 109 (3): 142-152. DOI: 10.1179/2047773215Y00000000.
131. Gelabert P, Sandoval-Velasco M, Olalde I, Fregel R, Rieux A, Escosa R *et al.* Mitochondrial DNA from the eradicated European *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from 70-years old slides from the Ebro Delta in Spain. *Proc Natl Acad Sc USA.* 2016; 113 (41): 11495-11500. DOI: 10.1073/pnas.1611017113.
132. Tyagi S, Pande V, Das A. Whole mitochondrial genome sequence of an Indian *Plasmodium falciparum* field isolate. *Korean J Parasitol.* 2014; 52 (1): 99–103. DOI: 10.3347/kjp.2014.52.1.99.
133. Creasey A, Mendis K, Carlton J, Williamson D, Wilson I, Carter R. Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 65 (1): 95-98. DOI: 10.1016/0166-6851(94)90118-x.
134. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365(1541): 749-763. DOI: 10.1098/rstb.2009.0273.
135. Wilson RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997; 61(1): 1-16 PMID: PMC232597.

136. Preston MD, Campino S, Assefa SA, Echeverry DF, Amambua-Ngwa HOA, Stewart LB *et al.* A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. *Nature Communications*. 2014; 5:4052. DOI: 10.1038/ncomms5052.
137. World Health Organization [http://www.who.int]. *One Health* [acesso em 2019 set 26] . Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/onehealth/en/>.
138. Parent A. Felix Vicq d' Azyr: anatomy, medicine and revolution. *Can J Neurol Sci*. 2007; 34(1): 30-37. DOI: 10.1017/s0317167100018722.
139. Foege WH. *One World, one health, can we muddle through?* [acesso em 2019 set 26]. Disponível em : https://www.oneworldonehealth.org/sept2004/presentations/ever_foege.html.
140. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356 (1411): 983-989. DOI: 10.1098/rstb.2001.0888.
141. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow Fever. *J Clin Virol*. 2015; 64: 160-173. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.08.030.
142. Vasconcelos PFC. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Pública*. 2010; 44:1144–1149. DOI: 10.1590/S0034-89102010005000046.
143. Douam F, Ploss A. Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol*. 2018; 26 (11): 913-928. DOI: 10.1016/j.tim.2018.05.012.
144. Tauil PL. Aspectos críticos do controle da Febre Amarela no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2010; 44 (3): 555-558.
145. Organização Pan-Americana da Saúde [www.paho.org./bra/]. *Folha informativa – Febre Amarela* [acesso em 2019 out 2]. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875.

146. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. *Actualización epidemiológica: Fiebre Amarilla*. Washington, 2018.
147. Silva EDO, Santos AR, Silva KG. Estudo morfológico e climático dos municípios da região serrana do estado do Espírito Santo. *Caminhos de Geografia*. 2011; 12(39): 94-103.
148. Cerutti Junior C. *Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
149. Buery JC. *Soroprevalência e características epidemiológicas da toxoplasmose em área rural de Santa Teresa, Espírito Santo* [dissertação]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 2013.
150. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [www.ibge.gov.br]. *Cidades e estados* [acesso em 2019 set 27]. Disponível em: www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/html?
151. Estado de Minas Gerais [www.mg.gov.br]. *Conheça Minas* [acesso em 2019 set 27]. Disponível em: www.mg.gov.br/conheca-minas.
152. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [www.ibge.gov.br]. *Cidades e estados* [acesso em 2019 set 29]. Disponível em: www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/caratinga/html?
153. Prefeitura Municipal de Caratinga [www.caratinga.mg.gov.br]. *Localização e dados demográficos* [acesso em 2019 set 29]. Disponível em: www.caratinga.mg.gov.br/detalhe-da-materia/info/localizacao-e-dados-demograficos/6498.
154. Centro Universitário do Leste de Minas Gerais [www.unileste.edu.br]. *Plano Diretor de Desenvolvimento Integrado – PDDI - Região Metropolitana do Vale do Aço, suproduto P2.3, diagnóstico final*. Minas Gerais, 2014; 2: 270-494.
155. Bickersmith SA, Lainhart W, Moreno M, Chu VM, Vinetz JM, Conn JE. A

sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(4): 573-576. DOI 10.1590/0074-02760150031.

156. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species real time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(12): 5636-5643. DOI 10.1128/JCM.42.5636-5643.2004.

157. Duarte AMRC, Malafronte RS, Cerutti Junior C, Curado I, Paiva BR, Maeda AY et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008; 179-185. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.05.020.

158. Costa DC, Cunha VP, Assis GMP, Souza Junior JC, Hirano ZMB, Arruda ME et al. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109: 641–653. DOI:10.1590/0074-0276130578.

159. Kowalewski MM, Garber PA, Cortés-Ortiz L, Urbani B, Youlatos D. Howler monkeys behavior, ecology, and conservation. New York: *Springer*, 2014. 440 p. DOI:10.1007/978-14939-1960-4.

160. Gomes AC, De Paula MB, Duarte AMRC, Lima MA, Malafronte RS, Mucci LF et al. Epidemiological and ecological aspects related to malaria in the area of influence of the lake at Porto Primavera dam, in western São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2008; 50 (5): 287–295. DOI:10.1590/S0036-46652008000500008.

161. Brasil P, Costa AP, Longo CL, Da Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. *Mal J*. 2013;12: 402. DOI: 10.1186/1475-2875-12-402.

162. Alencar FEC, Malafronte RS, Cerutti Junior C, Fernandes LN, Buery JC, Fux B et al. Assessment of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil. *Mal J*. 2018;

17:113.

163. Miguel RB, Albuquerque HG, Sanchez MCA, Coura JR, Santos SS, Silva S, et al. Asymptomatic *Plasmodium* infection in a residual malaria transmission area in the Atlantic forest region: implications for elimination. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52: e-20180537. DOI: 10.1590/0037-8682-0537-2018.

164. Arruda M, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41: 379–385. DOI: 10.4269/ajtmh.1989.41.379.

165. Coatney GR. The simian malaria: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg.* 1971; 20 (6): 795–803. DOI: 10.4269/ajtmh.1971.20.795.

166. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66 (6): 641–648. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.66.641.

167. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Mal J.* 2005; 4:27. DOI: 10.1186/1475-2875-4-27.

168. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Mal J.* 2010; 9:115. DOI: 10.1186/1475-2875-9-115.

169. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Mal J.* 2012; 11:29. DOI: 10.1186/1475-2875-11-9.

170. Collins WE, Jefery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20 (4): 579–592. DOI: 10.11128/CRM.000.

171. Bicca-Marques JC, Calegari-Marques C, Rylands AB, Strier KB, Mittermeier RA, Almeida MAB et al. Yellow fever threatens Atlantic Forest primates. *Sci Adv.*

2017; 3 : e1600946. DOI: 10.1126/sciadv.1600946.

172. Departamento de Informática do SUS [www.datasus.saude.gov.br]. Brasília: Ministério da Saúde. TabNet Win32 3.0: MALÁRIA (RJ) - *Casos confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/malarj.def>.

173. Departamento de Informática do SUS [www.datasus.saude.gov.br]. Brasília: Ministério da Saúde. TabNet Win32 3.0: MALÁRIA (ES) - *Casos confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/malaES.def>.

174. Departamento de Informática do SUS [www.datasus.saude.gov.br]. Brasília: Ministério da Saúde. TabNet Win32 3.0: MALÁRIA (MG) - *Casos confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/malaMG.def>.

175. Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y *et al*. DNA from pre-erythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the faeces and blood of hosts. *Int J Parasitol*. 2014; 44(7): 467–473. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.03.002.

176. Lindner SE, Miller JL, Kappe SHI. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol*. 2012; 14 (3): 316–324. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01734.x.

177. Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E *et al*. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *J Infect Dis*. 2009; 199 (11): 1567–1574. DOI: 10.1086/598856.

178. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15 (1): 66-78. DOI: 10.1128/cmr.15.1.66-78.2002.

179. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE *et al*. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61 (2): 315-320. DOI: 10.1016/0166-

6851(93)90077-b.

180. Oyedeji SI, Awobode HO, Monday GC, Kendjo E, Kremsner PG, Kun JF. Comparison of PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* infections based on single and multicopy genes. *Mal J.* 2007; 6 (112): 1-6. DOI: 10.1186/1475-2875-6-112.

181. Prugnolle F, Ollomo B, Durand P, Yalcindag E, Arnathau C, Elguero E *et al.* African monkeys are infected by *Plasmodium falciparum* nonhuman primate-specific strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (29): 11948–11953. DOI: 10.1073/pnas.1109368108.

182. Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN *et al.* The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (35): 14902–4907. DOI: 10.1073/pnas.0907740106.

183. Prugnolle F, Ayala F, Ollomo B, Arnathau C, Durand P, Renaud F. *Plasmodium falciparum* is not as lonely as previously considered. *Virulence.* 2011; 2 (1): 71–76. DOI: 10.4161/viru.2.1.14608.

184. Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Mal J.* 2006; 5:103. DOI: 10.1186/1475-2875-5-103.

185. Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM *et al.* African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the Laverania subgenus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (23): 10561–10566. DOI: 10.1073/pnas.1005435107.

186. Sundararaman SA, Liu W, Keele BF, Learn GH, Bittinger K, Mouacha F *et al.* *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (17): 7020–7025. DOI: 10.1073/pnas.1305201110.

187. Siregar JE, Faust CL, Murdiyarso LS, Rosmanah L, Saepuloh U, Dobson AP *et al.* Non-invasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. *Mal J.*

2015; 14:404. DOI: 10.1186/s12936-015-0857-2.

188. De Nys HM, Calvignac-Spencer S, Boesch C, Dorny P, Wittig RM, Mundry R *et al.* Malaria parasite detection increases during pregnancy in wild chimpanzees. *Mal J.* 2014;13:413. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/13/1/413>.

9. ANEXO




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos ecológicos do surto de febre amarela silvestre no Espírito Santo"(Etapa 1)", Protocolo nº.38/2017, sob a responsabilidade de Sérgio Lucena Mendes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 21-07-2017.

Vigência do Projeto	Início: Setembro/2017 Término:Abril/2018
Espécie/Linhagem	Bugio(<i>Alouatta guariba</i>)Macaco do Novo Mundo(<i>Callicebus personatus</i>) Sagui(<i>Callithrix spp.</i>) Macaco Pregoi(<i>Sapajus spp.</i>)
Nº de Animais	Experimento Piloto: 0 Protocolo Experimental:0 Total:0
Peso/Idade	Peso: 0 Idade:0
Sexo	Ambos
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 21 de julho de 2017.



Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES