



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

JOMAR FAGUNDES JÚNIOR

MALÁRIA SÍMIA NA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO: DISTRIBUIÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *PLASMODIUM* A PARTIR DE  
FEZES DE PRIMATAS

Vitória

2021

JOMAR FAGUNDES JÚNIOR

MALÁRIA SÍMIA NA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO: DISTRIBUIÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *PLASMODIUM* A PARTIR DE  
FEZES DE PRIMATAS

Dissertação apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia das Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior

Coorientadora: Prof. Dra. Blima Fux

Vitória

2021

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

---

F151m Fagundes Júnior, Jomar, 1993-  
Malária símia na Mata Atlântica do Espírito Santo : distribuição  
e caracterização molecular das espécies de Plasmodium a partir  
de fezes de primatas / Jomar Fagundes Júnior. - 2021.  
71 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. Malária. 2. Macacos. 3. DNA. 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) Jomar Fagundes Júnior apresentou a dissertação intitulada “ANÁLISE DESCRITIVA DA DISTRIBUIÇÃO DA MALÁRIA SÍMIA NA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO: DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE PLASMODIUM A PARTIR DE FEZES DE PRIMATAS” 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 (  ) reprovar a dissertação habilitando Jomar Fagundes Júnior a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 31 de março de 2021.

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

Dra. Ana Carolina Loss Rodrigues  
Instituto Nacional da Mata Atlântica – Titular Externo

Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira  
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Jomar Fagundes Júnior  
Discente



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7504 |  
[www.doencasinfeciosas.ufes.br](http://www.doencasinfeciosas.ufes.br) | [ppgd.ufes@gmail.com](mailto:ppgd.ufes@gmail.com)

## DEDICATÓRIA

A Deus, essa entidade que tanto se discute, mas de quem nada sabemos, que me parece infinito em sua bondade ao nos permitir oportunidades de trilhar os mais variados caminhos e que permite a vida desde a menor até a maior forma.

A minha família, três das pessoas que mais amo nesse mundo, que se esforçam em me auxiliar em minha jornada desde a época que eu era apenas um pré-vestibulando. Uma jornada que eles bem sabem que não tem um ponto final e que, apesar do susto inicial que tiveram, entenderam meus objetivos e continuam comigo nos momentos fáceis e difíceis dessa vida. São pessoas que me apoiam e me admiram mesmo nos momentos de grande incerteza e que sempre confiaram no meu julgamento e se fizeram presentes em minhas escolhas.

Meus amigos, eu não conseguiria agradecer nominalmente a todos. Vocês são um grupo de pessoas que eu escolhi a dedo e aos quais amo muito. Vocês estiveram comigo em diversos momentos da minha vida, alguns de risadas, alguns de lágrimas e mesmo naqueles quando não se tinha palavras. Isso não foi diferente no mestrado. Alguns estiveram envolvidos diretamente com minha pós-graduação e outros eram apenas aquelas presenças fundamentais.

A todos, serei eternamente grato.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crispim Cerutti Junior, por toda sua paciência em me orientar e me guiar diante das intempéries que ocorrem em uma pesquisa de mestrado. Ao longo desse tempo, sua paciência e dedicação na gestão do projeto permitiu que superássemos desafios e chegássemos onde estamos hoje. Por ter confiado a mim esse projeto e por todo seu tempo, muito obrigado.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Blima Fux, por ter compartilhado comigo seu conhecimento, ter-se mostrado sempre disposta a ajudar, por ter-me deixado fazer parte da sua disciplina de parasitologia, ter-me acompanhado e debater comigo. Essa experiência foi de grande importância para mim. Vou levar sempre comigo seus ensinamentos.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, por sempre se mostrar disposta a esclarecer minhas dúvidas, por toda sua dedicação em me receber no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e por sua atenção para com o meu projeto.

A toda a equipe do Laboratório de Protozoologia do IMT/USP. Vocês são pessoas incríveis. Além de concordarem em me receber em uma situação de pandemia, demonstraram grande dedicação e atenção a minhas amostras, permitindo que eu subisse um degrau novo de experiência em minha vida.

A todas as amigas adquiridas na UFES, em especial o Lucas, um amigo que compartilha muitas semelhanças nessa jornada e que me auxiliou e me tem auxiliado durante todo esse projeto, seja com discussões sobre o projeto em si, conversas sobre a vida acadêmica, escolhas de vida ou apenas com um passeio na praia. Ele tem tudo para ser um grande pesquisador.

A Vivaldo, aos motoristas da vigilância e a toda a equipe da Vigilância em Saúde de Vitória. Sem o auxílio de vocês, o trabalho de campo seria impossível. A ajuda de vocês foi fundamental durante todo o projeto para que ele existisse. Ao Vivaldo, agradeço em particular, ele que acompanhou os imprevistos do projeto e que esteve sempre engajado em participar da resolução.

Dentre meus amigos, ninguém esteve tão envolvido com meu mestrado como Gabrielle. Ela participou de questões antes da minha decisão pelo mestrado na UFES e me acompanhou, discutindo comigo os mais diversos pontos ao longo de todo o meu mestrado. Conteí com seus olhos atentos e sua experiência por diversas vezes, lendo meus textos e conferindo meus *slides*. Eu me orgulho muito da pessoa que ela é, tanto como profissional, quanto como amiga.

À FAPES, pelo apoio financeiro, fundamental para que esse projeto fosse realizado.

Muito obrigado a todos.

Em nossa vida, a mudança é inevitável.  
A perda é inevitável. A felicidade reside na nossa adaptabilidade  
Em sobreviver a tudo de ruim.  
**Buda.**

Maravilhas  
nunca faltaram ao mundo;  
O que sempre falta  
é a capacidade de senti-las e admirá-las  
**Mario Quintana.**

## RESUMO

Fagundes Júnior, J. **Malária símia na Mata Atlântica do Espírito Santo: distribuição e caracterização molecular das espécies de *Plasmodium* a partir de fezes de primatas.** Dissertação (Mestrado). Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2021. 71 p.

A malária é uma das doenças infecciosas de maior importância mundial. No Brasil, a doença acompanhou as mudanças que o país veio sofrendo com o passar das décadas. Atualmente, ela se concentra principalmente na região Amazônica, mas uma quantidade significativa de casos se mantém na região extra-Amazônica, em especial nas áreas cobertas pela Mata Atlântica, em que temos uma maior quantidade de casos. Questionamentos sobre a manutenção da doença na região extra-Amazônica são antigos, inclusive a possibilidade de a doença ser mantida por reservatórios animais, tendo em vista que primatas não humanos (PNH) foram encontrados portando parasitos típicos de seres humanos e vice-versa. Esses questionamentos com relação à doença ganharam força quando ficou evidente a importância do *Plasmodium knowlesi* na manutenção de uma forma zoonótica de malária na Malásia, se tornando um importante problema de saúde pública. Esse trabalho teve como objetivo identificar as espécies de parasitos causadores da malária símia na região de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo. A investigação foi realizada a partir da coleta não invasiva de amostras fecais de primatas não humanos nos municípios de Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Domingos Martins, Marechal Floriano e Laranja da Terra, no estado do Espírito Santo. Por meio da extração de DNA e metodologias moleculares realizadas em 29 *pools*, foi possível identificar as espécies de *Plasmodium* infectantes e confirmar que as amostras eram de PNH. Para a identificação das espécies de *Plasmodium*, foi realizada extração com a utilização do kit QIAamp® DNA Mini Stool Kit (Qiagen®). A amplificação foi realizada por meio de PCR em tempo real (qPCR) para a identificação de espécie de *Plasmodium*, sendo a PCR convencional utilizada para confirmação das espécies símias. Os procedimentos laboratoriais de análise foram realizados no Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de São Paulo (IMT-USP), onde, com o auxílio da equipe do laboratório de protozoologia, foi realizada a análise dos grupos amostrais fecais de PNH. Neste processo, observou-se a positividade de três *pools* (10,34%). Dentre os *pools*, dois foram positivos para *Plasmodium falciparum* e um para *Plasmodium malariae/ Plasmodium brasilianum*. Dois desses *pools* foram resultantes de coletas

em Santa Teresa e um em Laranja da Terra. Com relação às espécies de primatas portadoras de *Plasmodium*, foram identificadas *Sapajus nigritus* e *Alouatta guariba*, previamente identificadas na literatura como portadoras de infecção por *Plasmodium*. Esses animais parecem ser importantes na manutenção do ciclo do parasito, atuando na manutenção da infecção na região próxima à Mata Atlântica. Considerando-se a relação entre infecção humana e símia observada no Brasil, essas informações são importantes para que se entenda melhor se a doença estaria se mantendo de forma zoonótica, motivando ações específicas de saúde pública.

**Palavras-chaves:** Malária; *Plasmodium*; zoonoses; saúde pública; primatas

## ABSTRACT

Malaria is one of the most important infectious diseases in the world. In Brazil, the disease has followed the changes that the country has undergone over the decades. Currently, cases concentrate in the Amazon region, with a small number of them remain in the extra-Amazon region, especially in the areas covered by the Atlantic Forest, where there is a higher number of cases. Questions about the persistence of the disease in the extra-Amazonian region are old, including the possibility of the disease being maintained by animal reservoirs, considering that non-human primates (PNH) can carry parasites typical of human beings and vice versa. These questions regarding the disease gained strength when the importance of *Plasmodium knowlesi* became evident in maintaining a zoonotic form of malaria in Malaysia, becoming a relevant public health problem. This work aimed to identify the species of parasites that cause simian malaria in the Atlantic Forest region of Espírito Santo State. The investigation consisted of a non-invasive collection of feces from non-human primates in Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Domingos Martins, Marechal Floriano, and Laranja da Terra municipalities, in the state of Espírito Santo. It was possible to identify the species of infecting *Plasmodium* and confirm that they were from non-human primates through DNA extraction and molecular methodologies performed in 29 pools. The extraction for the identification of *Plasmodium* species was performed using the QIAamp® DNA Mini Stool Kit (Qiagen®). Amplification was performed using real-time PCR (qPCR) to identify *Plasmodium* species, and conventional PCR was used for simian species identification. The laboratory work took place at the Institute of Tropical Medicine of the University of São Paulo (IMT-USP). The team from the protozoology laboratory of the Institute contributed to the analysis of the fecal sample groups of non-human primates, three pools being found positives (10.34%). Among the positive settings, two had *Plasmodium falciparum* and one *Plasmodium malariae*. Two of the samples were collected in Santa Teresa and one in Laranja da Terra. The primate species carrying Plasmodium were identified as *Sapajus nigritus* and *Alouatta guariba*, previously described in the literature as carriers of infection by *Plasmodium*. These animals seem to be important in maintaining the parasite cycle, thus keeping the infection in the region close to the Atlantic Forest. Considering the relationship between human and simian infection observed in Brazil, this information can better define if the disease is behaving as a zoonosis, what would determine targeted public health actions.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium*; zoonosis; public health; primates

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Malária humana: distribuição no mundo e no Brasil.....	15
1.2. História da malária humana no Brasil .....	16
1.3. Vetor de malária na Mata Atlântica .....	18
1.4. Características da malária residual de sistemas de Mata Atlântica .....	19
1.5. Malária em hospedeiros primatas .....	20
1.6. Infecção de primatas por plasmódios .....	22
1.7. Malária símia como possível zoonose.....	23
1.8. Diagnóstico da malária humana .....	26
1.9. Métodos não invasivos de amostragem biológica .....	27
2. JUSTIFICATIVA .....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral .....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1. Área de estudo .....	31
4.2. Estratégia de coleta.....	31
4.3. Coleta de amostras.....	33
4.4. Aspecto de amostras .....	33
4.5. Armazenamento e identificação de amostras fecais .....	34
4.6. Agrupamento de amostras em <i>pools</i> .....	34
4.7. Procedimentos laboratoriais para identificação de material genético .....	35
4.7.1. Extração de DNA de plasmódios.....	35
4.7.2. PCR em tempo real para identificação da espécie do plasmódio .....	36

4.7.3. PCR convencional para confirmação da ordem Primata .....	37
4.7.4. Eletroforese para confirmação de ordem Primata .....	38
4.8. Análise dos dados .....	38
5. RESULTADOS .....	40
5. 1. Distribuição espacial das espécies de primatas .....	40
5.2. Determinação de primatas infectados.....	43
5.3. Análise molecular de <i>Plasmodium</i> infectante.....	44
6. DISCUSSÃO .....	47
7. CONCLUSÃO .....	51
8. REFERÊNCIAS .....	52
ANEXOS .....	69
Anexo A - Autorização ICMBio/SISBIO .....	69
Anexo B - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).....	73

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Malária humana: distribuição no mundo e no Brasil

A malária é uma doença parasitária transmitida por vetor, causada por um protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium*, com cinco espécies implicadas no adoecimento de seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (BRASIL, 2017a). Um estudo realizado em 2015 com *Plasmodium ovale* conseguiu identificar um dimorfismo em uma proteína presente no estágio sexual. Graças a essa informação, foi possível distinguir esse parasito nas subespécies *Plasmodium ovale curtisi* e *Plasmodium ovale wallikeri*. O estudo observou ainda a elevada diferença entre as proteínas sexuais, o que sugere que, mesmo estando presente em um mesmo local geográfico, a recombinação natural talvez não seja possível, sendo assim um indicativo para a distinção desses parasitos em duas espécies (OGUIKE & SUTHERLAND, 2015).

Dados da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) indicam que, no ano de 2019, ocorreram 229 milhões de casos de malária, sendo que a maioria desses, o equivalente a 215 milhões de casos (94%) ocorreu no continente africano. Os dados revelam que a malária causou 409.000 mortes, que, apesar da grande quantidade, representaram uma redução importante nos últimos dezenove anos, o que pode ser atribuído à melhoria na detecção e no tratamento da doença. Essa redução foi contrariada na região das Américas, na região Ocidental do Pacífico e na região do Mediterrâneo Oriental, onde houve aumento no número de mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O segundo parasito mais frequente como causador da malária humana é o *P. vivax*, responsável por apenas 3% das infecções. No entanto, esse é o principal agente infeccioso no continente americano, sendo responsável por 72,3% do total de casos notificados em 2019, com Brasil, Colômbia e Venezuela como responsáveis por 86% dos casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O Brasil é dividido em duas áreas de ocorrência da malária, com características epidemiológicas próprias, as quais estão relacionadas à cadeia de transmissão e à manutenção da infecção. Dessa forma, o país é dividido em uma região considerada endêmica, representada pela

região Amazônica, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e uma região não endêmica extra-Amazônica, que compreende os demais 18 estados brasileiros (BRASIL, 2019). Há três espécies de plasmódios que causam a malária humana no Brasil: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Entre elas, o *P. vivax* é responsável pela maioria das infecções nas duas regiões de transmissão. Entre os anos de 2000 e 2011, a maioria (99,7%) das notificações de caso estava localizada na região Amazônica. Ao longo desse período, todos os estados da região apresentaram uma redução no número de casos, principalmente na área urbana de seus municípios, contando com um decréscimo de 71,8% no número de óbitos, o que resultou em redução do coeficiente de letalidade para a região. Esse bom resultado é fruto de rapidez no diagnóstico e no tratamento, que, nessa região, ocorreu em menos de 48 horas após o início dos sintomas. Entretanto, nesse período, a região extra-Amazônica registrou um aumento de 35,7% no número de óbitos, resultando em um coeficiente de letalidade 108 vezes maior que o observado na região endêmica (BRASIL, 2013).

## **1.2. História da malária humana no Brasil**

Entre os anos de 1892 e 1906, o desenvolvimento de atividades extrativistas e a expansão na rede de transporte de borracha motivaram a migração de centenas de pessoas para a região Norte, o que aumentou a população em contato com o vetor da malária, acarretando o estabelecimento de um ciclo de infecção em novos locais e, conseqüentemente, gerando uma estimativa de 26,6 mortes a cada 10.000 pessoas. A dimensão do problema levou ao desenvolvimento de um programa de combate ao mosquito (PACKARD e GADELHA, 1997).

O ano de 1930 é marcado pela institucionalização da estrutura sanitária e por campanhas dedicadas ao combate da malária, incluindo a criação do Ministério da Educação e Saúde Pública, uma solicitação antiga do movimento médico-higienista. O ministério criado teve como primeira iniciativa o “Serviço de Malária do Nordeste”, com principal foco de ação no combate ao mosquito *Anopheles gambiae* (BRASIL, 1939; HOCHMAN, MELLO, SANTOS, 2002; BRASIL, 2006).

Uma década depois, o Serviço Nacional de Malária (SNM) e a Campanha Nacional de Erradicação da Malária (CEM), com importantes avanços tecnológicos e organizacionais no combate à doença por meio de larvicidas, DDT, medicamentos e um modelo de campanha estruturada em cada localidade, conseguiram dar continuidade ao combate (BRASIL, 1965; HOCHMAN, MELLO, SANTOS, 2002; TAUIL et al., 1985; BRASIL, 2006).

A partir de 1958, o Ministério da Saúde modificou sua estratégia para atuar em conformidade com o programa de controle da malária estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com a inclusão de erradicação por métodos sistematizados, para que o combate chegasse a áreas potencialmente endêmicas, ação de grande importância para a redução no número total de casos para 52 mil na década de 60 (BRASIL, 2006; BRASIL, 2003; HOCHMAN, MELLO, SANTOS, 2002; BARATA, 1995). Essa estratégia, apesar de ter sido muito eficiente controlando vetores na região Amazônica, não teve o mesmo sucesso na Mata Atlântica (PINOTTI, 1951).

A iniciativa criada em 1958 obteve bons resultados na região Sul e Sudeste, fora do ambiente de Mata Atlântica. No entanto, estratégias mais adequadas à necessidade de tais regiões e mesmo da região endêmica levaram a modificações em 1970, com a criação do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Para as regiões Sul e Sudeste, a preocupação era o combate aos vetores do subgênero *Kerteszia*, que procriam nas bromélias da floresta. Além dos desflorestamentos, o combate a mosquitos do subgênero *Kerteszia* envolveu também a remoção de bromeliáceas. Os estados incluídos nesta reorientação do programa foram o Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia, Goiás, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2003; BRASIL, 2006; BRASIL, 2016; TAUIL et al., 1985; SÃO THIAGO, 2003).

Entre os anos de 1970 e 2000, o processo gradual de desenvolvimento industrial do Brasil aumentou a taxa de desmatamento e migração para espaços que antes eram cobertos por floresta, aumentando o contato com o vetor. Conseqüentemente, houve elevação na quantidade de casos de 52.000 em 1970, para 578.000, em 1989 (TAUIL et al., 1985; TAUIL, DANIEL-RIBEIRO, 1998). As medidas de controle em prática, posteriormente, foram suficientes para amenizar tal explosão no número de casos, reduzindo-o parcialmente, em 2002, para 349.896 infectados e, em 2009, para 315.080 infectados. O aperfeiçoamento das medidas resultou, finalmente, em 144.100 infectados em 2014, menor número de casos dos últimos 35 anos (BRASIL, 2016; BRASIL a, 2020).

Dando continuidade ao controle da malária, o Ministério da Saúde relançou, em novembro de 2015, um plano de eliminação em concordância com a OMS, com meta de redução maior que 90% no número de casos até 2030. Entre os significativos resultados do processo gradual de controle da malária, destaca-se a mudança de cenário de uma doença comum em todo o Brasil para uma endemia quase exclusivamente restrita à região Amazônica, onde se localizam aproximadamente 95% dos casos (BRASIL, 2016).

Apesar da região considerada endêmica se restringir à Amazônia legal, a região extra-Amazônica, incluindo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, também registra a ocorrência de casos de malária. O maior número de infecções humanas por *Plasmodium* no Brasil, em 2020 foi causado por *P. vivax* (98,9%), seguido por *P. falciparum* e infecções mistas (1,1%) (BRASIL 2019; BRASIL 2020a).

Durante os anos de 2010 a 2019, a região Amazônica continuou registrando queda no número de casos para a maioria dos seus estados. Porém, o número de casos da região extra-Amazônica variou durante o período, apresentando inicialmente um aumento em 2012, seguido por uma redução. A maioria (80%) dos casos de malária da região não endêmica se concentrou nos estados do Espírito Santo, São Paulo e Piauí, sendo que o Espírito Santo registrou o maior número entre 2012 e 2013, correspondendo a aproximadamente 40% do total de infectados (BRASIL, 2015; BRASIL, 2019). A região extra-Amazônica em sua totalidade continuou apresentando uma frequência elevada ao longo do restante da década, com 1.422 casos de malária (incluindo casos autóctones, surtos e casos importados) notificados em 2016 (BRASIL, 2019).

O Espírito Santo foi responsável por um total de 147 casos de malária registrado entre 2018 e 2020 (BRASIL, 2020a). Os principais municípios atingidos são Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá e Domingos Martins. Dados de Cerutti et al. (2007) indicam que os principais agentes etiológicos são o *P. vivax* e o *P. malariae*. Ainda não é totalmente esclarecida a cadeia de transmissão da malária na região de Mata Atlântica, sendo levantadas hipóteses de portadores assintomáticos e a possibilidade de primatas infectados atuarem como reservatórios. No entanto, os dados são inconclusivos, necessitando-se de mais informações que sustentem essas hipóteses.

### **1.3. Vetor de malária na Mata Atlântica**

Os vetores da malária são mosquitos do gênero *Anopheles*, que podem ser encontrados tanto na região endêmica, como na região extra-Amazônica. Em regiões de Mata Atlântica, são vetores o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) bellator*. Esses realizam parte do seu desenvolvimento nos verticilos de plantas da família das Bromeliáceas, pois, como essas acumulam água das chuvas, cria-se a possibilidade do desenvolvimento de sua fase larval mesmo em período de estiagem (REZENDE et al., 2009; BENCHIMOL, SÁ, 2005).

Dentre os vetores da malária na Mata Atlântica, o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* se destaca por apresentar elevada densidade na região Sudeste e ser um vetor encontrado na transmissão de

malária símia e humana (DEANE et al., 1970; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, DEANE, 1995). Entre os símios, a espécie que apresenta maior prevalência da infecção é a dos bugios (*Alouatta guariba*), espécie que é encontrada distribuída por diferentes partes da Mata Atlântica. Deane (1992) conseguiu comprovar que esses vetores participam da transmissão da malária símia, uma vez que são observados com infecção natural por *Plasmodium simium*. O contato desses mosquitos com seus hospedeiros símios na região de mata se dá pelo fato desses vetores preferirem realizar o repasto sanguíneo na copa das árvores, o que ocorre a mais de 10 metros de altura, onde esses primatas são encontrados. Essa preferência por realizar o repasto sanguíneo na copa das árvores é chamada acrodendrofilia e é uma característica presente em cerca de 99% dos vetores *Anopheles (Kerteszia) cruzi* (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, DEANE, 1995).

Em regiões de floresta densa, a preferência do mosquito é por realização do repasto sanguíneo na copa das árvores, enquanto, em regiões de vegetação fragmentada, também há significativo repasto em nível de solo. Isso se deve principalmente a fatores relacionados à obtenção de fonte de alimento por parte desses vetores (MEDEIROS-SOUSA et al., 2019). A consequência é uma maior ocorrência de casos de malária nas regiões de desflorestamento ou de fragmentação da vegetação, em que a proximidade entre as pessoas e a mata é maior, como ocorre no ambiente agrícola. A frequência de infecção nesses ambientes intermediários de vegetação escassa supera a ocorrência dentro do ambiente de floresta ou no ambiente urbano, o que destaca a importância dessas regiões de transição para a frequência da infecção (DUARTE et al., 2013).

#### **1.4. Características da malária residual de sistemas de Mata Atlântica**

A manutenção da malária, assim como de outras doenças que possuem vetores, depende da presença destes últimos no mesmo ambiente que indivíduos infectados, para que se mantenha o ciclo da doença. No bioma de Mata Atlântica, que compreende diversos estados da região Sudeste, esses vetores se desenvolvem em bromélias. Por isso, a doença na região recebeu a denominação de “malária-bromélia” (BENCHIMOL, SÁ, 2005). Dentro desse ambiente de mata e nas regiões próximas, diversos habitantes de pequenos municípios desenvolvem atividades ligadas ao extrativismo ou à agricultura, o que pode ter considerável importância na manutenção do ciclo de infecção (CERUTTI, 2007).

A infecção por plasmódios na região Sudeste possui algumas características particulares, como casos com baixa parasitemia e pacientes oligossintomáticos ou assintomáticos. Isto ficou

evidente em estudo realizado por Curado et al. (1997) no município de São Paulo, em que, dos 274 indivíduos positivos para a presença de anticorpos contra a proteína circunsporozoíta (CSP), apenas dois foram positivos por microscopia, com pouca sintomatologia. O mesmo foi observado no estado do Espírito Santo, onde a maioria dos indivíduos acometidos (83,1%) apresentou baixa parasitemia em inquéritos epidemiológicos (CERUTTI, 2007; CERUTTI et al., 2007).

Em estudo realizado por Cerutti (2007) entre os anos de 2001 e 2004, foram registrados 64 casos em oito municípios do Espírito Santo. A maior frequência coube aos municípios de Santa Teresa, Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá. A maioria (64,6%) dos indivíduos acometidos tinha moradia em área rural, com 59,6% deles relatando atividade voltada para a agricultura (CERUTTI, 2007; CERUTTI et al., 2007).

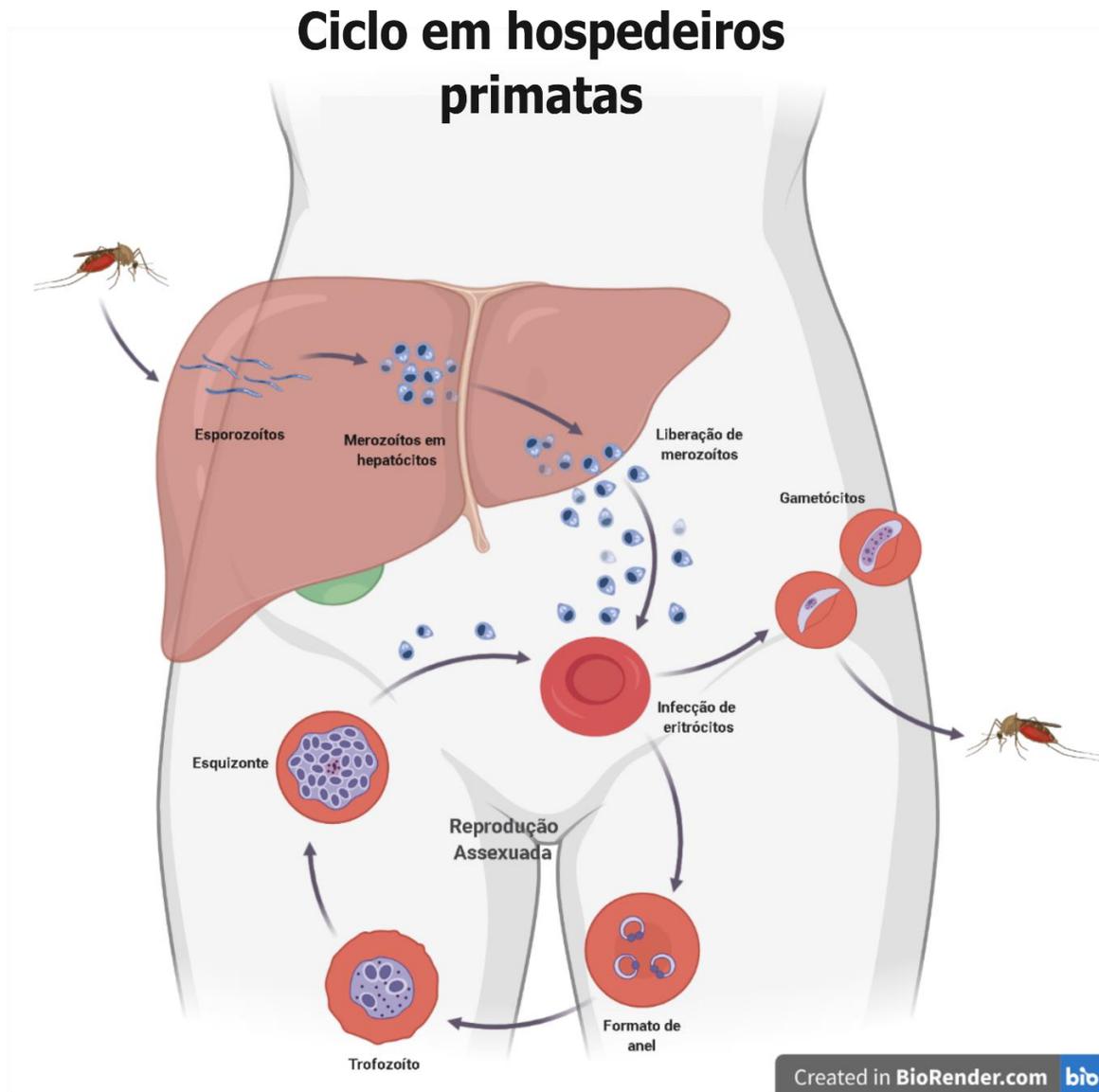
Entre os anos de 2014 e 2016, Espírito Santo e São Paulo reuniam a maioria dos casos notificados de malária na região extra-Amazônica, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN (BRASIL, 2019).

### **1.5. Malária em hospedeiros primatas**

O ciclo da malária em hospedeiros primatas (humanos e não humanos - PNH) se inicia quando os mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, infectados com esporozoítos em suas glândulas salivares, ao realizar o repasto sanguíneo, transmitem o plasmódio na forma de esporozoíto (MATSUOKA et al., 2002; COPPI et al., 2007; YAMAUCHI et al., 2007; ZIMMERMAN e HOWES, 2015; COATNEY et al., 2003).

Os esporozoítos vão migrar da circulação em direção aos hepatócitos, onde vão dar início ao período pré-eritrocítico. No fígado, em um período que varia de dois a 10 dias, os plasmódios se diferenciam em trofozoítos que, por reprodução assexuada, vão formar células multinucleadas conhecidas como esquizontes. Os esquizontes são responsáveis por dar origem a milhares de merozoítos em cada hepatócito. Tais merozoítos, por sua vez, são liberados na circulação, onde invadem eritrócitos, dando início ao ciclo sanguíneo. Este é um período de grande importância para o diagnóstico clínico e laboratorial porque a destruição eritrocitária está diretamente relacionada à periodicidade da febre, relatada clinicamente. Além do mais, este é o período em que o plasmódio pode ser observado no sangue, por meio de microscopia (STURM et al., 2006; MOTA et al., 2001, ZIMMERMAN e HOWES, 2015).

Os merozoítos sofrem mudança morfológica e funcional, parte deles transformando-se em gametócitos (masculino ou feminino), que não apresentam mais potencial de divisão. Os gametócitos são a forma infectante do mosquito, ou seja, o mosquito é infectado pelo protozoário na forma de gametócitos (Figura 1). No mosquito, ocorrerá a fase de reprodução sexuada, que resultará em esporozoítos aptos à manutenção do ciclo parasitário. (REGEV-RUDZKI et al., 2013).



**Figura 1.** A imagem separa o desenvolvimento do *Plasmodium* em dois tipos de ciclo em hospedeiros primatas. **Autor:** Jomar F. Júnior; **Software:** Biorender; **Fonte:** Zimmerman e Howes (2015).

Um fator de relevância para a ocorrência da infecção é o estágio de desenvolvimento dos eritrócitos. Enquanto o *P. vivax* invade apenas reticulócitos (eritrócitos jovens), o *P. falciparum*

invade eritrócitos em diferentes estágios de maturação. O *P. malariae*, por sua vez, tem uma maior afinidade por eritrócitos maduros. Outro fator importante para se considerar é a latência de formas hepáticas, denominadas hipnozoítos. Os hipnozoítos estão relacionados a recaídas tardias, com reativação do ciclo, continuidade na reprodução do parasito e reaparecimento da sintomatologia (COATNEY et al., 2003). Há também variação no tempo de duração de cada fase de desenvolvimento do ciclo de vida do *Plasmodium* de acordo com as espécies.

### 1.6. Infecção de primatas por plasmódios

Assim como ocorre com os seres humanos, diversas espécies de PNH também estão sujeitas a desenvolver malária. Tais primatas são encontrados naturalmente infectados no Brasil por *P. vivax/P. simium* e *P. malariae/P. brasilianum*. *Plasmodium brasilianum* é responsável por 73,9% das infecções símias, enquanto *P. simium* é responsável por 17,7%. A distribuição desigual entre as taxas de infecção no território nacional se deve à restrição geográfica do *P. simium* às regiões Sul e Sudeste. Mesmo em estados dessa região, existe grande variação entre as taxas de infecção, com 9,5% para o Espírito Santo, 53,9% para São Paulo, 15,4% para Santa Catarina e 13,3 % para Rio Grande do Sul (DEANE, 1992).

O gênero *Alouatta* é o mais frequentemente observado naturalmente infectado, enquanto as demais espécies apresentam-se infectadas em menor frequência (DUARTE et al., 2008; DEANE, 1992). Um estudo constatou que parasitos de PNH (*Alouatta seniculus*), quando comparados àqueles de populações humanas que vivem próximas ao ambiente de mata, possuíam regiões imunodominantes idênticas, sugerindo que não há distinção entre o *P. malariae* observado em seres humanos e o *P. brasilianum* identificado em PNH. Considerando-se essa capacidade de albergar parasitos, símios que habitam uma mesma região que humanos podem estar atuando como reservatório da infecção (LALREMRUATA et al., 2015). A presença da infecção nesses primatas pode indicar às autoridades de vigilância em saúde quais são os parasitos mais prevalentes em uma região, permitindo que ações de mobilização e prevenção sejam tomadas, impedindo a manutenção do ciclo da doença.

Em estudo realizado por Lourenço-de-Oliveira e Deane (1995), foi possível observar que, em duas regiões da zona endêmica, a infecção predominava entre as espécies bugio vermelho (*Alouatta seniculus straminea*), macaco-aranha-preto (*Ateles paniscus paniscus*) e *Chiropotes*

*satanas chiropotes*, o que correspondeu a 15,8% dos animais infectados. A baixa prevalência da infecção também foi observada em outra área de estudo, presente em 9,9% do total de primatas capturados, com um predomínio em *Ateles paniscus chamek* e *Saimiri ustus* (DEANE, 1992).

Além do gênero *Alouatta*, os gêneros *Cebus*, o gênero *Brachyteles* e a espécie *Callithrix jacchus* também são sujeitos à infecção por *Plasmodium* spp., o que sugere que outros primatas, mesmo que em menor quantidade, podem contribuir para a manutenção da infecção (DEANE, 1992). Uma evidência neste sentido é encontrada em estudo realizado no estado do Maranhão, em que 25,7% das amostras obtidas foram positivas para infecção por plasmódio. As amostras desse estudo apresentaram uma baixa contagem parasitária, tendo como único parasito identificado o *P. malariae/P. brasilianum* (FIGUEIREDO, 2012). Outras espécies também foram implicadas na manutenção da malária símia. Um estudo realizado em Rondônia demonstrou ser a espécie *Sapajus apella* a mais frequentemente encontrada com resultado positivo para infecção por *Plasmodium*, mas é importante destacar que outras 21 espécies também tiveram resultados positivos. Uma análise microscópica inicial identificou as infecções como causadas por *P. vivax*. No entanto, a utilização de metodologias moleculares permitiu a determinação etiológica como *P. brasilianum* e *P. falciparum*. Essa distinção é de grande importância, revelando a difícil diferenciação por meio da microscopia, ainda mais em casos de baixa parasitemia, situação comum na maioria das infecções símiás (ARAÚJO, 2013).

### **1.7. Malária símia como possível zoonose**

A suspeita de que primatas não humanos estejam envolvidos como reservatórios de malária humana é algo antigo, mas apenas recentemente ficou evidente que o *P. knowlesi*, um parasito que era considerado causador de malária apenas em primatas do Velho Mundo, também é responsável por casos de malária humana. Os primeiros seres humanos acometidos nesse contexto foram identificados na Malásia, tendo a infecção sido atribuída equivocadamente ao *P. malariae* devido à similaridade morfológica entre as duas espécies (SINGH et al., 2004).

A distinção entre espécies de *Plasmodium* presentes em símiás e humanos na determinação das infecções por *P. knowlesi* na Malásia foi possível graças a metodologias moleculares específicas, que permitiram a distinção entre as espécies *P. knowlesi* e *P. malariae*, mesmo havendo características semelhantes entre elas. Esse cenário em que seres humanos adquirem uma infecção

símia ocorre devido à manutenção do ciclo de transmissão em que vetores do gênero *Anopheles*, transmissores do *P. knowlesi*, compartilham o mesmo espaço com humanos e espécies de símios locais (SINGH et al., 2004). Essa transmissão zoonótica se configura em um importante problema de saúde pública para a Malásia, que registrou aumento no número de casos de 1.600 para 4.000 entre 2016 e 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

O estudo realizado na Malásia por Ta et al. (2014) de uma paciente sem histórico anterior de infecção por plasmódios, inicialmente por meio de exame microscópico, atribuiu-lhe como agente o *P. malariae/P. knowlesi*. No entanto, um segundo exame microscópico baseado nas características do trofozoíto levou os investigadores a acreditar que se tratava de uma infecção por *Plasmodium vivax*. Para esclarecer melhor a causa da infecção, metodologias moleculares foram empregadas para distinguir os diversos parasitos humanos. Com isso, foi possível determinar que a infecção era causada pelo *Plasmodium cynomolgi*, um parasito símio que, devido à sua morfologia indistinguível do *P. vivax*, faz necessário o uso de técnicas moleculares para que seja obtida a distinção entre as duas espécies (TA et al., 2014). O autor ainda concluiu que, devido ao elevado grau de similaridade existente entre algumas espécies de parasitos símios e humanos no sudeste da Ásia e à impossibilidade de se distinguir essas espécies por microscopia, talvez esteja ocorrendo uma subnotificação dos casos zoonóticos.

Um estudo brasileiro realizado por Deane, Deane e Ferreira Neto (1966) já levantava a suspeita de que a malária símia teria implicação nos casos humanos. Isto ficou evidente quando esses autores identificaram um caso como suspeito de infecção por *P. simium* em um profissional responsável pela captura de vetores de malária no Horto Florestal da Cantareira, no estado de São Paulo. Tal suspeita foi baseada em observação morfológica, uma vez que não se dispunha de metodologias moleculares que pudessem fazer uma determinação mais precisa quanto à espécie do *Plasmodium*.

O *P. malariae/P. brasilianum*, responsável por causar infecção símia e humana no Brasil, também foi observado infectando naturalmente índios Yanomami, que habitam a região de floresta Amazônica venezuelana. Em estudo utilizando nested-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, Polymerase Chain Reaction - PCR), identificou-se 50 amostras com suspeita de infecção por *P. malariae*. Dessas, 12 apresentaram 100% de homologia com *P. brasilianum*, sendo o primeiro achado dessa espécie em humanos na América Latina e uma peça essencial para fundamentar a

relação entre infecção de símios e de humanos. No entanto, essa capacidade de distinguir as duas espécies é questionada pelo autor, já que o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism – SNP) espécie específico, geralmente empregado para diferenciar essas espécies, não foi observado. Mesmo o SNP na posição 565, que é considerada uma região conservada comum à espécie *P. brasilianum* e é utilizada na distinção dessas espécies, apresentou variação em algumas amostras, o que pode indicar que a variabilidade genética entre esses parasitos é maior do que a prevista (LALREMRUATA et al., 2015).

No estado do Espírito Santo, um estudo de genética molecular identificou símios e humanos infectados por *P. vivax/P. simium* (BUERY et al., 2017). Em concordância, um estudo de epidemiologia molecular identificou seres humanos infectados por *P. simium* na região Sudeste do Brasil (BRASIL et al., 2017). Para Brasil et al. (2017), há existência de um quadro típico de zoonose, tendo sido apontados determinados SNPs como suficientes para diferenciar o *P. simium* do *P. vivax*. Contudo, a literatura ainda traz uma maior diversidade genética, sugerindo que os SNPs seriam insuficientes para estabelecer tal distinção nas linhagens (BUERY et al., 2017). Além disso, a baixa divergência genética encontrada e a diversidade haplótipica, aliadas à heterogeneidade entre as amostras de diferentes hospedeiros, levaram Buery et al. (2017) a concluir que *P. vivax* e *P. simium* são uma mesma espécie com poucas variações.

Apesar dos achados de Brasil et al. (2017) e de Buery et al. (2017) identificarem o mesmo parasito em humanos e símios como um elemento necessário para estabelecimento de um ciclo zoonótico, ele não é suficiente. Como Buery et al. (2017) sugeriram, para configurar zoonose, é necessário demonstrar diferentes diversidades genéticas entre os parasitos de hospedeiros humanos e símios e uma estimativa do tempo decorrido desde o antepassado comum mais recente do plasmódio isolado de ambos os hospedeiros.

A quantidade de casos com parasitos compartilhados entre humanos e símios no Brasil ainda é pequena, se for considerado o número de casos em relação ao local de ocorrência das infecções (BRASIL et al., 2017; BRASIL, 2019). No entanto, isso não descarta a possibilidade de zoonose, uma vez que um perfil semelhante foi observado para *P. knowlesi*, que atualmente é um importante problema de saúde pública na Malásia (SINGH et al., 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

## 1.8. Diagnóstico da malária humana

As principais metodologias de diagnóstico atualmente utilizadas para a determinação dos casos de malária consistem em uma combinação entre as manifestações clínicas e o diagnóstico por distensão sanguínea, aliado ao histórico do paciente, que pode informar quanto a viagem para regiões endêmicas (BRASIL, 2017a). Entre as limitações das metodologias para o diagnóstico, está o fato de febre ser comum em outras doenças, o que pode levar a uma demora no diagnóstico adequado, além do esfregaço sanguíneo possuir capacidade limitada para o diagnóstico de pacientes que possuem uma baixa parasitemia (BRASIL, 2017a; ASSIS et al., 2016).

Atualmente, vem-se investindo muito em Testes Rápidos de Diagnóstico. Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO), entre os anos de 2010 e 2018, foram vendidos 2,3 bilhões de testes para diagnóstico. Isso se deve principalmente à menor complexidade metodológica exigida, o que permite que mesmo as regiões que possuem poucos recursos identifiquem casos de malária com elevada sensibilidade. Apesar de apresentar diversos benefícios, como foi observado por Gamboa et al. (2010), Testes Rápidos de Diagnóstico que são direcionados para a proteína rica em histidina 2 (HRP2) não foram efetivos na detecção de *P. falciparum* sem os genes *pfhrp2/pfhrp3*, uma limitação que pode resultar na subestimação dos casos na região.

Técnicas moleculares têm grande papel em programas de vigilância em malária, permitindo o monitoramento mesmo em situações de baixa densidade parasitária nas amostras biológicas (ASSIS et al., 2016). A identificação de casos de baixa parasitemia tem grande importância na avaliação do ciclo da doença, o que pode justificar os custos elevados e a necessidade de pessoal especializado para a realização de metodologias moleculares, pois tais técnicas podem permitir a identificação de um maior número de casos que não seria identificado por metodologias tradicionais, o que forneceria subsídios para uma eliminação bem-sucedida da malária. Karl et al. (2011) conseguiram observar essa série de fatores ao utilizar modelos matemáticos, chegando à conclusão de que a não eliminação de casos submicroscópicos tem grande papel na manutenção da doença e impede que sua erradicação ocorra de forma efetiva.

Métodos moleculares, como a PCR, permitem identificar densidades parasitárias menores que um parasito por microlitro, mantendo elevadas sensibilidade e especificidade. Assim, tiveram grande importância na determinação da infecção por *Plasmodium knowlesi* em primatas não

humanos, tendo sido estimada uma sensibilidade de 96,7% (SIREGAR et al., 2015). A confiabilidade dos resultados é particularmente importante para a determinação da prevalência de diferentes espécies de plasmódio causadoras de malária em ambiente de Mata Atlântica em virtude das características genéticas e morfológicas de parasitos humanos e símios, além da baixa parasitemia observada, o que dificulta a identificação por meio da microscopia (ASSIS et al., 2016; SNOUNOU et al., 1993).

### **1.9. Métodos não invasivos de amostragem biológica**

A coleta de sangue, uma metodologia invasiva utilizada em muitas pesquisas, necessita de profissional especializado, que irá realizar a contenção física do animal, seguida da administração de anestésico em quantidade adequada ao seu peso, com monitoramento frequente dos sinais vitais durante o período de inconsciência. Quando o animal está anestesiado, é realizada assepsia local e coletada amostra por punção venosa, com a utilização de seringa e agulha adequadas ao tamanho do animal. Após ser obtida a amostra de sangue, essa é transferida para um tubo contendo anticoagulante e esse tubo deve ser refrigerado em temperatura adequada o quanto antes (COSTA, 2014). Isso implica em um processo mais demorado e custoso, com uma equipe maior e maior risco de estresse para o animal.

A obtenção de diferentes amostras que não necessitam de intervenção direta, como amostras de pelo, saliva ou fezes, aliada a técnicas de biologia molecular, que possibilitam a determinação da infecção com elevada confiabilidade, permitem que, mesmo com um pequeno volume amostral de cada espécime, se obtenha um maior número de amostras sem a elevação da complexidade estrutural, algo muito relevante para a viabilização de uma maior quantidade de dados em pesquisas epidemiológicas (ASSIS et al., 2016).

A identificação do DNA parasitário por meio de amostras fecais se faz possível porque, durante a fase pré-eritrocítica, esporozoítos se desenvolvem em outras formas evolutivas dentro de hepatócitos, formando os esquizontes, que, ao final do processo de esquizogonia, liberam, na corrente sanguínea, merozoítos (MCGREGOR, KROTOSKI, 1985). O desenvolvimento de parte do ciclo no fígado permite que sejam identificados parasitos liberados no trato gastrointestinal via ducto biliar, culminando com o seu encontro nas fezes. Como amostras fecais possuem uma grande quantidade de bactérias que podem atuar interferindo em metodologias de diagnóstico molecular,

por degradarem o DNA, é necessária a utilização de inibidores de atividade microbiana (KAWAI et al., 2014; MAPUA et al., 2017).

Apesar de necessitar de inibidor de atividade bacteriana e da utilização de estabilizadores de DNA, a detecção em amostras fecais possui resultados tão bons quanto os obtidos por amostras de sangue, sendo possível identificar indivíduos com baixa parasitemia, mesmo em casos em que a densidade parasitária é menor que um parasito/ $\mu$ l, quando a infecção não é traduzida por sinais e sintomas, mas é importante em estudos epidemiológicos, pois permite dimensionar a abrangência da transmissão (ASSIS et al., 2016; JIRKŮ et al., 2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da malária ser uma doença de notificação compulsória que recebeu diversas iniciativas de combate ao longo do tempo, a infecção persiste em diversas regiões do Brasil. A região extra-Amazônica merece particular atenção, pois o diagnóstico tardio resulta em uma demora na terapêutica, o que pode permitir que pessoas atuem como reservatório da infecção, um fator de grande importância para a manutenção do ciclo da doença (BRASIL, 2013).

Os casos de malária encontrados na região extra-Amazônica são, em sua maioria, relacionados com atividades realizadas no ambiente de Mata Atlântica ou em propriedades rurais próximas, predominando, por isso, em pequenos municípios com atividade voltada a agricultura e extrativismo. As infecções são muitas vezes assintomáticas, com baixa parasitemia observada ao microscópio (CERUTTI, 2007; BRASIL et al., 2017).

Estudos atribuem a manutenção da infecção na região de Mata Atlântica a uma possível característica de transmissão zoonótica. Evidências em favor de tal forma de transmissão incluem a presença de um vetor em comum, transmissor da infecção para humanos e para primatas não humanos, e a similaridade morfológica, imunológica e genética entre as espécies *P. brasilianum* e *P. simium*, presentes em símios, e seus correspondentes em humanos, o *P. malariae* e o *P. vivax*, respectivamente (DEANE, DEANE, FERREIRA NETO, 1966; CERUTTI, 2007; BUERY et al., 2017). As infecções por *P. vivax* e *P. malariae* são justamente as mais frequentes na região extra-Amazônica.

Tendo como base o atual cenário epidemiológico da malária residual de Sistemas de Mata Atlântica no estado do Espírito Santo, torna-se relevante determinar quais são as possíveis espécies de *Plasmodium* spp. encontradas em primatas não humanos na região. Tal constatação se torna de grande importância para elucidar como ocorre a manutenção da infecção humana na região extra-Amazônica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Determinar a presença de malária símia na região de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo.

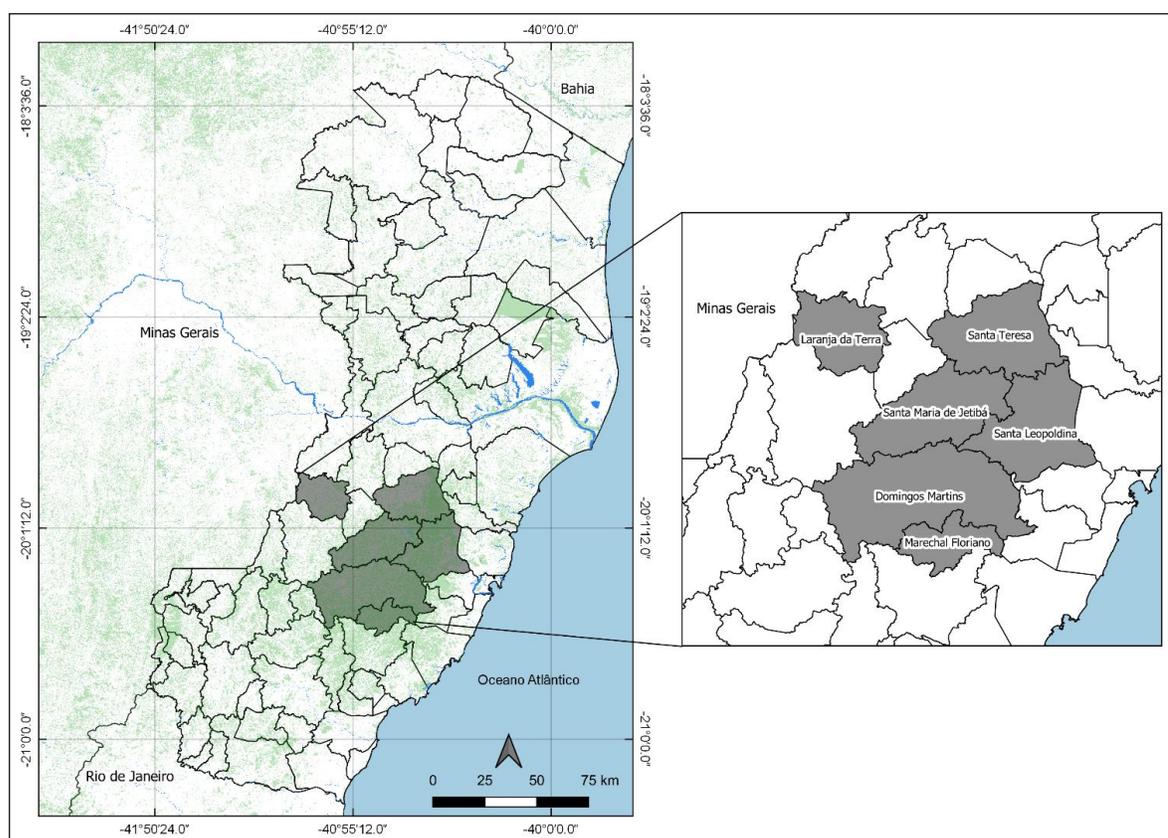
#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Identificar as principais espécies de primatas do Novo Mundo infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. na região de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo;
2. Verificar se estão presentes *P. vivax/ P. simium*, *P. malariae/ P. brasilianum* e *P. falciparum* em amostras de fezes de símios, na região rural endêmica de Mata Atlântica do Espírito Santo;
3. Verificar a distribuição das espécies de protozoários causadores de malária símia em diferentes regiões da área endêmica de malária humana no estado do Espírito Santo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado ao longo de 11 meses, com a realização de 36 coletas nos municípios de Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Domingos Martins, Marechal Floriano e Laranja da Terra, localizadas na zona serrana do estado do Espírito Santo (Figura 2). As coletas foram realizadas em região de Mata Atlântica, em propriedades rurais e em região periurbana.



**Figura 2:** Distribuição das áreas de ocorrência de coletas no estado do Espírito Santo **Software:** QGIS versão 3.14.16-Pi com shapefiles retirados do IBGE; **Autor:** Lucas M. Ferreira

### 4.2. Estratégia de coleta

Os pontos de coleta foram estabelecidos com base em informações fornecidas por pesquisadores que monitoram grupos de primatas não humanos no ambiente de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo. Além disso, foram utilizadas informações de moradores, com relação ao local de avistamento ou vocalização realizada por primatas não humanos presentes na região. A

partir dessas informações, onde havia a presença de símios, os animais foram acompanhados até o estabelecimento do local em que depositavam as fezes. Dessa forma, foi possível estabelecer áreas que os animais frequentam e retornar para coletas nesses pontos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Municípios em que a coleta resultou na obtenção de amostras de fezes símias e a frequência de retorno. Frequência de retorno em U (Unidade).

<b>Município</b>	<b>Ponto de Coleta</b>	<b>Frequência de retorno (U)</b>
<b>Santa Teresa</b>	S19.90389 W040.55201	1
	S19.92617 W040.60148	2
	S19.92635 W040.60147	1
	S19.92638 W040.60151	7
	S19.93619 W040.59952	1
	S19.96490 W040.58171	1
<b>Santa Maria de Jetibá</b>	S20.04182 W040.69223	1
	S20.04342 W040.69385	1
	S20.09140 W040.82531	2
	S20.09190 W040.82530	1
<b>Domingos Martins</b>	S20.38236 W40.64127	2
<b>Marechal Floriano</b>	S20.39269 W40.65205	1
<b>Laranja da Terra</b>	S19.86895 W040.95111	1
	S19.86901 W040.95109	3
	S19.86907 W040.95140	1
	S19.90596 W041.04144	1
	S19.90597 W041.04142	1
	S19.90598 W041.04143	2

### 4.3. Coleta de amostras

Durante as coletas, foram priorizadas as amostras de fezes frescas. As amostras disponíveis foram coletadas em um volume proporcional à sua quantidade no local em que foram depositadas. As amostras de fezes foram colhidas com o auxílio de uma haste de madeira e transferidas para um tubo de coleta com capacidade de 50ml, seguindo-se a adição de solução conservante (álcool 70%), até ser obtida proporção 1:1. Em caso de grande volume, a amostra foi disposta em, no máximo, dois tubos de coleta. Ressalta-se, neste momento, que todos os procedimentos foram realizados de forma a manter a integridade da amostra e a segurança do manipulador. Portanto, foram utilizados todos os equipamentos de proteção individual necessários. Ressalta-se também que a coleta de amostras de fezes símias em ambiente de Mata Atlântica foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o código 62/2019. A coleta em ambiente silvestre foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e SISBIO, tendo como código de autorização 15191-10.

As amostras foram catalogadas e seus dados registrados: espécie de símio à qual a amostra pertencia, data de coleta, localização da amostra e aspecto (cor e textura).

### 4.4. Aspecto de amostras

A análise visual das amostras de fezes permitiu observar que elas possuem aspectos bem distintos entre si. Amostras de *Sapajus nigritus* possuem cerca de 6 cm, são mais cilíndricas e de textura mais granulosa, enquanto amostras de *Callithrix* sp. são as menores (3 cm) e mais consistentes. Por outro lado, as amostras de *Alouatta guariba* são as maiores obtidas, com uma média de tamanho em torno de 10 cm, consistência mais amolecida e maior teor de fibras. A disposição das amostras no solo também variou entre as diferentes espécies, com amostras de *Callithrix* sp. e *Brachyteles hypoxanthus* mais distantes entre si e do local em que os animais se

alimentam, enquanto amostras de *Sapajus nigritus* e *Alouatta guariba*, estão mais próximas entre si (Figura 3).

<i>Sapajus nigritus</i>	<i>Callithrix</i> sp.	<i>Alouatta guariba</i>	<i>Brachyteles hypoxanthus</i>
<b>Tamanho</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Tamanho</b>
Apx. 6 cm	Apx. 3 cm	Apx. 10 cm	Apx. 10 cm
<b>Aspecto</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Aspecto</b>
Cilindrico e de textura granulosa	Ovoide e consistente	Discoide, amolecido e rico em fibras	Discoide, amolecido e rico em fibras
<b>Disposição</b>	<b>Disposição</b>	<b>Disposição</b>	<b>Disposição</b>
Amostras encontradas próximas (apx: 1m ou menos)	Amostras encontradas distantes (apx: 2m ou mais)	Amostras encontradas próximas (apx: 1m ou menos)	Amostras encontradas distantes (apx: 2m ou mais)

**Figura 3.** Características das amostras obtidas quanto a tamanho, aspecto e disposição. Para essa análise, foram consideradas amostras frescas.

#### 4.5. Armazenamento e identificação de amostras fecais

As amostras, já previamente identificadas e armazenadas em tubo de coleta, foram acondicionadas em freezer a - 20 °C no setor de parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Em seguida, foram encaminhadas em lotes para a equipe do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (USP), onde permaneceram acondicionadas a - 20 °C até o momento da sua utilização.

#### 4.6. Agrupamento de amostras em *pools*

Para fins de análise molecular, as amostras foram agrupadas em *pools* de acordo com semelhança de local (cidade), espécie e data. Dessa forma, as amostras de fezes ficaram agrupadas em *pools* compostos por no máximo três amostras nas condições especificadas, respeitando a relação de proporcionalidade entre a quantidade recolhida e aquela depositada pelo animal, com o intuito de manter concentrações homogêneas com volume final de 2 ml de fezes (Figura 4).

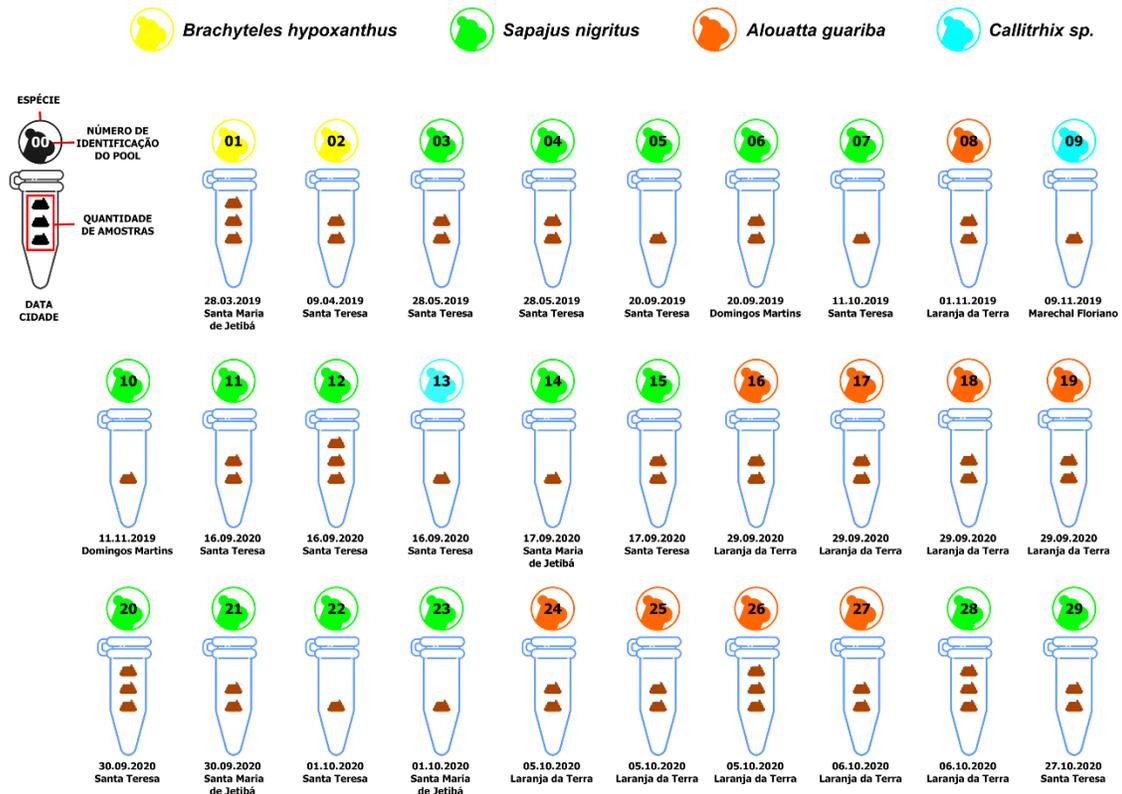


Figura 4. Distribuição das 55 amostras em 29 pools, de acordo com local (cidade), espécie e data. Autor: Jomar F. Júnior.

#### 4.7. Procedimentos laboratoriais para identificação de material genético

A partir dos pools, os pesquisadores realizaram, no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP, a extração do material genético presente nas fezes e as reações de amplificação para a identificação das espécies de *Plasmodium* e para a confirmação de que os pools eram provenientes de indivíduos da ordem Primata.

##### 4.7.1. Extração de DNA de plasmódios

A extração foi realizada utilizando-se o kit QIAmp® Stool Kit (Qiagen), com protocolo de Siregar et al. (2015). Os pools foram homogeneizados em 2 ml de tampão ASL (Stool Lysis Buffer) e processados em agitador *overnight*. No dia seguinte, 1,6 ml do lisado de fezes foi transferido para um microtubo de 2 ml e a solução foi aquecida a 70 °C por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram levadas ao vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 18.323 x g durante 1 minuto.

Do sobrenadante resultante, 1,2 ml foi transferido para tubos de 2 ml. Em cada tubo, foi adicionada meia cápsula de InhibitEX® (Qiagen®). A seguir, as amostras foram encaminhadas para agitação no vórtex e para incubação em temperatura ambiente por um minuto, sendo depois centrifugadas a 18.323 x g durante três minutos.

Em novos microtubos de 1,5 ml, foram adicionados 15 µl de proteinase K, 200 µl da solução de fezes e 200 µl do tampão AL (Lysis Buffer), sendo a mistura submetida a vórtex por 15 segundos. A solução final foi incubada a 70 °C por 10 minutos. Terminada a incubação, foram adicionados às amostras 200 µl de etanol absoluto, seguidos por novo processo de agitação por aproximadamente 15 segundos. O lisado foi então adicionado em coluna de spin QIAamp e centrifugado a 18.323 x g por um minuto. A coluna QIAamp foi transferida para uma nova coluna de 2 ml e o tubo contendo o filtrado foi descartado.

À coluna de spin QIAamp, foram adicionados 500 µl de buffer AW1 (Wash Buffer 1). Seguiu-se centrifugação a 18.323 x g, sendo o tubo com o filtrado descartado após o processo. A próxima etapa se seguiu com a transferência da coluna de spin QIAamp para um novo tubo de 1,5 ml, que recebeu a adição de 500 µl de buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguida por centrifugação a 18.323 x g por três minutos, sendo, ao final, o tubo de coleta contendo o filtrado descartado. Por fim, ocorreu a adição de 200 µl de buffer AE (Elution Buffer). As amostras foram então incubadas por um minuto em temperatura ambiente e colocadas em centrifugação a 18.323 x g por um minuto.

#### **4.7.2. PCR em tempo real para identificação da espécie do plasmódio**

O alvo do protocolo de PCR em tempo real foi o gene que codifica a subunidade 18S do RNA ribossomal (18S rRNA), com a utilização de *primers* e sondas específicas para a determinação das espécies *P. vivax*/*P. simium* e *P. falciparum*, conforme estabelecido em protocolo por Bickersmith et al. (2015) (Tabela 2). Os mesmos parâmetros presentes no protocolo de Bickersmith et al. (2015) foram seguidos para identificar *P. malariae*/*P. brasilianum*, utilizando *primers* e sonda estabelecidos por Rougemont et al. (2004). Em todas as reações, foram adicionados controles positivo e negativo para manter o seu controle de qualidade. A primeira reação teve como volume final ~ 15 µl, compostos por 0,15 µl (10µM) da sonda relacionada as espécies de *Plasmodium*, 0,45 µl (10µM) de cada um dos *primers*, 7,5µl de TaqMan® Universal

Master Mix II acrescidos de UNG (Applied Biosystems) (2X) e 2,0 µl do material genético (DNA) para cada amostra, recebendo a adição de 4,45 µl de água de injeção.

A amplificação foi realizada em termociclador *Step One Plus (Applied Biosystems)*, com uma fase inicial de desnaturação a 50°C por dois minutos, seguida por 95°C por dez segundos e por 50 ciclos a 95°C por quinze segundos, com um passo final a 60°C por um segundo.

**Tabela 2.** *Primers*, sondas e suas respectivas sequências para a amplificação de amostras de DNA presentes em fezes de primatas não humanos.

<b>Primers e sondas</b>	<b>Sequências (5' – 3')</b>
Falc-F	GACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAAA
Falcproube	VIC – TGAAGGAAGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGA - QSY
Vivax-F	GACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTAA
Vivaxproube	NED – ATAAACTCCGAAGAGAAAA – MGBNFQ
Mal-F	CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A
Malproube	FAM – CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT –MGBNFQ

#### 4.7.3. PCR convencional para confirmação da ordem Primata

A partir do material extraído, foi realizada PCR convencional para a confirmação de serem as amostras oriundas da ordem Primata, com a utilização de *primers* para amplificar um fragmento de 233 pb, tendo como alvo a porção COI do DNA, elaborados pelo Dr. Paulo B. Chaves, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Tabela 3). Todas as reações foram realizadas obedecendo os protocolos de segurança, utilizando um controle positivo (amostras sabidamente de PNH) e um controle negativo (água de injeção) nas reações.

As reações tiveram como volume final 25 µl, composto por 2,5 µl de tampão, 1,5 µl de cloreto, 0,5 µl de dNTPs, 1 µl do *primer* PlatyCOIF1 (10 µM), 1 µl de cada um dos *primers*

PlatyCOIR1, 0,5µl de Taq polimerase, 13 µl de água de injeção e 5 µl do material genético (DNA). A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti (Applied Biosystems)*, composta por cinco passos, um passo inicial de desnaturação proteica a 94°C por cinco minutos, seguido de 94°C por quinze segundos, 56°C por trinta segundos e 72°C por trinta segundos (passos 2 a 4, repetidos por 34 ciclos), além de um passo final de 72°C por cinco minutos.

**Tabela 3.** *Primers* e suas respectivas sequências para a amplificação de DNA da ordem Primata, presente nas amostras de fezes.

<i>Primer</i>	<b>Sequências (5' – 3')</b>
PlatyCOIF1	5' GGA AAT ATA TCA CAC CCA GGA G 3'
PlatyCOIR1	5' GTT AAT AGT ATG GTA ATT CCA GCA G 3'

#### 4.7.4. Eletroforese para confirmação de ordem Primata

Para a realização da eletroforese, os produtos da amplificação (7 µl) receberam a adição de corante Blue (1 µl) e então foram submetidos à migração eletroforética horizontal em gel de agarose (1,5%), corados com 30 µl de brometo de etídio (Invitrogen®) em tampão de corrida TBE (Tris, ácido Bórico e EDTA). A eletroforese foi realizada à tensão de 100V por uma hora. A positividade da eletroforese foi dada por meio da formação de banda em gel, em comprimento adequado, de acordo com marcador de peso molecular de 50 pb. A visualização dos resultados ocorreu em transiluminador UV.

#### 4.8. Análise dos dados

Todos os dados foram armazenados em planilha do programa Microsoft Excel® 2016. As variáveis consideradas de interesse foram locais de obtenção da amostra, espécies de primatas não humanos e espécies de plasmódios encontrados. Com esses dados, foi possível avaliar a distribuição da infecção em PNH, comparando-a com a distribuição que ocorre em seres humanos.

Foi também possível determinar as espécies símias infectadas e a presença de espécies de diferentes plasmódios, com sua devida quantificação, cuja identidade foi comparada com aquela dos parasitos de malária humana mais presentes na região.

As três variáveis de interesse foram expressas pelas suas frequências absolutas e relativas.

## 5. RESULTADOS

### 5. 1. Distribuição espacial das espécies de primatas

Obteve-se um total de 55 amostras de fezes, que foram agrupadas em 29 *pools*, correspondentes a quatro espécies de PNH. Considerando-se as coletas realizadas, mais da metade dos *pools* (55,4%) foi da espécie *Sapajus nigritus* (dezesseis). Em seguida, em quantidade menor, também foram encontrados *pools* de *Brachyteles hypoxanthus* (dois), *Alouatta guariba* (nove) e *Callithrix* sp. (dois) (Tabela 4).

Dentre as espécies analisadas, a espécie *Brachyteles hypoxanthus* foi a única encontrada apenas dentro da região de Mata Atlântica. As demais espécies foram encontradas próximas a propriedades rurais ou ao perímetro urbano.

**Tabela 4.** Distribuição de *pools* de acordo com a espécie de PNH e o local em que foram obtidas as amostras. PNH: Primata não humano; U: Unidade.

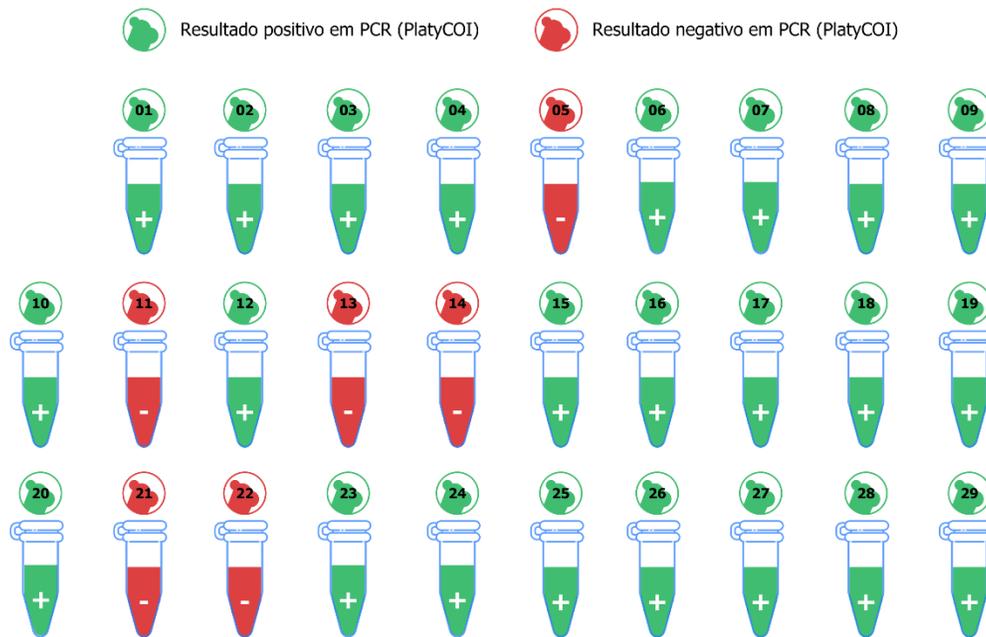
Local/Espécie de PNH	<i>Sapajus nigritus</i>	<i>Brachyteles hypoxanthus</i>	<i>Callithrix</i> sp.	<i>Alouatta guariba</i>	TOTAL (U)	Porcentagem (%) de acordo com a localidade
Santa Teresa	10	1	1	-	12	41,6
Santa Maria do Jetibá	3	1	-	-	4	13,8
Santa Leopoldina	-	-	-	-	0	0
Domingos Martins	2	-	-	-	2	6,8
Marechal Floriano	-	-	1	-	1	3,4
Laranja da Terra	1	-	-	9	10	34,4
<b>TOTAL (U)</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>29</b>	
<b>Porcentagem (%) de acordo com a espécie de PNH</b>	<b>55,4</b>	<b>6,8</b>	<b>6,8</b>	<b>31</b>		<b>100</b>

Embora campanhas de coleta tenham sido realizadas em seis municípios, não foram encontradas fezes, nem observada a presença de PNH, no município de Santa Leopoldina.

Santa Teresa foi o município em que se obteve uma maior diversidade de espécies entre os *pools* amostrados (*Sapajus nigritus*, *Brachyteles hypoxanthus* e *Callithrix* sp.). Santa Teresa e Laranja da Terra foram os municípios em que se obteve o maior número de *pools* (vinte e dois) (Tabela 4). Em Marechal Floriano e Domingos Martins, foi coletado um total de três *pools*, compreendendo a região com menor número amostral. Laranja da Terra foi o único município em que se obteve amostras de *Alouatta guariba*, sendo essa a segunda espécie com maior quantidade de *pools* obtidos. Quando levamos em conta a distribuição das espécies, *Sapajus nigritus* foi a mais amplamente distribuída entre os municípios estudados, com amostras encontradas em Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Domingos Martins e Laranja da Terra.

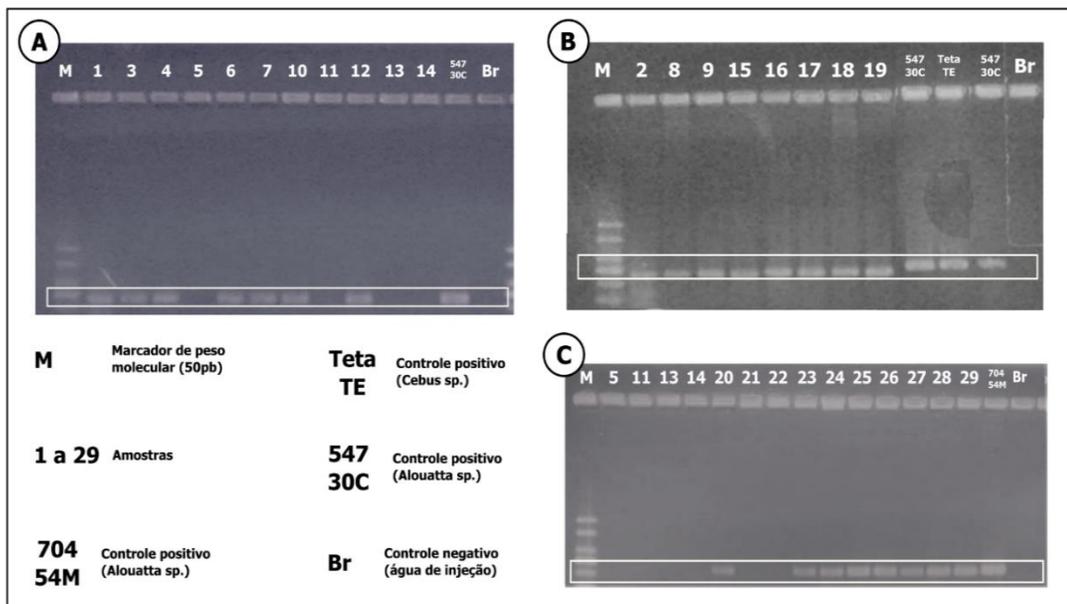
Quando consideramos as análises obtidas a partir do monitoramento dos animais (*Sapajus nigritus*, *Alouatta guariba* e *Callithrix* sp.), foi possível observar grupos com um máximo de cinco indivíduos, todos com algum grau de proximidade geográfica com a população humana, geralmente se alimentando em comedouros (locais em que moradores colocam alimentos para os animais) ou do que obtinham da produção agrícola local.

A análise molecular por PCR convencional identificou com sucesso a ordem Primata em 23 *pools* (79,1%) (Figura 5). Dentre os *pools* que tiveram resultado negativo (5, 11, 13, 14, 21 e 22), não foi possível encontrar um fator em comum com relação a local ou aspecto da amostra que pudesse ter interferido em sua análise. Como as amostras que compõem os *pools* aqui citados foram identificadas por parâmetros que incluem aspecto morfológico das amostras e monitoramento do grupo de primatas não humanos, todas foram incluídas para a análise de identificação de espécie de plasmódio, mesmo aquelas com resultado negativo para ordem Primata na PCR, dado o vínculo propiciado por seu aspecto e pela situação de coleta.



**Figura 5.** Distribuição dos resultados negativos e positivos para a determinação da ordem Primata. **Autor:** Jomar F. Júnior

A metodologia molecular, por PCR convencional, se mostrou eficaz em confirmar a presença de material genético de primatas em diferentes espécies, com formação de bandas nítidas em eletroforese (Figura 6).



**Figura 6.** Gel de eletroforese das reações de PCR convencional, realizada com *primers* PlatyCOI. As bandas que indicam positividade/negatividade aparecem em destaque nas imagens. **A.** primeiro grupo de amostras; **B.** Segundo grupo de amostras; **C.** Terceiro grupo de amostras.

## 5.2. Determinação de primatas infectados

A realização de PCR em tempo real possibilitou identificar um total de três *pools* positivos (10,34%) para infecção por plasmódio.

No município de Santa Teresa, dos 12 *pools*, dois tiveram resultado positivo para plasmódio (16,6%). Em Laranja da Terra, por sua vez, dos 10 *pools*, apenas um foi positivo para plasmódio (10%) (Tabela 5). As demais regiões não apresentaram *pools* positivos para plasmódio. Em Santa Teresa, a espécie primata *Sapajus nigritus* revelou-se positiva para *Plasmodium falciparum* e *P. malariae/P. brasilianum*, configurando a espécie em que se teve maior diversidade parasitária. Em Laranja da Terra, a espécie primata identificada como positiva foi *Alouatta guariba*, que apresentou positividade para *Plasmodium falciparum*. Tanto as espécies de primatas, quanto as regiões acometidas, foram aquelas de maior frequência amostral.

**Tabela 5.** Frequência de infecção em localidades com pools positivos por qPCR. **qPCR:** PCR em tempo real.

<b>Local</b>	<b><i>Pools</i> amostrados no local (U)</b>	<b><i>Pools</i> positivos por qPCR (U)</b>	<b>Porcentagem de amostras positivas (%)</b>
Santa Teresa	12	2	16,6%
Laranja da Terra	10	1	10%

Com relação à frequência de infecção entre os PNH, a espécie *Sapajus nigritus* apresentou-se mais frequentemente infectada (12,5%), enquanto a espécie *Alouatta guariba* apresentou frequência mais baixa (11,1%) (Tabela 6).

Se levarmos em consideração todos os *pools*, independentemente da espécie ou do local em que foram obtidos, temos uma frequência de infecção de 10,35%, valor próximo aos valores individuais observados nas espécies com amostras positivas, justamente devido a uma maior concentração dos *pools* em apenas dois locais (Santa Teresa e Laranja da Terra) e em duas espécies (*Sapajus nigritus* e *Alouatta guariba*).

### 5.3. Análise molecular de *Plasmodium* infectante

Os *pools* foram analisados por PCR em tempo real para três espécies de *Plasmodium* (*Plasmodium malariae* /*Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*/ *P. simium*). As análises permitiram encontrar dois *pools* positivos para *Plasmodium falciparum* presentes em animais da espécie *Sapajus nigritus* e *Alouatta guariba*. *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*, foi encontrado em apenas um *pool* de *Sapajus nigritus* (Tabela 7). Não se obteve *pools* positivos para *P. vivax*/ *P. simium*.

**Tabela 6.** Frequência de infecção nas diversas espécies, com *pools* positivos por qPCR.

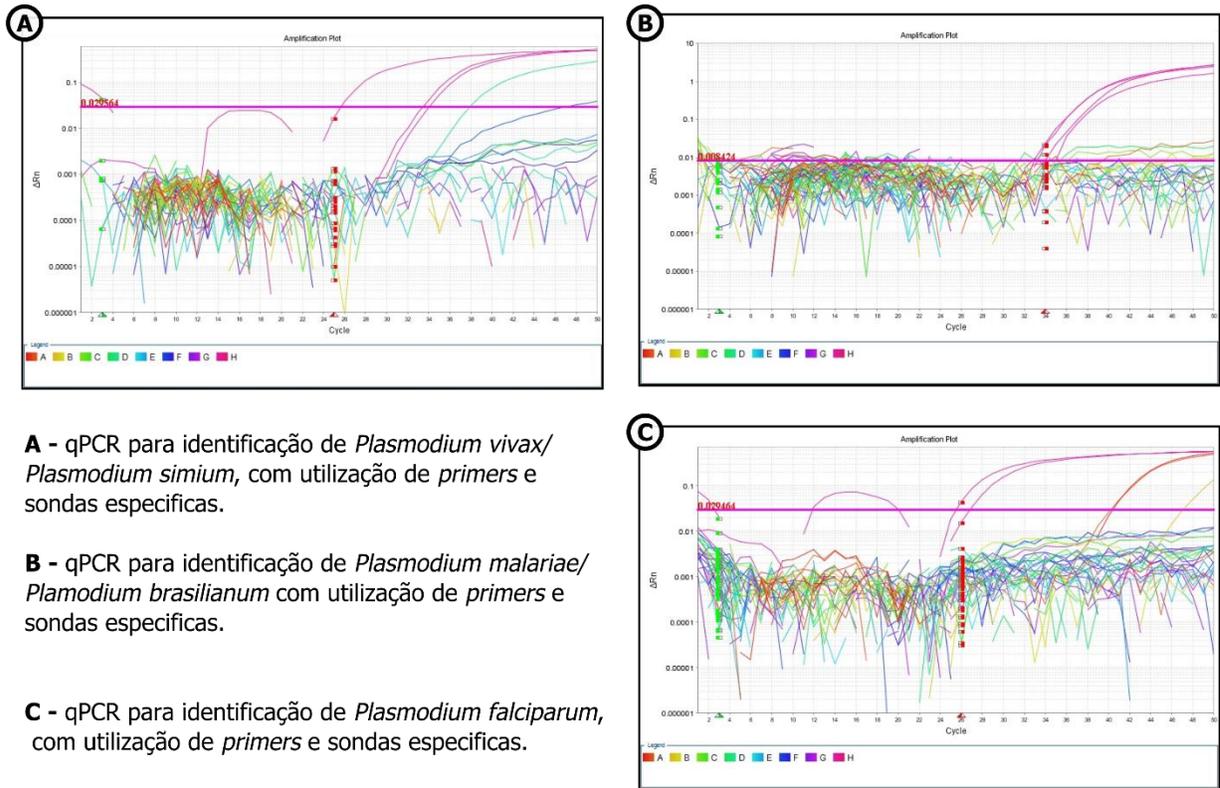
<b>Espécie</b>	<b><i>Pools</i> amostrados no local (U)</b>	<b><i>Pools</i> positivos por qPCR (U)</b>	<b>Porcentagem <i>pools</i> positivos (%)</b>
<i>Sapajus nigritus</i>	16	2	12,5%
<i>Alouatta guariba</i>	9	1	11,1%

A presença de ambos os plasmódios, *P. malariae*/*P. brasilianum* e *Plasmodium falciparum*, em amostras de PNH da espécie *Sapajus nigritus* ocorreu em um mesmo ponto de coleta na região semiurbana da cidade de Santa Teresa. Por outro lado, a presença do *Plasmodium falciparum* em *Alouatta guariba* ocorreu em região de mata (sítio), a poucos quilômetros da cidade de Laranja da Terra.

**Tabela 7.** Distribuição da positividade identificada por PCR em tempo real, para espécies de PNH e locais analisados (apenas locais em que ocorreu a presença de *pools* positivos). **Pf:** *Plasmodium falciparum*; **Pm-Pb:** *Plasmodium malariae* /*Plasmodium brasilianum*; **U:** Unidade.

Local/Espécie de PNH	<i>Sapajus nigrinus</i>	<i>Alouatta guariba</i>	TOTAL (U)
<b>Santa Teresa</b>	Pf/Pm-Pb	-	2
<b>Laranja da Terra</b>	-	Pf	1
<b>TOTAL (U)</b>	2	1	3

A realização da qPCR resultou na obtenção, utilizando-se *primers* e sondas (Falc-F e Falciprobe) específicos para *Plasmodium falciparum*, na amostra de *Sapajus nigrinus*, de um valor de Ct (Limiar do Ciclo, do inglês, *Cycle Threshold*) de 40,19. Por sua vez, na amostra de *Alouatta guariba* infectado por *Plasmodium falciparum*, o valor de Ct foi de 47,03. No que diz respeito à infecção de *Sapajus nigrinus* por *P. malariae*/*P. brasilianum*, mediante a utilização de *primers* e sondas (Mal-F e Malaprobe) também específicos, identificou-se um valor de Ct de 27,44. Esses valores indicam que foram necessários mais de 40 ciclos para a amplificação do DNA em amostras de *Plasmodium falciparum*, enquanto em amostra de *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* foram necessários mais de 20 ciclos (Figura 7).



**Figura 7.** Reação de PCR em tempo real realizada para identificação da espécie de *Plasmodium* presente em amostras fecais de primatas não humanos. **A.** Identificação de *P. vivax*/*P. simium*; **B.** Identificação de *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum*; **C.** Identificação de *Plasmodium falciparum*.

## 6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre malária símia realizado no Espírito Santo que utiliza amostras fecais, portanto uma técnica não invasiva, como forma de extrair e amplificar o DNA de plasmódios. Como principais resultados, o estudo revelou a presença de *P. falciparum* em primatas não humanos de diferentes espécies e evidenciou a infecção de *Sapajus nigritus* (macaco prego preto), uma espécie pouco representada entre os possíveis hospedeiros símios. Este último achado revela a persistência da cadeia de transmissão desta forma de malária na região, apesar da recente maciça mortandade dos principais hospedeiros (*Alouatta guariba*) em virtude da epizootia de febre amarela.

A aplicação de técnicas não invasivas é uma alternativa de coleta que permite a obtenção de uma maior quantidade amostral com uma menor complexidade metodológica (LIU et al., 2010; PRUGNOLLE et al., 2010). Como não é necessário o contato direto com o animal, dispensa-se equipamento para contenção e sedação e reduz-se a equipe necessária para coleta, o que é facilitado pela menor necessidade de profissionais especializados no trabalho com primatas, como acontece em processos de coleta invasiva. Além disso, o material necessário é mais simples (COSTA, 2014). Essa redução na complexidade metodológica reduz o tempo necessário para a obtenção das amostras e permite um acompanhamento de uma maior área em menor tempo (LIU et al., 2010; PRUGNOLLE et al., 2010; A-ELGAYOUM, 2010).

Entre as amostras que podem ser obtidas de forma não invasiva estão saliva, urina e fezes (AL-SHEHRI et al., 2019; ASSIS et al., 2016; KAWAI et al., 2014). As amostras fecais, em particular, estão entre aquelas que são mais facilmente coletadas em campo por serem diretamente recuperadas do ambiente, podendo conter material genético parasitário mesmo quando secas (SILVA, 2020). Ao dispensar o contato com os animais, é possível obter amostras de primatas grandes, o que ficou demonstrado no que diz respeito aos gorilas ou aos monos arborícolas da Mata Atlântica (LIU et al., 2010; PRUGNOLLE et al., 2010).

Dentre as espécies que albergam parasitos humanos e símios, os primatas da espécie *Alouatta guariba* (bugio) são os que apresentam maior taxa de infecção natural (DEANE, 1964, DEANE et al., 1971). Por isso, essa espécie é considerada de grande importância para a manutenção da cadeia de transmissão da malária símia e, provavelmente, também da malária humana. A espécie

sofreu elevada mortalidade durante o surto de febre amarela ocorrido em 2017, que atingiu principalmente a região Sudeste (GONTIJO, 2019; BRASIL, 2017b). Devido ao possível papel de primatas não humanos no ciclo da malária, foi proposto que a redução da sua população poderia implicar no fim da transmissão na região de Mata Atlântica (MENDONÇA, 2019). Entretanto, outras espécies, além do *Alouatta guariba*, também são encontradas naturalmente infectadas, como é o caso das espécies e gêneros *Cebus* sp., *Sapajus* sp., *Saimiri sciureus*, *Brachyteles* sp. e *Callithrix jacchus* (DEANE, 1964, DEANE et al., 1971; DEANE, 1992; ARAÚJO, 2013). Assim, é possível que, na ausência de bugios, outra espécie ocupe o papel como reservatório na manutenção da infecção na região Sudeste. Tal possibilidade foi evidenciada neste estudo quando se identificou infecção na espécie *Sapajus nigritus*, que geralmente é pouco referida como hospedeira de plasmódios. Tais símios são mais resistentes à infecção pelo vírus amarelo, o que torna baixo o impacto da febre amarela sobre sua população nas regiões acometidas. Neste caso, as amostras eram positivas para *P. malariae/P. brasilianum* e *P. falciparum*, demonstrando que tais primatas estão albergando ambas as espécies de protozoários encontrados no inquérito (GONTIJO, 2019).

Por outro lado, houve franca redução no número de casos de malária humana na região após a epidemia de febre amarela. Os dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) revelam redução de uma média de 44,3 casos por ano no período de 2007 a 2016 para 3,66 no período de 2018 a 2020. Embora tendo sua frequência reduzida, a endemia não se extinguiu, o que pode estar relacionado à manutenção da cadeia de transmissão pelo *Sapajus nigritus*. O quanto tal espécie símia será capaz de ocupar o nicho deixado pelo *Alouatta* e reconstituir o nível endêmico anterior deve ser objeto de observações futuras.

No presente estudo, foi encontrado um *pool* de fezes positivo para plasmódios em Laranja da Terra, um município onde não há registro de malária humana. A presença de malária símia dissociada da ocorrência da doença em seres humanos tem sido observada desde os estudos de Deane e seus colaboradores (DEANE, 1971; DEANE et al., 1992). Esses autores observaram que a concomitância de malária humana e símia estava relacionada ao menor comportamento acrodendrofílico do vetor anofelino (*Anopheles Kerteszia cruzii*). Em outras palavras, nas regiões em que o anofelino fazia seu repasto sanguíneo exclusivamente na copa, casos de malária humana eram improváveis (DEANE et al., 1966, 1967; DEANE & NETO, 1969; DEANE, 1969). Assim, ao ser considerado o provável papel de reservatório de malária humana representado pelos primatas não humanos, o encontro de malária símia onde não se observa doença em seres humanos deve ser

considerado um sinal de alerta. O comportamento do anofelino é em grande parte dependente da relação do homem com o meio-ambiente. O repasto em nível de solo costuma ocorrer onde a presença humana é mais constante e constitui uma fonte de suprimento sanguíneo (MEDEIROS-SOUZA, 2019; DEANE, 1971). Dessa forma, em áreas significativamente exploradas pelos moradores, como acontece em Laranja da Terra (ESPÍRITO SANTO, 1999; ESPÍRITO SANTO, 2018), o favorecimento de mudanças no comportamento de hematofagia do vetor, na presença de malária símia, pode proporcionar o aparecimento de casos humanos, o que indica a necessidade de monitoramento da região pelas equipes de vigilância em saúde.

Amostras positivas para *P. falciparum* foram encontradas em fezes provenientes de Santa Teresa e Laranja da Terra. Os quadros clínicos de malária humana na região de Mata Atlântica são sempre relacionados a infecções por *P. vivax* e, mais raramente, *P. malariae*. A malária por *P. falciparum* não faz parte das ocorrências de malária-bromélia. Entretanto, diversos estudos têm registrado evidências moleculares e sorológicas da circulação deste protozoário em sistemas de Mata Atlântica (CURADO et al., 2006; CERUTTI et al., 2007). Mesmo em símios da região, há indícios de infecção por *P. falciparum* (DUARTE et al., 2006; FURIERI, 2020). A presença de vetores infectados por *P. falciparum* também foi identificada na região coberta pela Mata Atlântica. Espécimes de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* apresentaram elevada taxa de infecção por esse plasmódio (LAPORTA et al., 2015), superando, inclusive, em frequência, a infecção por *P. vivax*.

As evidências de circulação do *P. falciparum* em um ciclo silencioso em ambiente de Mata Atlântica suscitam várias especulações a respeito de sua origem e constituição, conduzindo a hipóteses relacionadas à sua adaptação ao hospedeiro símio ou à existência de uma variante menos virulenta na região. Tais possibilidades precisam ser esclarecidas por meio de um estudo mais aprofundado das características genômicas deste parasito no contexto da malária-bromélia.

Este estudo apresenta diversas limitações quanto ao seu potencial de contribuição para o conhecimento do ciclo de transmissão da malária em sistemas de Mata Atlântica. A recente epizootia de febre amarela reduziu drasticamente a população de símios, o que tornou mais difícil o encontro e a coleta de suas fezes. A consequência foi o limitado tamanho amostral, para o que também contribuiu nossas limitações logísticas, particularmente no que diz respeito ao número de integrantes da equipe de campo. Pelo fato de que as amostras foram colhidas por conveniência, ou seja, nos locais onde o acesso era possível e nos quais se dispunha de condições de coleta, não há

representatividade em relação às áreas de ocorrência da malária humana. Soma-se a tais limitações, a natureza transversal do estudo, impossibilitando a abordagem do problema sob o ponto de vista da cadeia de eventos. Em um estudo longitudinal, poder-se-ia estabelecer uma relação eventual, por exemplo, entre flutuações na frequência de resultados positivos em símios e variações concomitantes na frequência de malária humana.

Apesar de suas limitações, o presente estudo apresenta importantes contribuições para a compreensão da dinâmica de transmissão da malária símia na região de estudo. Em primeiro lugar, a técnica de extração de DNA de plasmódios a partir de amostras fecais atingiu pleno êxito, estabelecendo a viabilidade de um método logisticamente mais simples em futuros inquéritos. Em segundo lugar, ficou evidente a persistência da infecção símia mesmo em um cenário de drástica redução de seu principal hospedeiro, indicando que a malária permanece sendo transmitida entre primatas não-humanos. Finalmente, a evidência de símios infectados em uma região em que não ocorre malária humana mostra a amplitude de sua abrangência e lança um alerta para a vigilância em saúde, no sentido de monitorar eventuais ocorrências de casos humanos no local. As características peculiares da malária de sistemas residuais de Mata Atlântica, uma infecção parasitária que incide concomitantemente em seres humanos e primatas não humanos, demandam permanente atenção dos pesquisadores e gestores de saúde, uma vez que esta condição mórbida representa uma fronteira desafiadora aos esforços de eliminação da malária em nível global.

## 7. CONCLUSÃO

A utilização de metodologias moleculares para identificação de espécies de plasmódios em amostras fecais, obtidas de forma não invasiva, de símios no estado do Espírito Santo foi capaz de identificar a infecção por *P. falciparum* e *P. malariae/P. brasilianum*.

A taxa de infecção global (10,3%) está próxima do valor observado por outros estudos sobre malária em primatas não humanos, que foram realizados na região Sudeste. A predominância da infecção por *P. falciparum* também foi observada em outros estudos e pode indicar que símios teriam um papel como reservatórios dessa espécie de plasmódio.

A confirmação de infecção na espécie *Sapajus nigritus*, espécie que geralmente apresenta baixa taxa de infecção por plasmódios, pode indicar que essa espécie venha a ter papel significativo como reservatório da infecção no estado do Espírito Santo, após o surto de febre amarela.

A observação de amostras positivas em Laranja da Terra, uma região sem ocorrência habitual de casos humanos e com características ambientais diferentes da região considerada endêmica, pode indicar que a infecção símia ocorre mesmo em locais em que a malária humana é pouco observada pelos estudos epidemiológicos atuais. O monitoramento da infecção símia, inclusive em municípios com pouca ocorrência de malária humana, se faz necessário para que se antecipe eventuais aumentos na área de abrangência desta última condição.

## 8. REFERÊNCIAS

- A-ELGAYOUM, Salwa M.E.; EL-RAYAH, El-Amin; GIHA, Hayder A. Towards a noninvasive approach to malaria diagnosis: detection of parasite DNA in body secretions and surface mucosa. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**. v. 18, n. 3, p. 148-55, 2010. Disponível em: doi: 10.1159/000308516. Acesso em 17 de Fevereiro de 2021.
- AL-SHEHRI, Hajri *et al.* Non-invasive surveillance of *Plasmodium* infection by real-time PCR analysis of ethanol preserved faeces from Ugandan school children with intestinal schistosomiasis. **Malaria Journal**, v. 18, n.1, p. 109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2748-4>. Acesso em 17 de Fevereiro de 2021.
- ARAÚJO, Maisa da Silva. **Estudo da malária de primatas não humanos e sua relação com a malária humana no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira**. Orientador: Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva. 2013. 80f. Tese (Doutor em Biologia Experimental) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Departamento de Medicina da Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013. Disponível em: <https://www.ri.unir.br/jspui/handle/123456789/283>. Acesso em 19 de Maio de 2018.
- ASSIS, Gabriela Maira Pereira *et al.* Detection of *Plasmodium* in faeces of the new world primate *Alouatta clamitans*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 9, p. 570–576, 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762016000900570](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000900570). Acesso em 28 de Janeiro de 2020.
- BARATA, Rita de Cássia B. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na última Década. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11. n. 1, p. 128-136, 1995. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X1995000100019&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X1995000100019&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em 01 de Fevereiro de 2021.

BENCHIMOL, Jaime Larry; SÁ, Magali Romero (Org.). **Adolpho Lutz - Obra Completa - v.2: Febre amarela, malária e protozoologia**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15124>. Acesso em 27 de Novembro de 2019.

BICKERSMITH, Sara A *et al.* A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 573–576, 2015. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X1995000100019&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X1995000100019&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em 01 de Março de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Campanhas de Erradicação da Malária. V Reunião de Diretores de Serviços Nacionais de Erradicação da Malária da América do Sul. Buenos Aires: 1965. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjtndeTsorvAhWoILkGHWvSDagQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsm.sau.de.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Fcd04\\_17.pdf&usg=AOvVaw03xRB4WWqmn4z7jDf8JJz-](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjtndeTsorvAhWoILkGHWvSDagQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsm.sau.de.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Fcd04_17.pdf&usg=AOvVaw03xRB4WWqmn4z7jDf8JJz-). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM., Brasília, DF, 2003. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj\\_y8Xm8IjvAhWDGbkGHS0LAZgQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsm.sau.de.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Fprograma\\_nac\\_prev\\_malaria.pdf&usg=AOvVaw0cbaIIZl\\_pSGgQK0Oc08km](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj_y8Xm8IjvAhWDGbkGHS0LAZgQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsm.sau.de.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Fprograma_nac_prev_malaria.pdf&usg=AOvVaw0cbaIIZl_pSGgQK0Oc08km). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção

básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiJ8eaV8YjvAhU2IrkGHcoZDK0QFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsmms.saude.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Ffacoes\\_controle\\_malaria\\_manual.pdf&usg=AOvVaw0y6HgHHg0R8t5IMH\\_9BKND](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiJ8eaV8YjvAhU2IrkGHcoZDK0QFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fbvsmms.saude.gov.br%2Fbvsm%2Fpublicacoes%2Ffacoes_controle_malaria_manual.pdf&usg=AOvVaw0y6HgHHg0R8t5IMH_9BKND). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2000 a 2011. Boletim Epidemiológico. 2013. Brasília - Brasil; v. 44, n. 1. Brasília - Brasil. 2013. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi8\\_eKy8YjvAhUOGbkGHQrpCm0QFjABegQIAXAD&url=http%3A%2F%2Fbvsmms.saude.gov.br%2Fbvsm%2Fperiodicos%2Fboletim\\_epidemiologico\\_numero\\_1\\_2013.pdf&usg=AOvVaw0EZMWQ4EjhBKGqHKasBz\\_O](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi8_eKy8YjvAhUOGbkGHQrpCm0QFjABegQIAXAD&url=http%3A%2F%2Fbvsmms.saude.gov.br%2Fbvsm%2Fperiodicos%2Fboletim_epidemiologico_numero_1_2013.pdf&usg=AOvVaw0EZMWQ4EjhBKGqHKasBz_O). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013. v. 46, n. 43, 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/m/malaria>. Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde lança Plano de Eliminação da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiz\\_oNC-nIrvAhVrHLkGHcSwBGwQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fportal.arquivos2.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Fjaneiro%2F04%2FPlano-eliminacao-malaria-pub.pdf&usg=AOvVaw15OFXe5KGcVRSKIHzJVP15](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiz_oNC-nIrvAhVrHLkGHcSwBGwQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fportal.arquivos2.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Fjaneiro%2F04%2FPlano-eliminacao-malaria-pub.pdf&usg=AOvVaw15OFXe5KGcVRSKIHzJVP15). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde – 2. ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2017a. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjxnNbLnYrvAhWBJ7kGHQ9ODcEQFjABegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Fportalquivos.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Foutubro%2F06%2FVolume-Unico-2017.pdf&usg=AOvVaw1absMRY\\_oHmQpw5nzuMW1k](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjxnNbLnYrvAhWBJ7kGHQ9ODcEQFjABegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Fportalquivos.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Foutubro%2F06%2FVolume-Unico-2017.pdf&usg=AOvVaw1absMRY_oHmQpw5nzuMW1k). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. v. 48, n. 28, 2017b. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwij0v-v8ojvAhW4H7kGHXwKBQsQFjAAegQIARAD&url=https%3A%2F%2Fportalquivos2.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Fsetembro%2F06%2F2017\\_027.pdf&usg=AOvVaw3YyFAGkLqD0Lx5psGQ7zdi](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwij0v-v8ojvAhW4H7kGHXwKBQsQFjAAegQIARAD&url=https%3A%2F%2Fportalquivos2.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2017%2Fsetembro%2F06%2F2017_027.pdf&usg=AOvVaw3YyFAGkLqD0Lx5psGQ7zdi). Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. v. 50, n. 12. 2019. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjpkfsD8ojvAhWwH7kGHQldC9QQFjAAegQIARAD&url=https%3A%2F%2Fportalquivos2.saude.gov.br%2Fimages%2Fpdf%2F2019%2F Abril%2F01%2F2018-066.pdf&usg=AOvVaw0kefJNy77JRAV1E8UmZCdm>. Acesso em 02 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Lei nº 1.042, de 11 de janeiro de 1939. Cria, no Ministério da Educação e Saúde, o serviço de Malária do Nordeste. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1930-1939/decreto-lei-1042-11-janeiro-1939-350262-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em 18 de Dezembro 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Malária /2020. Número Especial. 2020a. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjw0Irs84jvAhUMD7kGHck8ClkQFjABegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.gov.br%2Fsaude%2Fpt-br%2Fmedia%2Fpdf%2F2020%2Fdezembro%2F03%2Fboletim\\_especial\\_malaria\\_1dez20\\_final.pdf&usg=AOvVaw03VxIiwua5Bm6rmVZALII2](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjw0Irs84jvAhUMD7kGHck8ClkQFjABegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.gov.br%2Fsaude%2Fpt-br%2Fmedia%2Fpdf%2F2020%2Fdezembro%2F03%2Fboletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf&usg=AOvVaw03VxIiwua5Bm6rmVZALII2). Acesso em 06 de Janeiro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Série histórica dos casos de malária por município de notificação da região extra-Amazônica, 2007 a dezembro de 2020\*. 2020b. Disponível em: [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/BoletimregiaoExtra-Amazonica\\_30\\_12\\_2020/SrieHist](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/BoletimregiaoExtra-Amazonica_30_12_2020/SrieHist). Acesso em 05 de Fevereiro de 2021.

BRASIL, Patrícia *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. 1038-1046, 2017. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(17\)30333-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(17)30333-9/fulltext). Acesso em 19 de Março de 2018.

BUERY, Julyana Cerqueira *et al.* Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simum* 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? **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 437, 2017. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-2080-9>. Acesso em 09 de Janeiro de 2020.

CD-ROM. The primate malarias [original book published 1971]. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. Division of Parasitic Disease, producers. Version 1.0. Atlanta, GA: CDC; 2003.

CERUTTI Jr., Crispim *et al.* Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria Journal**, v. 6, p. 33, 2007. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-6-33>. Acesso em 01 de Janeiro de 2020.

CERUTTI, Crispim Junior. **Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo**. Orientador: Dr. Marcos Boulos. 228f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-21062007-151653/pt-br.php>. Acesso em 09 de Janeiro de 2020.

COPPI, Alida *et al.* Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. **Cell Host & Microbe**. v. 2, n. 5, p. 316-327, 2007. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(07\)00248-X?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS193131280700248X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(07)00248-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS193131280700248X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 12 de Outubro de 2020.

COSTA, Daniela Camargos. **A infecção malárica pelo *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* em primatas não humanos de três regiões da Mata Atlântica brasileira**. Orientador: Cristiana Ferreira Alves de Brito. Tese (Doutor em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10043>. Acesso em 07 de Setembro de 2020.

CURADO, Izilda *et al.* Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* / *P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 235–243, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/64/4/647/1896504?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em 02 de Janeiro de 2020.

CURADO, Izilda *et al.* Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 100, p. 54–62, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.09.010>. Acesso em 16 de Março de 2021.

DEANE, Leonidas M. *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 4, p. 647, 1970. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(70\)90088-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(70)90088-X). Acesso em 18 de Outubro de 2018.

DEANE, Leonidas M. *et al.* On the transmission of simian malaria in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**. v. 13, n. 5, p. 311–9, 1971. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjA1IzssIrvAhVOIrkGHYJPAwkQFjABegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fwww.imt.usp.br%2Fwp-content%2Fuploads%2Frevista%2Fvol13%2F311-319.pdf&usq=AOvVaw3wFOOMZBvvDgd8hqrwI7wq>. Acesso em 18 de Outubro de 2018.

DEANE, Leonidas M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, supl. 3, p. 1–20, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-0276199200070000>. Acesso em 23 de Dezembro de 2019.

DEANE, Leonidas M. Studies on simian malaria in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, n. 5, p. 752–754, 1964. Disponível em:

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761992000700001](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761992000700001).

Acesso em 08 de Novembro de 2020.

DEANE, Leonidas M; DEANE, Maria Paumgarten; FERREIRA NETO, Joaquim A. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 5, p. 805–808, 1966. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2476224/>. Acesso em 04 de Novembro de 2018.

DEANE, Leonidas M; DEANE, Maria Paumgarten; FERREIRA NETO, Joaquim A. Estudios sobre la transmision de la malaria simica y sobre una infeccion natural del hombre por *Plasmodium simium* en el Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 63, n. 2, p. 100-5, 1967. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiLnoL397nvAhV6DrkGHbd9AzgQFjABegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Firis.paho.org%2Fbitstream%2Fhandle%2F10665.2%2F12661%2Fv63n2p100.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy&usg=AOvVaw1NSPNECMWFaMx3aDKDaFDX>. Acesso em 15 de Março de 2021.

DEANE, Leonidas M & NETO, Joaquim A. Ferreira. Malária em macacos do estado do Rio Grande do Sul. Observações preliminares. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 5, p. 299-305, 1969. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj4ysTW97nvAhWshLkGHQLJCZ0QFjABegQIAxAD&url=http%3A%2F%2Fwww.imt.usp.br%2Fwp-content%2Fuploads%2Frevista%2Fvol11%2F299-305.pdf&usg=AOvVaw2iOwjCwgfzUOfotvRbaB8j>. Acesso em 15 de Março de 2021.

DEANE, Leonidas M. Plasmodia of monkey and malaria eradication in Brazil. **Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología**, v. 11, p. 69-73, 1969. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1972.tb02268.x>. Acesso em 15 de Março de 2021.

DUARTE, Ana Maria R. C et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, p. 87-96, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x>. Acesso em 16 de Março de 2021.

DUARTE, Ana Maria R. C et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3605261/>. Acesso em 11 de Maio de 2018.

DUARTE, Ana Maria R. C et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179–185. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X08001654?via%3Dihub>. Acesso em 01 de Janeiro de 2020.

ESPÍRITO SANTO. Atlas da Mata Atlântica: Do Estado do Espírito Santo (2007-2008/2012-2015). Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (Governo do Estado do Espírito Santo). Sossai, Marcos Frankin (coord.). Cariacica-ES; IEMA, 2018. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjYgvyb-IjvAhVeJrkGHVppBjYQFjABegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Fseama.es.gov.br%2FMedia%2Fseama%2FDocumentos%2FReflorestar%2FAtlas%2FIntroducao%2520-%2520Metodologias%2520-%2520Resultados%2520e%2520Discussoes.pdf&usq=AOvVaw0SyREcp1Fsf2Un\\_CO2rjzE](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjYgvyb-IjvAhVeJrkGHVppBjYQFjABegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Fseama.es.gov.br%2FMedia%2Fseama%2FDocumentos%2FReflorestar%2FAtlas%2FIntroducao%2520-%2520Metodologias%2520-%2520Resultados%2520e%2520Discussoes.pdf&usq=AOvVaw0SyREcp1Fsf2Un_CO2rjzE). Acesso em 05 de Janeiro de 2021.

ESPÍRITO SANTO. ZONAS NATURAIS DO ESPÍRITO SANTO: uma regionalização do Estado, das microrregiões e dos municípios. Secretaria de Estado do Planejamento – SEPLAN. FONTE: Informações das Unidades Naturais na concepção da EMCAPA/NEPUT. Vitória-ES 1999. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwii1ePJ-IjvAhVSHrkGHcdPDxwQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fwww.ijsn.es.gov.br%2FConteudoDigital%2F20121211\\_es01655\\_zonasnaturaisdoespiritosanto.pdf&usg=AOvVaw3HIZIYd7tUi42Yr08ih2Dw](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwii1ePJ-IjvAhVSHrkGHcdPDxwQFjAAegQIARAD&url=http%3A%2F%2Fwww.ijsn.es.gov.br%2FConteudoDigital%2F20121211_es01655_zonasnaturaisdoespiritosanto.pdf&usg=AOvVaw3HIZIYd7tUi42Yr08ih2Dw). Acesso em 05 de Janeiro de 2021.

FIGUEIREDO, Mayra Araguaia Pereira. **Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais na ilha de São Luís, estado do Maranhão, Brasil.** Orientador: Dra. Rosangela Zacarias Machado. 62f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária - Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012. Disponível em [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjeoP6Gt4XvAhXbH7kGHZIMALcQFjAAegQIARAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.unesp.br%2Fbitstream%2F11449%2F96001%2F1%2Ffigueiredo\\_map\\_me\\_jabo.pdf&usg=AOvVaw1unQnAb80bdfNQmu3I86T0](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjeoP6Gt4XvAhXbH7kGHZIMALcQFjAAegQIARAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.unesp.br%2Fbitstream%2F11449%2F96001%2F1%2Ffigueiredo_map_me_jabo.pdf&usg=AOvVaw1unQnAb80bdfNQmu3I86T0). Acesso em 12 de Junho de 2018.

FURIERI, Cintia. **Pesquisa de DNA de *Plasmodium* em amostras de fígado de símios mortos.** Orientador: Dr. Crispim Cerutti Junior. 92f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2020. Disponível em <https://doencasinfeciosas.ufes.br/pt-br/pos-graduacao/PPGDI/detalhes-da-tese?id=14592>. Acesso em 21 de Outubro de 2020.

GAMBOA, Dionicia *et al.* A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for malaria rapid diagnostic tests. **PLoS ONE**, v.

5, n. 1, p. e8091, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008091>. Acesso em 22 de Fevereiro de 2020.

GONTIJO, Nila Rássia Costa. **Impacto do surto de febre amarela na ocorrência de primatas em paisagens fragmentadas do Espírito Santo**. Orientador: Sérgio Lucena Mendes. 61f. Dissertação (Mestre em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019. Disponível em: <https://cienciasbiologicas.ufes.br/pt-br/pos-graduacao/PPGBAN/detalhes-da-tese?id=13254>. Acesso em 11 de Setembro de 2020.

HOCHMAN, Gilberto; MELLO, Maria Teresa Bandeira; SANTOS, Paulo Roberto Elian. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos** [online]. 2002. v.9, n. 1, p.233-273, 2002. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-59702002000400011&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-59702002000400011&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em 25 de Janeiro de 2021.

JIRKŮ, Milan *et al.* Detection of *Plasmodium* spp. in human feces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 634–636, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309680/>. Acesso em 01 de Janeiro de 2020.

KARL, Stephan *et al.* A sub-microscopic gametocyte reservoir can sustain malaria transmission. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20805, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020805>. Acesso em 28 de Fevereiro de 2020.

KAWAI, Satoru *et al.* Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. **Malaria Journal**, v. 13, p. 373, 2014. Disponível em:

<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-373>. Acesso em 19 de Maio de 2018.

LALREMURATA, Albert *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1186–1192, 2015. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(15\)30085-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(15)30085-2/fulltext). Acesso em 06 de Janeiro de 2020.

LAPORTA, Gabriel Zorello *et al.* *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm?. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 181, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0680-9>. Acesso em 16 de Fevereiro de 2020.

LIU, Weimin *et al.* Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. **Nature**. v. 467, n. 7314, p.420-5, 2010. Disponível em: doi: 10.1038/nature09442. Acesso em 16 de Fevereiro de 2021.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo; DEANE, Leonidas M. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon: I - The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 90, n. 3, p. 331-339, 1995. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761995000300004](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761995000300004). Acesso em 23 de Dezembro de 2019.

MAPUA, Mwanahamisi I *et al.* No impact of strongylid infections on the detection of *Plasmodium* spp. in faeces of western lowland gorillas and eastern chimpanzees. **Malaria Journal**. v. 16, p. 175, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406944/>. Acesso em 02 de Abril de 2018.

MATSUOKA, Hiroyuki *et al.* A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*, **Parasitology International**, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2002. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008091>. Acesso em 18 de Fevereiro de 2021.

MCGREGOR, Ian; KROTOSKI, Wojciech. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n.1, p. 1-11, 1985. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/79/1/1/1871538?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em 22 de Março de 2020.

MEDEIROS-SOUSA, Antônio Ralph *et al.* Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. **Malaria Journal**. v. 18, p. 110, 2019. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-019-2744-8>. Acesso em 14 de Junho de 2019.

MENDONÇA, Gustavo Vital. **Análise da série histórica de malária residual em municípios do Espírito Santo com sistemas de Mata Atlântica no período de 2007 a 2018**. Orientador: Dr. Crispim Cerutti Junior. 52f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019. Disponível em: <https://doencasinfeciosas.ufes.br/pt-br/pos-graduacao/PPGDI/detalhes-da-tese?id=13188>. Acesso em 12 de Novembro de 2019.

MOTA, Maria M. *et al.* Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**. v. 291, n. 5501, p. 141-144. 2001. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/291/5501/141.long>. Acesso em 21 de Janeiro de 2021.

OGUIKE, Mary C; SUTHERLAND, Colin J. Dimorphism in genes encoding sexual-stage proteins of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 7, p. 449–454, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751915000508?via%3Dihub>. Acesso em 16 de Fevereiro de 2020.

PACKARD, Randall M; GADELHA, Paulo. A land filled with mosquitoes: Fred L Soper, The Rockefeller Foundation and the *Anopheles gambiae* invasion of Brazil. **Medical Anthropology**, v. 17, n.3, p. 215-238, 1997. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01459740.1997.9966138>. Acesso em 25 de Outubro de 2020.

PINOTTI, Mario. The biological basis for the campaign against the malaria vectors of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 663-682, 1951. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/44/6/663/1884626?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em 25 de Outubro de 2020.

PRUGNOLLE, Franck *et al.* African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 4, p. 1458-1463, 2010. Disponível em: DOI: 10.1073/pnas.0914440107. Acesso em 20 de Fevereiro de 2021.

REGEV-RUDZKI, Neta *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**. v. 153, n. 5, p.1120-1133, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029>. Acesso em 25 de Outubro de 2020.

REZENDE, Helder R *et al.* Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 272–280, 2009. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2009000200017](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2009000200017). Acesso em 23 de Dezembro de 2019.

ROUGEMONT, Mathieu *et al.* Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific Real-Time PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5636–5643, 2004. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/42/12/5636.long>. Acesso em 01 de Março de 2020.

SÃO THIAGO, Paulo de Tarso. **História da malária em Santa Catarina**. Orientador: Dr. Fernando Dias de Ávila-Pires, 2003.108f. Dissertação (Mestre em Saúde Pública). - Programa de Pós-graduação em Saúde Pública da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjXjoLGt\\_HvAhWtLLkGHWJRATYQFjACegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.ufsc.br%2Fxmlui%2Fbitstream%2F123456789%2F85936%2F1%2F191406.pdf&usg=AOvVaw3oA7epkDWZ301BZa4QYJWu](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjXjoLGt_HvAhWtLLkGHWJRATYQFjACegQIAhAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.ufsc.br%2Fxmlui%2Fbitstream%2F123456789%2F85936%2F1%2F191406.pdf&usg=AOvVaw3oA7epkDWZ301BZa4QYJWu). Acesso em 09 de Março de 2021.

SILVA, Fabiana Santos. **Deteção de *Plasmodium* spp. por meio do DNA ambiental (eDNA) associado à interação ecológica entre macaco bugio (*Alouatta guariba clamitans*) e besouros coprófagos (Coleoptera, Scarabaeidae) em áreas de transmissão de malária na Mata Atlântica**. Orientador: Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, 2019.135f. Dissertação (Mestre em Ciências). - Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/99/99131/tde-14102020-090518/pt-br.php>. Acesso em 17 de Janeiro de 2021.

SINGH, Balbir *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004. Disponível em:

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)15836-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)15836-4/fulltext).

Acesso em 03 de Janeiro de 2020.

SIREGAR, Josephine E *et al.* Non-invasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. **Malaria Journal**. v. 14, n. 404, 2015. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-015-0857-2#citeas>.

Acesso em 01 de Janeiro de 2020.

SNOUNOU, Georges *et al.* Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 283–292, 1993.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685193900508?via%3Dihub>. Acesso em 05 de Dezembro de 2019.

STURM, Angelika *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**. v. 313, n. 5791, p. 1287-1290. 2006. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/313/5791/1287.long>. Acesso em 12 de Janeiro de 2021.

TA, Thuy *et al.* First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**. v. 13, p. 68, 2014. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-68>. Acesso em 12 de Março de 2020.

TAUIL, Pedro *et al.* A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 1, n. 1, p. 71–111, 1985. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X1985000100009](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1985000100009). Acesso em 14 de Dezembro de 2020.

TAUIL, Pedro; DANIEL-RIBEIRO, Cláudio Tadeu. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**. v. 58, n. 3-4, p. :163-167, 1998. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/308308527\\_Some\\_aspects\\_of\\_epidemiology\\_and\\_control\\_of\\_malaria\\_in\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/308308527_Some_aspects_of_epidemiology_and_control_of_malaria_in_Brazil). Acesso em 13 de Abril de 2020.

WORLD MALARIA REPORT 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WORLD MALARIA REPORT 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

YAMAUCHI, Lucy Megumi *et al.* *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215-1222, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x>. Acesso em 15 de Março de 2019.

ZIMMERMAN, Peter A; HOWES, Rosalind E. Malaria diagnosis for malaria elimination. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 28, n. 5, p. 446-54. 2015. Disponível em: [10.1097/QCO.000000000000191](https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000191). Acesso em 05 de Dezembro de 2019.

## ANEXOS

### Anexo A - Autorização ICMBio/SISBIO



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

#### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 15191-10	Data da Emissão: 07/06/2019 12:41:24	Data da Revalidação*: 07/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Crispim Cerutti Junior	CPF: 949.731.487-68
Título do Projeto: Investigação da malária símia em primatas do gênero Alouatta na Mata Atlântica do Espírito Santo	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de até cinco espécimes de símios do gênero Alouatta	08/2015	08/2016
2	Captura de até cinco espécimes de símios do gênero Alouatta	08/2015	09/2016
3	Coleta de fezes de símios da região rural endêmica para malária-bromélia	12/2018	07/2020

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Rosely dos Santos Malafronte	membro participante/bióloga molecular	039.413.698-57	Brasileira
2	Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte	membro participante/primatóloga	144.067.418-36	Brasileira
3	SÉRGIO LUCENA MENDES	membro participante/primatólogo	621.083.447-72	Brasileira
4	Rogério Ribeiro dos Santos	Técnico de campo	078.136.987-89	Brasileira
5	Vivaldo Pim Vieira	membro participante/biólogo	031.743.737-27	Brasileira
6	Jomar Fagundes Junior	membro participante/ESTUDANTE DE MESTRADO	050.069.485-07	Brasileira
7	Suellen Ramos Barboza	Médica Veterinária	111.689.737-75	Brasileira
8	NILA RÁSSIA COSTA GONTIJO	membro participante/bióloga	080.430.396-74	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0151911020190607

Página 1/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 15191-10	Data da Emissão: 07/06/2019 12:41:24	Data da Revalidação*: 07/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Crispim Cerutti Junior	CPF: 949.731.487-68
Título do Projeto: Investigação da malária símia em primatas do gênero <i>Alouatta</i> na Mata Atlântica do Espírito Santo	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

#### Outras ressalvas

1	As visitas de campo devem ser agendadas com pelo menos uma semana de antecedência.	REBIO Augusto Ruschi
---	------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0151911020190607

Página 2/4



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 15191-10	Data da Emissão: 07/06/2019 12:41:24	Data da Revalidação*: 07/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Crispim Cerutti Junior	CPF: 949.731.487-68
Título do Projeto: Investigação da malária símia em primatas do gênero Alouatta na Mata Atlântica do Espírito Santo	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO	CNPJ: 32.479.123/0001-43

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

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Estadual de Pedra Azul	Domingos Martins-ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual
2	Parque Natural de São Lourenço	Santa Teresa-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Estação Biológica de Santa Lúcia	Santa Teresa-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Reserva Biológica de Augusto Ruschi	ES	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal
5	Várias áreas rurais de Sta Tereza e Sta Maria de Jetibá	Santa Teresa-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
6	várias áreas rurais de Sta Tereza e Sta Maria de Jetibá	Santa Teresa-ES	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Primates	-
2	Captura de animais silvestres in situ	Primates	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Primates	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue, Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta (imobilização química com dardos anestésicos), Captura manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1		Outro
2		Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0151911020190607

Página 3/4



## Anexo B - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Identificação de símios infectados por Plasmodium no sistema residual de mata atlântica no Espírito Santo. Distribuição da infecção símia e caracterização molecular das espécies de Plasmodium**

Registrada sob o n.º **62/2019** sob a responsabilidade de **CRISPIM CERUTTI JUNIOR**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **20/12/2019**

Vigência da autorização: **16/01/2020** a **21/02/2021** Finalidade: **Pesquisa**

Número da Solicitação ou Autorização SISBIO: **15.191**

Atividade(s):  Captura  Coleta de Espécimes  Marcação  Outras(s): **Coleta de fezes à campo**

Espécie(s)/Grupo(s) taxonômico(s): **Espécies silvestres brasileiras. Símios**

Local(is) de realização da(s) atividade(s): **Áreas de Mata Atlântica em Santa Teresa/ES, Satna Maria de Jetibá/ES e Domingos Martins/ES**

Vitória-ES, **20/12/2019**

*Breno S. Salgado*

Prof. Breno Souza Salgado  
Coordenador da CEUA-UFES

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Avenida Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória/ES – CEP 29043-910 – Telefone: (27) 3335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br